

ARTÍCULOS ORIGINALES

Facultad de Ciencias Médicas "Dr. Salvador Allende". Laboratorio Central de Farmacología

AUSENCIA DE ACTIVIDAD GENOTÓXICA DEL EXTRACTO FLUIDO DE *PSIDIUM GUAJAVA* L. (GUAYABA). EVALUADA EN UN SISTEMA DE ENSAYO EN *ASPERGILLUS NIDULANS*

Dr. José Betancourt Badell¹, Dr. Alberto Ramos Ruiz,² Lic. Ángel Vizoso Parra,² Lic. María Julia Martínez Guerra² y Lic. Marisol López Barreiro³

Resumen

Se procedió a evaluar la posible actividad genotóxica del extracto fluido de *Psidium guajava* L. (guayaba), planta medicinal que crece en Cuba y es utilizada ampliamente por la población en el tratamiento de varias enfermedades. Para ello se empleó un sistema de ensayo a corto plazo que utiliza el hongo ascomiceto *Aspergillus nidulans* como microorganismo de prueba. Se pudo comprobar que el extracto fluido estudiado no presenta actividad genotóxica en el sistema evaluado: inducción de segregación somática en diploides heterocigóticos. Estos resultados contribuyen a avalar experimentalmente la inocuidad de esta planta, a fin de ratificar su uso en la medicina tradicional.

Descriptores DeCS: PLANTAS MEDICINALES; ASPERGILLUS NIDULANS; MEDICINA TRADICIONAL; TESTS DE MUTAGENICIDAD.

Summary

Authors assessed possible genotoxic activity of fluid extract from *Psidium guajava* L. (Guayaba). This is a plant growing in Cuba and is very used by people in treatment of some diseases. A short-term trial system using *Ascomycetes fungi* (*Aspergillus nidulans* as test microorganism). We confirmed that fluid extract studied hasn't genotoxic activity in system assessed: induction of somatic segregation in heterocygous diploids. These results allow us experitally guarantee safety of this plant to ratify its use on folk medicine.

Subject headings: PLANTS, MEDICINAL; ASPERGILLUS NIDULANS; MEDICINE TRADITIONAL; MUTAGENICITY TESTS.

La especie *Psidium guajava* L., conocida comúnmente como guayaba, pertenece a la familia *Mistáceas*, originaria de América Tropical,¹ no hay otra especie más propagada en Cuba.²

En la medicina tradicional de diferentes países se reporta el uso del fruto y las hojas para tratar diarreas.^{1,3-8}

Los estudios farmacológicos con decocciones de la planta han demostrado una actividad antibacteriana *in vitro* sobre *E. coli* y *S. aureus*. El defecto antidiarreico del extracto

fluido de las hojas ha sido comprobado experimentalmente.⁸ Por ello se hace necesario, antes de su introducción en la terapéutica, evaluar los posibles efectos tóxicos y genotóxicos de esta planta.

Este trabajo se propuso evaluar la actividad tóxica y genotóxica de un extracto fluido de la planta medicinal *Psidium guajava* L. (guayaba), se empleó un sistema de ensayo con *Aspergillus nidulans* y con ello se pensó contribuir al estudio sobre su uso por la población.

¹ Profesor Asistente.

² Profesor Instructor. Investigador Agregado.

³ Aspirante a Investigador.

Métodos

MATERIAL VEGETAL

Se utilizó el extracto fluido de hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba), preparado con etanol al 40 % por el Instituto de Farmacia y Alimentos conservándose en refrigeración hasta su uso.

MEDIOS DE CULTIVO

Para el ensayo se utilizó medio completo para *Aspergillus nidulans* de acuerdo con lo descrito por Scott y Käfer.⁹

CEPAS

Se utilizó la cepa *Aspergillus nidulans* UH-223. Esta cepa fue obtenida a partir de las cepas haploides 593 (a) y 594 (b), procedentes del FSGC (*Fungal Stock Genetics Center*, USA). Es una cepa diploide heterocigótica para varios marcadores auxotróficos, de resistencia y el color de los conidios. En cuanto a estos últimos, son marcadores recesivos ubicados en diferentes cromosomas: y A1(I) amarillo; wA2 (VIII), blanco, fwA2 (VIII), amarillo-carmelita; y chaA1 (VIII), verde-chartré. En estado heterogótico las colonias son de color verde-amarillento (fenotipo salvaje).¹⁰ Al crecer en presencia del compuesto ensayado, si ocurre algún evento de segregación somática, los segregantes que resultan para alguno de estos cromosomas aparecerán como sectores del color correspondiente.

ENSAYO DE TOXICIDAD

Para el estudio de toxicidad se empleó el método de inclusión en plata. Se sembraron 4 placas para cada tratamiento a razón de una colonia por placa sembrada "en punto" en el centro de la misma. Las placas se encubieron durante 72 h a 37 °C. Se hicieron 3 réplicas del experimento.

La toxicidad del extracto de la planta se determinó a través de la reducción, en por ciento, del diámetro de las colonias tratadas con respecto a las no tratadas a las 72 h de inoculado el medio completo con las diferentes concentraciones del compuesto en estudio. Este valor se conoce como *Índice de Toxicidad* (IT) y como criterio de toxicidad se tomó el descrito por Kappas.¹¹

IT = 1-15 % Toxicidad baja.

IT = 16-30 % Toxicidad media.

IT = 30 % Toxicidad alta.

Además de evaluar la toxicidad se consideró la morfología de la colonia y el color y aspecto de la conidiación, rechazando aquellas concentraciones que afectarán la visualización de los sectores segregantes.

ENSAYO DE GENOTOXICIDAD

Se llevó a cabo el *test* de inducción de segregación somática, para estos estudios se probaron 6 concentraciones del extracto de *Psidium guajava* L. (guayaba). El ensayo se realizó de manera similar al de toxicidad, pero las colonias se sembraron "en punto" a razón de 5 colonias por placas, dispuestas radialmente, con una en el centro. Las placas se encubieron durante 6 d a 37 °C (De la Torre, RA: Determinación de actividad genotóxica con *Aspergillus nidulans*. Tesis en opción al grado científico de Candidato a Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de La Habana, Facultad de Biología, 1989). El experimento se repitió 2 veces.

La genotoxicidad se evaluó realizando el conteo a sectores de conidios de color diferente al de la cepa salvaje y comparando las colonias tratadas con las colonias del control negativo.¹¹ Para cada dosis se calculó la frecuencia de sectores por colonias (FSC), dividiendo el total de sectores segregantes entre el número de colonias evaluadas.

El índice de segregación mitótica (ISMI) se define como la razón entre la frecuencia de sectores por colonia (FSC) para cada una de las dosis ensayadas respecto a la obtenida en el caso del control negativo. Se considera que un incremento de más de 2 veces en el valor del índice es indicativo de actividad genotóxica del compuesto estudiado.¹²

CONTROLES

El control negativo empleado fue etanol al 0,32 % (v/v). El control positivo utilizado fue el hidrato de cloral (6 mM).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los experimentos de genotoxicidad los datos primarios se procesaron introduciendo la transformación de (x +0,5) donde x es el número de sectores coloreados observados en la colonia. A continuación, con los valores de las variables ya corregidos, se realizó un análisis de varianza simple de las FSC obtenidos para las diferentes concentraciones ensayadas del extracto vegetal y los controles empleados.

La significación de las diferencias encontradas respecto al control negativo se evaluó a través del *test de Dunnet* de 2 colas, mediante un programa estadístico confeccionado al respecto.¹³

Resultados

ESTUDIOS DE TOXICIDAD

En la tabla 1, se muestran los resultados del estudio de toxicidad del extracto fluido de *Psidium guajava* L. (gua-

yaba) sobre la cepa de *Aspergillus nidulans* UH-223, puede observarse que para ninguna de las concentraciones utilizadas el extracto resultó tóxico ya que el índice de toxicidad siempre estuvo en el rango de no tóxico según el criterio de Kappas.¹¹ El hidrato de cloral, como es conocido,⁹ provocó un efecto altamente tóxico.

TABLA 1. Toxicidad del Extracto Fluido de *Psidium guajava* L (guayaba) en la cepa de *Aspergillus nidulans* UH-223

Concentración (mg/mL) (a)	Número de colonias	Diámetro (mm)(b)	Ind. Toxic. (%) (c)
Etanol (d) (0,32 %)	8	42,0	0
0,107	8	41,0	2,38
0,214	8	40,5	3,57
0,428	8	41,0	2,30
0,642	8	39,0	7,14
0,856	8	37,0	11,90
H. Cloral (e) (0,6 mM)	8	11,58	72,6

(a) mg de sólidos totales/mL de medio de cultivo.

(b) Diámetro de las colonias tras 72 h de incubación a 37 °C.

(c) Índice de toxicidad (reducción del diámetro de la colonia con respecto al control negativo).

(d) Control negativo.

(e) Control positivo.

ESTUDIOS DE GENOTOXICIDAD

En la tabla 2 se puede apreciar que no hay cambios en el índice de segregación mitótica (ISMI) para ninguna de las concentraciones de *Psidium guajava* L. (guayaba) utilizadas respecto al control negativo empleado, etanol 0,32 %, que a su vez está fuera del rango de mayor de 3 % para el cual el etanol ha sido reportado como genotóxico en este ensayo.¹⁰

TABLA 2. Genotoxicidad del extracto fluido de *Psidium guajava* L (guayaba). Inducción de segregación somática en la cepa *Aspergillus nidulans* UH-223

Concentración (mg/mL) (a)	Colonias Analizadas	Sectores segre. (b)	FSC (c)	ISMI (d)
Etanol (e) (0,32 %)	100	43	0,43	1,00
0,107	100	44	0,44	1,02
0,214	100	53	0,53	1,23
0,428	100	46	0,46	1,06
0,642	100	51	0,51	1,19
0,856	100	50	0,50	1,16
H. Cloral (f) (0,6 mM)	100	134	1,34	3,12

(a) mg de sólidos totales/mL de medio de cultivo.

(b) Número de sectores segregantes en las colonias tras 6 d de incubación a 37 °C.

(c) Frecuencia de sectores por colonia.

(d) Índice de segregación mitótica inducida: proporción de incremento de la FSC con respecto a la del control negativo.

(e) Control negativo.

(f) Control positivo.

Los resultados corresponden al promedio de 2 experimentos.

* Difiere del control negativo $p < 0,01$.

Discusión

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad tóxica del extracto fluido los estudios de genotoxicidad pudieron ser realizados en todo el rango de concentraciones.

En las condiciones de ensayo descritas el extracto de *Psidium guajava* L. no presentó efecto genotóxico. Se conoce un reporte de las hojas de esta planta evaluadas en el *Test de Ames*, en el cual se evidenció un efecto antimutagénico.¹⁴

1. El extracto fluido de *Psidium guajava* L. (guayaba) no resulta tóxico para el hongo *Aspergillus nidulans* hasta la concentración estudiada (0,856 mg/mL).
2. Dicho extracto no es genotóxico en el sistema de ensayo de inducción de segregación somática en *Aspergillus nidulans* hasta una concentración del 0,856 mg/mL.

Referencias bibliográficas

1. Robineau L. Hacia una farmacopea caribeña, Endocaribe, Santo Domingo, 1993; p. 28.
2. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana: Ciencia y Técnica, 1974; pp. 315-8.
3. Cáceres A, Cano A, Samayoa B, Aguila L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. J Ethnopharmacol 1990;30:55-73.
4. Cáceres A, Fletes L, Aguilar L, Ramírez O, Figueroa L, Taracena AM, et al. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders 3. Conformation of activity against enterobacteria of 16 plants. J Ethnopharmacol 1993;38(1):31-8.
5. Lozoya X, Aguilar A, Camacho J. Encuesta sobre el uso actual de plantas en la medicina tradicional mexicana. Rev Méd IMSS 1987;25:283-91.
6. Osuma L, Lozoya X. Plantas medicinales usadas por la medicina tradicional para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales infecciosas. Rev Méd ISMM 1989;27:305-11.
7. Ponce M, Navarro I, Martínez M, Álvarez R. In vitro effect against Giardia of 14 plants extracts. Res Invest Clin 1994;46(5):343-7.
8. Lutterdt BD. Inhibition of microlar-induced experimental diarrhoea with narcotic like extracts of *Psidium guajava* leaf in rate. J Ethnopharmacol 1992;37:151.
9. Scott BR, Kaafer R. *Aspergillus nidulans*: an organism for detecting a range of genetic damage. En: Hollander A, Serres FJ, eds. Chemicals mutagens. Principles y methods for their detection. New York: Plenum, 1982;vol 7:447-79.
10. Cluterbuch AJ. Loci and link age map of *Aspergillus nidulans*. En: Brien SJO, ed. Genetic maps. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982;vol 2:208-17.
11. Kappas A. Genetic activity of plant growth-regulating hormones in *Aspergillus nidulans*. Carcinogenesis 1982;1:1409.
12. Sigares A. Simetría y diseño experimental. La Habana: Editorial Pueblo y Educación, 1985;441-62.
13. Käfer E, Scott BR, Kappas A. Systems and results of test for chemical induction of mitotic mal agregation and *ansuploid* in *Aspergillus nidulans*. Mutat Res 1986;167:9-34.
14. Grover IS, Bala S. Studies on the antimutagenic effects of *grajava* in *Salmonella typhimurim*. Mutat Res 1993;300(1):1-3.

Recibido: 28 de febrero del 2000. Aprobado: 12 de septiembre del 2000.

Dr. José Betancourt Badell. Facultad de Ciencias Médicas "Dr. Salvador Allende". Carvajal s/n e/n A y Agua Dulce. Cerro. Ciudad de La Habana.