

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos CIDEM

## AUSENCIA DE POTENCIAL GENOTÓXICO IN VITRO E IN VIVO DE UN EXTRACTO FLUIDO DE PIPER AURITUM H.K.B.

Lic. Angel Vizoso Parra,<sup>1</sup> Lic. Arilia García López y Lic. Alberto Ramos Ruiz<sup>3</sup>

### RESUMEN

Se presentan los resultados obtenidos al evaluar el potencial genotóxico de un extracto fluido con un menstruo etanólico al 70 % de *Piper auritum* H.K.B. (caisimón de anís) en 3 sistemas de ensayo a corto plazo, 2 *in vitro*, empleando el ensayo de Ames y el sistema *Aspergillus nidulans* D-30 (ensayo de segregación somática) y otro *in vivo*, utilizando la prueba de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón. En el ensayo de Ames se evaluaron concentraciones en un rango de 50 a 5 000 µg/placa para las cepas TA-1535, TA-100 y TA-98 y para la cepa TA-1537 de 500 a 5 000 µg/placa. En el ensayo de segregación somática se probaron concentraciones de 0,06 a 1,80 mg de sólidos totales/mL. Para la prueba de inducción de micronúcleos se ensayaron un rango de dosis de 283,00 a 1 134,63 mg/kg de peso corporal (pc). Los resultados obtenidos demuestran que el extracto fluido de *Piper auritum* H.K.B. fue moderadamente citotóxico en el sistema *Aspergillus nidulans* D-30, no comportándose así en el ensayo de Ames, ni en la prueba de micronúcleos. No se observó respuesta genotóxica en los 3 sistemas empleados.

Descriptores DeCS: PLANTAS MEDICINALES; TEST DE MICRONUCLEOS; ENSAYOS CLINICOS; ASPERGILLUS NIDULANS; MEDULA OSEA/efectos de drogas; RATONES.

### SUMMARY

We present results obtained in evaluation of genotoxic potential of a fluid extract, using ethanolic menstrum to 70 % from *Piper auritum* H.K.B. (caisimón de anís) in three short term trial systems, two *in vitro*, using Ames trial, and D-30 *Aspergillus nidulans* system (somatic segregation trial), and other *in vivo*, using micronuclei induction test in mouse bone marrow. In Ames trial, we evaluated concentrations in a rank of 50 to 5 000 µg/plate to strains TA-1535, TA-100, and TA-98 as well as to strain TA-1537 of 500 to 5 000 µg/plate. In somatic segregation trial, concentrations of 0,06 to 1,80 mg of total solids /mL, were analyzed. For micronuclei induction, a doserank of 283,00 to 1 134,63 mg/kg of body weight (B.W.) was assayed. Results obtained showed that fluid extract from *Piper auritum* H.K.B., was moderately cytotoxic in D-30 *Aspergillus nidulans* system, but not in Ames trial, and in micronuclei test. There wasn't genotoxic response in all three systems used.

Subject headings: PLANTS, MEDICINAL; MICRONUCLEI TESTS; CLINICAL TRIALS; ASPERGILLUS NIDULANS; BONE MARROW/drug effects; MICE.

Con el auge que en la actualidad tiene la Fitoterapia, la Genética Toxicológica se ha puesto a su servicio, y se ha comprobado que los medicamentos de origen vegetal con una o más acciones terapéuticas pueden presentar sustancias con actividad mutagénica relacionadas con procesos carcinogénicos, alteraciones en la descendencia y desarrollo

de malformaciones congénitas.<sup>1-4</sup> Dentro de nuestro proyecto de investigación se procedió a evaluar la posible actividad genotóxica de un extracto fluido con un menstruo etanólico 70 % de *Piper auritum* H.K.B. planta perteneciente a la familia *Piperaceae* originaria de México muy difundida en Cuba donde se le conoce como anisillo o caisimón

<sup>1</sup> Licenciado en Ciencias Biológicas. Investigador Auxiliar. CIDEM.

<sup>2</sup> Licenciada en Microbiología. CIDEM.

<sup>3</sup> Licenciado en Bioquímica. Investigador Auxiliar. CIDEM.

de anís. Además existe en otros países de América Central y Colombia.<sup>5</sup>

Sus hojas se emplean como emoliente y para aliviar el dolor de cabeza. Se le ha empleado en el tratamiento de anginas, erisipela, fiebre, gota y reumatismo y se le ha atribuido propiedades diaforéticas y estimulantes.<sup>5</sup> Además se ha utilizado como abortivo.<sup>6</sup>

El caisimón de anís es una planta rica en alcaloides.<sup>7</sup> En sus hojas pueden encontrarse sesquiterpenos y monoterpenos como borneol, canfor, cineol, otros como eugenol, safrol y una amplia variedad de componentes bencénicos.<sup>8-10</sup>

En sus raíces se ha detectado isoquinolonas y en sus frutos, aminas, azúcares reductores, taninos y esteroides-triterpenos.<sup>11,12</sup>

Se ha comprobado farmacológicamente la actividad antibacteriana de diferentes extractos de la planta, tanto de sus hojas como de su tallo. Igualmente se demostró actividad antifúngica frente a *Candida albicans* y *Cladosporium* sp de extractos crudos de caisimón de anís.<sup>13,14</sup> También diversos extractos de tallos y hojas de la planta demostraron acciones hipotensoras del músculo uterino y vasodilatador.<sup>15</sup>

Los ensayos genotóxicos se iniciaron con 2 ensayos *in vitro*: la prueba de Ames que detecta de una forma rápida y sencilla mutaciones puntuales.<sup>16,17</sup> Y la prueba con el hongo diploide *Aspergillus nidulans* D-30, la cual pone de manifiesto daño primario en el ADN. Este ensayo permite distinguir especialmente aquellos sectores segregantes que ocurren por recombinación mitótica, no disyunción cromosómica (aneuploidia) y ciertos tipos de aberraciones cromosómicas estructurales.<sup>18</sup>

Posteriormente se evaluó el extracto fluido del caisimón de anís mediante un ensayo *in vivo*, seleccionándose la prueba de micronúcleos en médula ósea de ratón, que detecta daño cromosómico en eritoblastos expuesto a agentes aneugénicos y clastogénicos.<sup>19</sup>

El presente trabajo tiene como objetivo determinar la posible acción citotóxica y genotóxica de un extracto fluido de *Piper auritum* H.K.B. empleando los 3 sistemas de ensayos a corto plazo propuestos.

## MÉTODOS

### MATERIAL VEGETAL

La planta se cultivó en la Estación Experimental de Plantas Medicinales "Dr. Juan Tomás Roig", Güira de Melena, Habana. A partir de sus hojas se preparó un extracto fluido con un menstruo etanólico al 70 %, según la Norma Ramal Vigente.<sup>20</sup> La muestra estudiada correspondía al lote 3/97, el cual contenía: etanol, 61,30 % v/v; sólidos totales, 10,94 %; índice de refracción, 1,382; pH, 6,3; aceite esencial, 1,06 %. Un ejemplar de la planta se encuentra depositado en el herbario de dicha estación con el número Roig 4622.

### ENSAYO DE AMES

Se empleó el protocolo clásico de incorporación en placa descrito por Maron y Ames.<sup>16</sup> Las cepas de *Salmonella typhimurium* TA-1535, TA-1537, TA-98 fueron enviadas por el Dr. Bruce N. Amos (Universidad de California, Berkeley) y conservada a (-80 °C). El etanol del extracto se eliminó bajo presión reducida y el sólido residual se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta una concentración final de 50 mg/mL.

Se probaron 5 concentraciones de 50 a 5 000 µg de sólidos/placa para las cepas TA-1535, TA-98 y TA-100; para la cepa TA-1537 se ensayaron concentraciones de 500 a 5000 mcg de sólidos/placa, realizándose un experimento con 3 placas por concentración.<sup>21</sup>

La fracción microsomal de hígado de rata (S9), se preparó a partir de ratas *Wistar* de 200 g de peso tratadas con fenobarbital y 5-6 benzoflavona.<sup>22</sup> La metodología para obtener la fracción es descrita por Maron y Ames.

En el momento del ensayo se preparó la mezcla S9, que contenía KCL, 33 mM; MgCl<sub>2</sub>, 8 mM; NADP, 4 mM; glucosa-6-fosfato, 5mM; un 4 % de fracción S9 y buffer fosfato de sodio 100 mM pH, 7,1. La mezcla se mantuvo en baño de hielo hasta su empleo. Como control negativo se empleó DMSO, como los controles positivos lo recomendado por Maron y Ames para cada cepa.

Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h y al cabo de ese tiempo se contaron manualmente el número de colonias revertantes por placa.

Para el análisis estadístico se siguieron las recomendaciones de Mahon.<sup>23</sup> Para cada tratamiento se calculó el promedio y la desviación estándar de las lecturas. Se transformaron los datos (revertantes por placa) empleando la fórmula  $\sqrt{x}$ , y se procedió aplicar el método de Dunnett.

### ENSAYO DE SEGREGACIÓN SOMÁTICA

Se empleó la cepa diploide de *Aspergillus nidulans* D-30,<sup>24</sup> sintetizada vía ciclo parasexual empleando los haploides FGSC A 593 (a) y FGSC A 594 (a) provenientes del *Fungal Genetics Stocks Center*, Atlanta. Esta cepa es heterocigótica para 4 marcadores recesivos del color de los conidios. Las mutaciones presentes en la cepa son las siguientes (entre paréntesis el grupo de ligamiento del haploide correspondiente): y A2 (Ia)= amarillo; w2A(IIb) = blanco; fwA2 (VIIIa) = amarillo-carmelita; cha(VIIIb) = verde chartré. La segregación espontánea o inducida de esos marcadores recesivos en estado homocigóticos en forma de sectores, bandas o puntos coloreados producto de una recombinación mitótica y la no-disyunción cromosómica, se hace fácilmente distinguible por simple inspección ocular sobre un fondo de conidiación correspondiente a la cepa salvaje (verde-amarillo). El medio de cultivo empleado fue el medio completo (MC).<sup>25</sup>

Los ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad se ejecutaron por el método de incorporación en placa, el cual permite una *exposición crónica* del compuesto con el micelio en crecimiento.<sup>26</sup>

El extracto fluido de la planta se añadió al medio completo licuado a 45 °C. Se sembraron conidios del *Aspergillus nidulans* D-30 en punto al centro de la placa a razón de una colonia por placa y se incubó a 37 °C durante 72 h.<sup>27</sup> Al cabo de ese tiempo se procedió a medir el diámetro de las colonias. Como criterio de citotoxicidad (% IT), se consideró la reducción del diámetro de las colonias en por ciento, comparado con el control negativo (solvente).<sup>26</sup> Para el ensayo de genotoxicidad se sembraron 15 placas con conidios al centro de la placa con MC y se incubaron a 30 °C durante 6-10 d, evaluándose el efecto genotóxico en términos de la Frecuencia de Sectores Segregantes de color de los conidios por colonias (FSC), observada para cada concentración ensayada y el Índice de Segregación Mitótica Inducida (ISMI), el cual representa el incremento de la FSC de los tratamientos con respecto al control negativo.<sup>26,28</sup> El experimento se repitió 3 veces.

Se ensayaron concentraciones hasta 1,80 mg de sólidos totales/mL, porque a partir de ese valor se producen cambios morfológicos en la conidiación y color de los conidios que pueden impedir la visualización y conteo de los sectores segregantes.

El control negativo fue el etanol al 61,30 % (v/v) a una concentración final presente en la máxima concentración ensayada (0,84 %). El control positivo utilizado fue metilmetanosulfonato (MMS) 2,4 mM.

Para el análisis estadístico los datos primarios (FSC) se normalizaron mediante la fórmula  $\sqrt{(x+0,5)}$ , posteriormente se aplicó un Anova de clasificación simple. Para la comparación del control negativo y espontáneo, se empleó el estadígrafo *Student*. Los datos fueron procesados utilizando el paquete estadístico MICROSTAT.

## ENSAYO DE INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS

Se emplearon ratones albinos de la línea no isogénica Suizo procedentes del Laboratorio de Control Biológico del CIDEM, con un peso promedio de  $26,30 \pm 3,0$  g. Previo al experimento, los animales se sometieron a un período de adaptación de una semana en el bioterio de la Facultad de Medicina "Dr. Salvador Allende" del ISCM-H.

La alimentación consistió en ratonina peletizada y agua sin restricción.

Se preparó un esquema de trabajo de 5 grupos experimentales de 10 animales: 5 machos y 5 hembras, un control negativo (etanol al 61,30 %), un control positivo (ciclofosfamida, 20 mg/kg pc en dosis única, 24 h antes del sacrificio), un control espontáneo (animales no tratados) y 3 dosis.

Los animales se escogieron al azar separándose en jaulas independientes. La administración del extracto fluido del caisimón de anís fue por vía oral a razón de 10 mL/kg de pc. Las dosis se seleccionaron sobre la base de la  $DL_{50}$  del producto, correspondiendo un valor 1 801 mg/kg pc (Tillán, J, Laboratorio de Control Biológico del CIDEM) y como máximo una dosis equivalente al 80-50 % de la  $DL_{50}$ .<sup>29</sup> El resto de las dosis correspondieron al 50 % y 25 % de la dosis máxima.

El esquema de tratamiento consistió en 2 administraciones separadas por un intervalo de 24 h y sacrificio por dislocación cervical 24 h después de la última aplicación y se procedió a la extracción seguidamente de ambos fémures.<sup>30,31</sup>

Las muestras de médula ósea se recogieron en suero bovino libre de calostro (LABIOFARM) previamente inactivado a 56 °C por 2 h, se fijaron con etanol al 95 % durante 5 min y se secaron al aire por 24 h. Finalmente se tiñeron con Giemsa (CLIND-D, Empresa de Producción de Biológicos C.J. Finlay) al 5 % v/v en agua corriente durante 20 min.<sup>32</sup>

Se contaron al menos 2 000 eritrocitos prolicromáticos (PCE) por animal (unidad experimental) y además los eritrocitos normocromáticos (NCE) presentes por cada 250 PCE y la incidencia de micronúcleos se registró en 2 000 PCE/animal.<sup>32</sup>

Para el análisis estadístico se normalizaron los valores de la relación PCE/NCE y el % mPCE (eritrocitos policromáticos micronucleados) mediante la fórmula  $\sqrt{(x+1)}$ .

Los datos transformados se procesaron mediante un Anova de clasificación doble, empleando un paquete estadístico MICROSTAT. Las comparaciones individuales entre los controles y tratamientos se realizaron empleando el estadígrafo de *Students*, y la prueba de *Dunnett*. La existencia de una posible relación dosis-efecto se verificó empleando la prueba de *Cochran-Armitage*.<sup>33,34</sup>

## RESULTADOS

### ENSAYO DE AMES

En la tabla 1 se muestran los resultados del ensayo de *Ames* frente al extracto seco de *Piper auritum* H.K.B. Como puede observarse no existe un efecto citotóxico al no presentarse una disminución en el número de colonias revertantes en dependencia de las concentraciones estudiadas, y la visualización del césped característico de las cepas de *Salmonella typhimurium*. Tampoco se observó efecto genotóxico, al no presentarse un incremento significativo dosis dependiente en el número de colonias revertantes por placa para ninguna de las cepas de *Salmonella* ensayadas, ni concentración que duplique la frecuencia de reversión del control negativo (DMSO), para concentraciones límites de 5 000 µg/placa, valor máximo de exposición en este ensayo aceptado por las regulaciones internacionales cuando hay toxicidad o que la sustancia ensayada sea insoluble.

TABLA 1. Resultados del ensayo de Ames frente al crudo de *Piper auritum* H.K.B.

Concentración µg/placa	Colonias revertantes/placa ± DS			
	TA-98 (-S9)	TA-98 (+S9)	TA-100 (-S9)	TA-100 (+S9)
0 <sup>a</sup>	29 ± 4,72	33 ± 2,52	145 ± 3,37	147 ± 3,00
50	31 ± 5,03	36 ± 2,00	116 ± 2,65	150 ± 7,23
150	36 ± 3,54	41 ± 4,58	119 ± 6,65	125 ± 5,09
500	31 ± 0,00	34 ± 4,58	98 ± 16,50	133 ± 6,02
1500	20 ± 1,00	30 ± 4,04	131 ± 12,50	137 ± 6,08
5000	21 ± 5,50	30 ± 4,73	142 ± 22,47	121 ± 5,68
Control positivo <sup>2</sup>	949 ± 326,24	3 253 ± 605,75	747 ± 276,74	2 346 ± 33,0

  

Concentración µg/placa	Colonias revertantes/placa ± DS	
	TA-1535 (-S9)	TA-1535 (-S9)
0 <sup>a</sup>	28 ± 4,50	34 ± 1,29
50	30 ± 1,41	33 ± 2,38
150	33 ± 2,38	28 ± 1,73
500	27 ± 4,96	29 ± 3,87
1500	31 ± 5,45	32 ± 5,25
5000	22 ± 5,80	31 ± 6,48
Control positivo <sup>b</sup>	319 ± 9,88	292 ± 67,71

  

Concentración µg/placa	Colonias revertantes placa ± DS	
	TA-1537 (-S9)	TA-1537 (-S9)
0 <sup>a</sup>	5 ± 2,00	11 ± 2,08
500	7 ± 1,16	11 ± 3,60
100	7 ± 3,60	10 ± 3,22
1500	7 ± 2,00	12 ± 1,73
2500	7 ± 2,00	13 ± 1,73
5000	± 0,58	9 ± 4,04
Control positivo <sup>b</sup>	36 ± 8,14	51 ± 15,04

a Control negativo: Dimetilsulfóxido (DMS)

b Control positivo: TA-1535 (S9) óxido de sodio, 1,5 µg/placa; (+S9) ciclofosfamida, 500 µg/placa.  
 TA-1537 (-S9) ICR-170, 100 µg/placa; (+S9) 2-aminofluoreno, 10 µg/placa.  
 TA-98 (-S9) ácido picrolónico, 100 µg/placa; (+S9) 2-aminofluoreno, 10 µg/placa.  
 TA-100 (-S9) óxido de sodio, 1,5 µg/placa; (+S9), 2-aminofluoreno, 10 µg/placa.

El valor crítico de  $I_{\alpha,0,01} = 3,42$  (Dunnett de una cola).

## ENSAYO DE SEGREGACIÓN SOMÁTICA

En la tabla 2 se puede apreciar que el extracto fluido de la planta estudiada resultó moderadamente citotóxico para el hongo *Aspergillus nidulans* D-30, alcanzándose un 26,19 % de inhibición del crecimiento lineal (IT) de las colonias a las 72 h cuando se trabaja a concentraciones de 1,82 mg/mL de sólidos

totales. Sin embargo, no se observaron incrementos significativos en la FSC respecto al control negativo ( $p=0,979$ ). Tampoco se observó una duplicación del ISMI en relación al mismo control. El análisis de regresión lineal no muestra ninguna relación dosis-efecto entre las concentraciones y la FSC ( $p=0,438$ ). Tampoco se observó diferencias significativas entre el control negativo y el espontáneo ( $p=0,147$ ).

TABLA 2. Resultados de la segregación somática en el hongo *Aspergillus nidulans* D-30 frente al extracto fluido de *Piper auritum* H.K.B.

Concentración mg/mL	Colonias	Toxicidad <sup>a</sup> (IT %)	Colonias	Sectores segregantes	Genotoxicidad FSC + DS	ISMI
Etanol 0,84 % <sup>b</sup>	12	-	45	79	1,75± 1,01	1,00
No tratadas	12	-2,38	44	76	1,72± 1,06	0,98
0,06	12	2,38	45	75	1,66± 1,33	0,95
0,11	12	4,76	45	77	1,71± 1,23	0,98
0,30	12	4,76	44	73	1,65± 1,18	0,94
0,50	12	7,14	45	70	1,60± 1,33	0,91
0,80	12	11,90	45	75	1,69± 1,33	0,97
1,11	12	14,90	43	71	1,65± 1,38	0,94
1,80	12	26,19	45	82	1,82± 1,09	1,04
MMS 2.4 Mm <sup>c</sup>	12	38,09	45	346	7,70± 3,41	4,40**

<sup>a</sup> Reducción del diámetro de las colonias a las 72 horas de incubación respecto al control negativo; <sup>b</sup> control negativo;

<sup>c</sup> control positivo (o metilmetanosulfonato); \*\* p<0,01.

Regresión lineal: Y=FSC (0,0350) + 1,6783 f=0,3212

p=0,438 \*\*p<0,01

## ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

En las tablas 3 y 4 se demuestran los resultados obtenidos en el ensayo de inducción de micronúcleos para el extracto fluido de *Piper auritum* H.K.B. Como puede observarse no existe ninguna alteración en el índice de citotoxicidad medular dado por la relación PCE/NCE en cuanto a sexo (p=0,493) y dosis (p=0,459).

Para el indicador de efecto genotóxico (% mPCE), no se obtuvieron resultados significativos ni para el sexo (p=0,694) ni para las dosis (p=0,233). La prueba de *Cochran-Armitage*, no mostró una relación dosis-dependiente lineal en el rango de dosis ensayadas (p=0,257 machos; p=0,417 hembras). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre el control negativo y los animales no tratados, en relación con los valores de la relación PCE/NCE y el %mPCE (p=0,186; p=0,407, respectivamente).

TABLA 3. Resultados del ensayo de inducción de micronúcleos en ratones machos tratados con un extracto fluido de *Piper auritum* H.K.B.

Tratamiento	Animales	PCE/NCE±D.S <sup>a</sup> (IT)	PCE analizado	mPCE	% m PCE»D.S <sup>b</sup>
Controles					
Etanol 61,3 % <sup>c</sup>	5	1,39 + 0,06	10000	18	0,18 +0,06
No tratados	5	1,35 ± 0,07	10000	19	0,19 ±0,10
Ciclofosfamida <sup>d</sup>	5	0,67 + 0,08**	10000	195	1,97 + 0,23**
20 mg/kg/pc					
Dosis mg/kg/pc					
<i>Piper auritum</i>					
H.K.B.					
283,00	5	1,31 + 0,05	10000	14	0,16+0,08
567,20	5	1,41 ± 0,09	10000	21	0,21±0,05
1134,63	5	1,41 + 0,04	10000	20	0,20+0,08
					P <sub>CA</sub> =0,257 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> IT (PCE/NCE) índice de citotoxicidad; <sup>b</sup> % de eritrocitos policromáticos micronucleados; <sup>c</sup> control negativo; <sup>d</sup> control positivo; <sup>e</sup> valor de P para la regresión *Cochran-Armitage*.

\* p<0,05; \*\*p<0,01.

TABLA 4. Resultados del ensayo de inducción de micronúcleos en ratones hembras tratados con un extracto fluido de *Piper auritum* H.K.B.

Tratamiento (IT)	Animales	PCE/NCE + D.S. <sup>a</sup>	PCE analizado	mPCE	% m PCE + D.S. <sup>b</sup>
Controles					
Etanol 61,3 % <sup>c</sup>	5	1,36±0,09	10000	20	0,20±0,06
No tratados	5	1,38±0,02	10000	18	0,18±0,05
Ciclofosfamida <sup>d</sup> 20 mg/kg/pc Dosis mg/kg/pc	5	0,67±0,08**	10000	220	2,22±0,63**
<i>Piper auritum</i> H.K.B.					
283,00	5	1,41±0,09	10000	16	0,16±0,04
567,20	5	1,43±0,07	10000	19	0,19±0,06
1134,63 P <sub>CA</sub> =0,415 <sup>e</sup>	5	1,38±0,02	10000	20	0,20±0,04

<sup>a</sup> IT (PCE/NCE) índice de citotoxicidad; <sup>b</sup> % de eritrocitos policromáticos micronucleados; <sup>c</sup> control negativo; <sup>d</sup> control positivo; <sup>e</sup> valor de P para la regresión *Cochran-Armitage*.

\* P<0,05, \*\*p<0,01

## DISCUSIÓN

μ En el ensayo *in vitro* empleando la batería de cepas de *Salmonella typhimurium* no se detectó ningún efecto citotóxico ni genotóxico en nuestras condiciones de ensayos. No obstante se debe señalar que entre los componentes químicos reportados en la literatura para el caisimón de anís, se encuentra el safrol, sustancia débilmente hepatocarcinógena en ratas y ratones y reportada negativa en el ensayo de *Ames*, pero positiva en varios sistemas genotóxicos utilizando células de mamíferos, tales como aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas en líneas de *Hamster* chino.<sup>35</sup> Los estudios realizados por estos autores se llevaron a cabo empleando el safrol en estado puro y por tanto los resultados obtenidos son muy evidentes. Sin embargo, *Wislocki*<sup>36</sup> y *Swanson*<sup>37</sup> reportan que los metabolitos del safrol, el 1-hidroxilsafrol y el 1-acetoxisafrol producto de la acción enzimática del hígado de rata (fase I de biotransformación) induce una respuesta positiva en el ensayo de *Ames*. Los resultados de este trabajo no concuerdan con los reportados por dichos autores aún trabajando a concentraciones de 5 μg/placa del crudo del caisimón de anís para esta prueba en células procarióticas.

Cuando se emplea la cepa diploide *Aspergillus nidulans* D-30 se puede observar una citotoxicidad moderada a concentraciones de 1,80 mg/mL de sólidos totales atribuida a los componentes del extracto fluido de la planta y no al etanol, pues éste se encuentra a una concentración final de 0,84 % (v/v), valor permisible para este ensayo. A dosis mayores se produjo un incremento escaso del micelio con un aclaramiento en la conidiación. Esta citotoxicidad no parece estar asociada con efectos adversos al material hereditario del organismo eucariótico empleado, sino a otros blancos celulares

de importancia y relacionado con el complejo proceso de diferenciación celular que conducen al crecimiento y desarrollo micelial, pues no se observaron modificaciones en la FSC. Esto ha sido bien fundamentado en el caso de otros compuestos con actividad antifúngica (cicloheximida, nistatín, carboxín, etc.), que influyen en el crecimiento y no afectan el material hereditario.<sup>38</sup>

Se reportan 2 resultados empleando el mismo modelo biológico, donde se evaluó un extracto acuoso de caisimón de anís hasta una concentración de 400 mg/mL de sólidos totales con resultados negativos (De la Torre, et al. 1993. Informe de resultados de investigación. Laboratorio Central de Farmacología. ISM-CH. "Dr. Salvador Allende") y un extracto fluido de la planta con un contenido etanólico de un 45 % con resultados positivos hasta una concentración de 1,94 mg/mL de sólidos totales (Blanco, N. 1996. Evaluación tóxica y genotóxica de los extractos fluidos de *Ocimum gratissimum* L. y *Piper auritum* H.K.B. Trabajo de Terminación de Residencia. ISM-CH. "Dr. Salvador Allende").

Se sustentan los resultados obtenidos, partiendo del criterio de que en el extracto fluido de caisimón de anís analizado no están presentes la sustancia o sustancias inductoras de efectos mutagénicos o que las mismas se encuentran en concentraciones tales que no puedan provocar un daño puntual, un corrimiento del marco lectura de los nucleótidos del ADN o un daño primario de dicha molécula en los modelos *in vitro* empleados.

La ausencia de mutagenicidad *in vitro* pudiera deberse a las características fisicoquímicas de los fitofármacos, así como a la variedad, condiciones de cultivo, clima y factores agronómicos asociados al crecimiento de la planta, los cuales pueden influir considerablemente en los procesos biosintéticos de sus metabolitos y que una o varias sustancias determinadas pueden estar presentes o no al variar esos

parámetros.<sup>39</sup> Pero además, estos preparados constituyen mezclas complejas en las que se pueden encontrar compuestos con actividad antimutagénica, como la clorofila, eugenol, monoterpenos, etc. los cuales pueden debilitar o inhibir el efecto genotóxico potencial.<sup>40</sup>

Tampoco en el ensayo *in vivo* de inducción de micronúcleos se observó una respuesta positiva. Al respecto, se sabe que el mamífero posee los sistemas detoxificadores enzimáticos (fase II) presentes en el tracto gastrointestinal, hígado y pulmones, responsables de la inactivación de sustancias genotóxicas en muchos casos.<sup>41</sup>

## CONCLUSIONES

En las condiciones de ensayos descritas, el extracto fluido con un menstruo etanólico al 70 % de *Piper auritum* H.K.B. no presentó actividad genotóxica ya que:

- No se observó un incremento significativo concentración-dependiente en el conteo de colonias revertantes por placa en el ensayo de *Ames*.
- El extracto fluido resultó moderadamente citotóxico frente al hongo *Aspergillus nidulans* D-30 en el ensayo de segregación somática. No indujo un incremento significativo en la frecuencia de sectores por colonias en las concentraciones estudiadas, ni una relación dosis-efecto.
- No se comprobó en el ensayo *in vivo* de micronúcleos un aumento significativo en la relación PCE/NCE, ni un efecto dosis-dependiente en la frecuencia de PCE micronucleados.
- Se debe cuantificar el contenido de safrol en el extracto fluido y evaluar el mismo en otros sistemas de ensayos *in vitro* e *in vivo*.
- Valorar su empleo terapéutico, si se tiene presente la posibilidad de que el extracto pueda contener un compuesto reportado moderadamente hepatocarcinógeno (safrol).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Luz SH, Au WW, Heo MY, Morris DL, Legator MS. Evaluation of the genotoxic effect of a folk medicine. *Pteris alliacea* (Anamú). *Mutat Res* 1992;280:29-34.
2. Da Fonseca CA, Leal J, Costa S, Leitao A. Genotoxic and mutagenic effects of guarana (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. *Mutat Res* 1994;341:105-173.
3. Madrigal-Bujaidar E, Barriga DS, Mota P, Guzmán R, Cassani M. Sister chromatid exchange induced in vitro and in vivo by extract of Black pepper. *Food Chem Toxicol* 1997;35:567-71.
4. Vizoso A, Ramos A, Villaescusa A, Décalo M, Betancourt J. Estudio genotóxico in vitro e in vivo en tinturas de *Melissa officinalis* L. y *Mentha piperita* L. *Rev Plant Med* 1997;2:6-15.
5. Roig JT. Plantas medicinales aromáticas o venenosas de Cuba. 5 ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1988:133-4,262-3.
6. Brower CH. Plants used for reproductive health in Oaxaca. México. *Econ Botanic* 1985;39:482-504.
7. Domínguez XA, Rojas P, Carza MD, Córdova JA. Preliminary study of 20 plants from the central territory of Quintana Roo, México. *Rev. Quím Mex* 1962;6:213-15.
8. Castro C, Poveda A. *Piper auritum* H.K.B., Piperaceae family preliminary study of essential oil from its leaves. *Ing. Cienc Quim* 1983;7:24-5.
9. Gupta MD, Arias TD, Williams MH, Bos R, Tattaje DH. Safrole: the main component of essential oil from *Piper auritum* H.K.B. of Panamá. *J Nat Prod* 1985;48:330-43.
10. Maja JG, Goeldi MD, Green CL, Milchard MJ. New source of natural safrole. *Perfums Flavorist* 1993;18:19-22.
11. Hansel R, Leuschke A, Gomez-Pompa A. Aparphenc-type alkaloides from *Piper auritum*. *Lerydia* 1975;38:529.
12. Nair MG, Sommerville J, Burke SA. Phenyl propanoids from *Piper auritum*. *Phytochemistry* 1989;28:624-53.
13. Misas CA, Hernández MN, Abraham AM. Contribution to the biological evaluation of Cuban plants. *Rev Cubana Med Trop* 1979;31:5-12.
14. Rahalinson L, Hamburger M, Hostetiman K, Monod M, Frenk E., Gupta MP, et al. Screening for antifungal activity of Panamanian plants. *Int J Pharmacognosy* 1993;31:68-76.
15. Feng PC, Haynes LJ, Magnus KE, Plinner JR, Sherrat HS. Pharmacological screening of some West Indian medical plants. *J Pharmacol* 1993;14:556-61.
16. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res* 1983;113:173-215.
17. Marzini D. Biological testing of material and medicinal devices. *En: Regulatory Affairs* 1992;4:33-44.
18. Käfer E, Scott B, Kappas A. Systems and results of test for chemical induction of mitotic malsegregation and aneuploidy in *Aspergillus nidulans*. *Mutat Res* 1986;67:9-34.
19. Garriot ML, Piper CE, Kokino AJ. A simplified protocol for the mouse bone marrow micronucleus assays. *J Appl Toxicol* 1988;8:141.
20. Soler B, Méndez G, García M, Miranda M. Normas Ramalcs. Medicamentos de origen vegetal. Tinturas y Extractos Fluidos. 1992. MINSAP. Ciudad de La Habana:1-13.
21. Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, Matsushima T, et al. Report from the working group on bacterial mutation assays: International Workshop on Standardization of Genotoxicity by test Procedures. *Mutat Res* 1994;312:217-33.
22. Matsushima T, Sawamura M, Hara K, Sugimura T. A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system. In: de Serres, F.J, Fout, J.R., Bend, J.R., Philpot, R.M. Eds. *In vitro* metabolic activation in mutagenesis testing. Amsterdam, Elsevier 1976:85-8.
23. Mahon G, Middleton B, Robinson W, Gree M, Mitchell. Analysis of data from microbial colony assays. En: Kirland DJ ed. *Statistical evaluation of mutagenic test data*. Cambridge: Cambridge University, 1989:27-65.
24. Kafer E. Test which distinguish induced crossin-over and aneuploidy from secondary segregation in *Aspergillus nidulans* treated with chloral hydrated and gamma rays. *Mutat Res* 1986;164:145-66.
25. Scott BR, Käfer E. *Aspergillus nidulans*: an organism for detecting a range of genetic damage. En: De Sorres FJ, Hollander A, Eds. *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection*. New York: Plenum, 1982:447-9.
26. Kappas A. On the mechanisms of induced somatic recombination by certain fungicides in *Aspergillus nidulans*. *Mutat Res* 1978;31:189-97.
27. Tzoneva M, Kappas A, Gorgeva W, Vaskova R, Tziolals V. On the genotoxic of pesticides Endolan and Kilocar in 9 different test systems. *Mutat Res* 1985; 157:13.
28. Torre RA de la, Rúa R de la, Hernández G, Espinosa J, Cortinas de Nava C. Genotoxic effect of niclosamida in *Aspergillus nidulans*. *Mutat Res* 1989;222:337-41.
29. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romayana F, Shelby MD, Turcker JD, et al. Micronuclei as an Index of citogenetic damage past, present and future. *Environ Mol Mutagen* 1991;18:277-91.
30. Mayournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle J. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of USA EPA Gene Tox Program *Mutat Res* 1990;239:29-30.

31. Llayashi M, Tice RR, MacGregor JT, Anderson D, Blakey D.II. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res* 1994;312:293-304.
32. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. En: Hollander A, Ed, *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection*. New York: Plenum, 1976:31-53.
33. Sigarroa A. *Biometría y diseño de experimento. Primera parte*. La Habana: Ministerio de Educación Superior. 1985:276-337.
34. Lovell DP, Albanese R, Clare G, Richold M, Savage JR, et al. Statistical analysis in vivo cytogenetic assays. En: Kirlan DL, Ed *Statistical evaluation of mutagenicity test data*. Cambridge: Cambridge University, 1989:184-230.
35. Hirohiko D, Shigeki S, Shoji A, Fumio S. Analysis of cytogenetics effects an DNA adduct formation induced by safrol in Chinese Hamster lung cells. *Tertog Carcin and Mutagen* 1997;17:7-18.
36. Wislocki P, Boschet P, Miller JA, Miller EC. The metabolic activation of carcinogen 1-hydroxyssafrole in vivo and the electrophilic reactivities of possible ultimate carcinogens. *Cancer Res* 1976;36:686-95.
37. Swanson AB, Chanblis DD, Blomquest JC, Miller JA. The mutagenicities of safrol, estragole, eugenol, trans-anethole and some of their know or possible metabolites for Salmonella typhimurium mutants. *Mutat Res* 1979;60:143.
38. Georgopoulos SG, Kappas A, Hastie AC. Induced sectoring in diploid *Aspergillus nidulans* as criterion of fungitoxicity by interference with hereditary processes. *Phytopathology* 1976;103:79-129.
39. Dorette TH, Verhoeven HV, Goldbohm AP, Brant van den Pict a Poppel van G. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem Biol Interac* 1997; 103:79-129.
40. Rompelberg CJM, Stenhuis WH, Vogel de N, Osenbruggen van WA, Schouten A, Vehagen H. Antimutagenicity of eugenol in the rodent bone marrow micronucleus test. *Mutat Res* 1995;346:69-75.
41. Ashby J. The unique role of rodents in the detection of possible human carcinogen and mutagen. *Mutat Res* 1983;140:71-4.

Recibido: 10 de diciembre de 1998. Aprobado: 3 de marzo de 1999.  
 Lic. Angel Vizoso Parra. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave. 26 No. 1605 entre Cerro y Boyeros, Plaza. Ciudad de La Habana. CP 10600. Teléfono (537)810818, 810830 Fax (537)33556. E-mail:cjdem@infomed, sld.cu.