

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM).
Departamento de Investigaciones Microbiológicas

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENOTÓXICO DE UN EXTRACTO FLUIDO DE INCIENSO (*ARTEMISIA ABSINTHIUM* L.)

Lic. Janet Piloto Ferrer¹, Lic. Alberto Ramos Ruiz², Lic. Ángel Vizoso Parra³ y Lic. Arilia García López⁴

Resumen

Se procedió a evaluar la actividad mutagénica de un extracto fluido de *Artemisia absinthium* L. (incienso), preparado con un mensturo etanólico al 70 %. Se emplearon 2 pruebas: *test de Ames* e inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón. Para el ensayo de *Ames* los resultados fueron negativos en todas las cepas probadas de *Salmonella typhimurium*: TA 1535, TA 1537, TA 98 y TA 100, utilizando un protocolo de incorporación en placa y concentraciones hasta 5 mg/placa. En el ensayo de micronúcleos se hicieron 2 administraciones orales a razón de 10 mL/kg separadas 24 h, con sacrificio 24 h, después de la última aplicación. Las dosis fueron 500, 1 000 y 2 000 mg/kg. No se observaron variaciones en la relación entre eritrocitos policromáticos (PCE) y eritrocitos normocromáticos (NCE), indicador de toxicidad medular. Tampoco se encontraron alteraciones significativas en la frecuencia de PCE micronucleados entre los distintos grupos de tratamiento.

Descriptores DeCS: ARTEMISIA; TESTS DE MUTAGENICIDAD; SALMONELLA TYPHIMURIUM; MEDULA OSEA; RATONES.

Summary

We assessed mytagenic activity of a fluid extract from *Artemisia absinthium* L. (incense) prepared with an 70 % ethanol mensturo. Two test were used: Ames' test and micronuclei induction test in bone marrow of the mouse. In the former one, results were negatives in all strains of *Salmonella typhimurium* tested: TA 1535, TA 1537, TA 98, and TA 100, using a plate-incorporation protocol and concentrations up to 5 mg/plate. In micronuclei trial, two oral administration were made at a rate of 10 mL/kg 24 hours apart, sacrifice was performed 24 hours after the last application. Doses were of 500, 1 000, and 2 000 mg/kg. There weren't variations in relationship between polychromatic erythrocytes (PCE), and the normochromatic ones (NCE), indicator of medullary toxicity. Neither we found significant alterations in micronucleated PCE frequency amongst different groups of treatment.

Subject headings: ARTEMISIA; MUTAGENICITY TESTS; SALMONELLA TYPHIMURIUM; BONE MARROW; MICE.

Artemisia absinthium L de familia *Asteraceae*, conocida en Cuba como incienso, es una planta originaria del sur de Europa, que actualmente se cultiva en países tropicales y subtropicales de todo el mundo. Desde el punto de vista filogenético la taxonomía del género *Artemisia* ha sido estudiada por muchos autores y concuerdan en que *A. absinthium* es una de las especies más primitivas.¹ Se plantea que la sustancia activa es el aceite esencial (*oleum absinthii*) que en-

cierra tujona, absintina, ácidos orgánicos y taninos. También presenta un alto por ciento de *cis-epoxy-ocimene* y *transchrysanthenye acetate* pudiendo encontrarse químicamente mezclados.¹ Las hojas y los tallos se utilizan popularmente como antiparasitarios (antigiardiásicos, tenuífugos, etc.).²

Como parte de las investigaciones farmacológicas y toxicológicas auspiciadas por el Programa Nacional de

¹ Licenciada en Ciencias Biológicas.

² Licenciado en Bioquímica. Investigador Auxiliar.

³ Licenciada en Biología. Investigador Auxiliar.

⁴ Licenciada en Microbiología.

Plantas Medicinales, encaminado a fundamentar científicamente los usos tradicionales atribuidos a la flora cubana, se realizó un estudio para evaluar el potencial mutagénico de un extracto fluido de esta planta, preparado con un menstruo de alcohol al 70 %.

Para ello se usaron 2 ensayos: la prueba de *Ames*, que detecta mutaciones génicas y el *test* de micronúcleos, un ensayo ampliamente validado internacionalmente que evalúa daño genético causado por agentes clastogénicos y aneugénicos *in vivo*.

Métodos

MATERIAL VEGETAL

La planta se cultivó en la Estación Experimental de Plantas Medicinales “Dr. Juan Tomás Roig”. Se colectó en junio de 1998. Un ejemplar de la misma se conserva en el herbario de la institución con número ROIG (4640). El extracto fluido se preparó con el follaje de la planta, empleando alcohol al 70 % como menstruo.³ La fecha de elaboración fue 15 de julio de 1997. Las especificaciones del extracto recibido fueron las siguientes: Lote 1; 104 mg/mL de sólidos totales 62,72 % de etanol.

ENSAYO DE AMES

Se empleó una batería de 4 cepas de *Salmonella typhimurium*, recomendadas internacionalmente para esta prueba: TA 1535, TA 1537, TA 98 y TA 100, enviadas por el Dr. Bruce N. Ames (Universidad de California en Berkeley, US). Se empleó el método de sólidos totales/placa. El ensayo se realizó según protocolos bien estandarizados.⁴ Se probaron 5 concentraciones, sembrándose 3 placas por cada concentración en un experimento único. La prueba se realizó en presencia y ausencia de activación metabólica externa, provista por fracción S9 (4 %, concentración final) obtenida a partir de hígado de ratas tratadas con fenobarbital y 5,6 benzoflavona. Las placas se incubaron a 37 °C y se contaron las colonias revertantes a las 48 h. Los resultados se analizaron utilizando el programa SALANAL versión 1.0 de la EPA (Environmental Protection Agency, USA).

TEST DE MICRONÚCLEOS

El extracto fluido se evaporó a presión reducida para eliminar el etanol y el sólido resultante se resuspendió en etanol al 60 % a una concentración de 200 mg/mL. Se establecieron 8 grupos experimentales: control negativo (etanol al 60 %), control positivo (ciclofosfamida, 20 mg/kg en dosis única, 24 h antes del sacrificio) y 5 dosis de 250, 500, 1 000, 1 500 y 2 000 mg/kg.

Cada grupo contó con 10 animales, 5 de cada sexo. Se emplearon ratones suizos de la colonia del Laboratorio de Control Biológico del CIDEM, con 5 semanas de nacidos y un peso de 25 a 30 g. Estos se aclimataron durante 7 d en el bioterio de la Facultad de Medicina “Dr. Salvador Allende” y durante toda la experiencia recibieron pienso peletizado (Ratonina, CENPALAB) y agua *ad libitum*. El extracto se aplicó por vía oral a razón de 10 mL/kg, en 2 dosis separadas 24 h y se procedió al sacrificio 24 h después de la última aplicación. Para el sacrificio de los animales tratados con extracto se escogieron 3 grupos de acuerdo a la mortalidad observada en los mismos al cabo de 48 h de iniciada la experiencia (2 tratamientos). Como no hubo muertes en ninguna dosis, se seleccionó 2000 mg/kg como dosis tope y las de 1000 y 500 mg/kg como las restantes, que representan el 50 y el 25 % respectivamente de la dosis tope.⁵

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Las muestras de médula ósea se obtuvieron según lo establecido.⁶ Estas se fijaron con etanol al 95 % (v/v) durante 5 min y secaron al aire durante 24 h. Finalmente se tiñeron con Giemsa al 5 % (v/v) en buffer fosfato pH 6.8 durante 20 min aproximadamente.

Se contaron al menos 2000 eritrocitos policromáticos (PCE) por animal y además, los eritrocitos normocromáticos (NCE) presentes por 250 PCE para estimar la relación PCE/NCE, indicador de citotoxicidad medular.

Para el procesamiento estadístico de los datos, se normalizaron los valores de PCE/NCE y el % MNPCE (PCE micronucleados) para cada animal y se empleó la transformación $\sqrt{(x+1)}$. Después se procedió a realizar un análisis de varianza de 2 vías considerando sexo y tratamientos. Las comparaciones individuales se realizaron utilizando el *test* de *Duncan*.

Como criterios de genotoxicidad se asumieron: la existencia de incrementos significativos en la frecuencia de PCE micronucleados así como el que estos aumentos sean directamente relacionados con las dosis administradas (relación dosis-respuesta).

Resultados

Las tablas 1, 2, 3 y 4 resumen los resultados del ensayo de *Ames*. Como puede observarse, no hubo incremento dosis dependiente de la frecuencia de revertantes por colonia para ninguna de las cepas de *Salmonella* testadas, que es el indicador de mutagenicidad para esta prueba, para concentraciones de hasta 5 mg/placa, valor que se acepta como límite superior de exposición en ausencia de toxicidad o de problemas de solubilización.⁷

En el ensayo *in vivo* (*test* de micronúcleos), las tablas 5 y 6 muestran que no se observaron diferencias entre control y dosis para la relación PCE/NCE ni el valor de MNPCE/1000 PCE.

TABLA 1. Ensayo de Ames en la cepa TA 1535 de Salmonella typhimurium para el extracto fluido de Artemisia absinthium L.

Concentración (µg/placa)	TA1535	
	-S9	+S9
0	17,0 ± 4,0	16,0 ± 7,6
50	18,3 ± 11,7	11,0 ± 2,0
150	14,0 ± 1,0	19,7 ± 3,2
500	10,3 ± 0,6	12,0 ± 4,4
1500	11,0 ± 2,7	15,7 ± 1,5
5000	9,3 ± 3,8	12,3 ± 4,0
Control Positivo ¹	752,0 ± 149,8	1400,0 ± 40,0

¹ Controles positivos: -S9: ázida de sodio, 1,5 µg/placa +S9 ciclofosfamida, 500 µg/placa.

TABLA 2. Ensayo de Ames en la cepa TA 1537 de Salmonella typhimurium para el extracto fluido de Artemisia absinthium L.

Concentración (µg/placa)	TA 1537	
	-S9	+S9
0	7,3 ± 2,1	9,3 ± 3,8
50	9,0 ± 1,0	16,7 ± 4,0
150	8,7 ± 3,2	13,3 ± 3,8
500	12,3 ± 2,5	9,7 ± 2,5
1500	12,3 ± 1,2	10,7 ± 2,5
5000	9,7 ± 3,8	7,7 ± 1,2
Control Positivo ¹	738,7 ± 109,7	524,0 ± 38,6

¹ Controles positivos: -S9 ICR 170, 10 µg/placa; +S9: 2 aminofluoreno.

TABLA 3. Ensayo de Ames en la cepa TA 98 de Salmonella typhimurium para el extracto fluido de Artemisia absinthium L.

Concentración (µg/placa)	TA98	
	-S9	+S9
0	35,7 ± 12,6	40,7 ± 10,3
50	28,0 ± 4,4	35,3 ± 10,2
150	30,3 ± 2,5	39,7 ± 11,9
500	25,7 ± 4,7	44,0 ± 6,9
1500	32,3 ± 4,6	32,3 ± 3,06
5000	30,3 ± 8,3	44,7 ± 9,5
Control positivo	868,0 ± 40,6	664,0 ± 40,0

¹ Controles Positivos: -S9 ácido picrolónico, 100 µg/placa; +S9: 2 aminofluoreno.

TABLA 4. Ensayo de Ames en la cepa Ta 100 de Salmonella typhimurium para el extracto fluido de Artemisia absinthium L.

Concentración (µg/placa)	TA 100	
	-S9	+S9
0	195,0 ± 7,6	211,3 ± 9,0
50	177,0 ± 12,5	209,3 ± 37,1
150	181,7 ± 8,3	196,0 ± 11,5
500	153,6 ± 6,5	227,7 ± 13,6
1500	165,7 ± 5,5	165,0 ± 17,5
5000	133,3 ± 10,3	122,7 ± 36,5
Control Positivo ¹	2026,7 ± 92,41	146,7 ± 166,5

¹ Controles positivos: -S9: azida de sodio, 1,5 µg/placa; +S9: benzo(a) pireno.

TABLA 5. Resumen del test de micronúcleos en ratones machos tratados con extracto de Artemisia absinthium L.

Tratamiento (mg/kg)	PCE/NCE ± DS	% MNPCE ± DS
Controles		
Etanol al 60 %	1,84 ± 0,82	0,08 ± 0,03
Ciclofosfamida, 20 mg/kg	1,88 ± 0,38	0,47 ± 0,32**
No tratados	2,50 ± 0,50	0,08 ± 0,06
Extracto de <i>A. absinthium</i> L.		
500	1,69 ± 0,46	0,18 ± 0,08
1000	1,40 ± 0,24	0,12 ± 0,09
2000	1,73 ± 0,38	0,16 ± 0,08

** p < 0,01

TABLA 6. Resumen del test de micronúcleos en ratones hembras tratadas con extracto de Artemisia absinthium L.

Tratamiento (mg/kg)	PCE/NCE ± DS	%MNPE ± DS
Controles		
Etanol al 60 %	1,61 ± 0,68	0,16 ± 0,09
Ciclofosfamida, 20 mg/kg	2,23 ± 0,49	0,37 ± 0,15**
No tratados	1,81 ± 0,29	0,16 ± 0,04
Extracto de <i>A. absinthium</i> L.		
500	2,12 ± 0,227	0,09 ± 0,05
1000	1,49 ± 0,35	0,13 ± 0,06
2000	1,63 ± 0,49	0,10 ± 0,08

** p < 0,01

Discusión

Tal como puede observarse a partir de los resultados, el extracto fluido de incienso estudiado no parece inducir efectos mutagénicos en los sistemas de ensayo donde se evaluó.

Entre los componentes químicos del follaje de esta planta, se encuentran algunos pertenecientes a familias químicas que han sido reportadas como genotóxicas. Tal es el caso de la artemisina, lactona sesquiterpénica presente en el aceite esencial.⁸ Sin embargo, la respuesta negativa observada en los ensayos indica que, o bien estos compuestos se encuentran en proporciones a las cuales estos efectos no son detectables (el aceite esencial está presente en apenas un 0,7 %) o efectos de antagonismo por parte de otros componentes, pueden atenuar significativamente esta respuesta en el extracto fluido. Estudiar el potencial genotóxico tanto del aceite esencial como la fracción cruda de lactonas sesquiterpénicas en esta especie contribuiría a esclarecer la ausencia de mutagenicidad encontrada para el extracto fluido analizado en este trabajo.

Referencias bibliográficas

1. Mucciarelli M, Caramillelo R, Maffei M, Chialva F. Essential oils from some *Artemisia* species growing spontaneously in North-West Italy. *Flavour Fragrance J* 1995;10:25-32.
2. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana. Editorial: Científico-Técnica, 1988:128-9.
3. 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.
4. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983;113:173-215.
5. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, et al. Micronuclei as an Index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ Mol Mutagen* 1991;18:277-91.
6. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. En: Hollaender A. Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. New York: Plenum, 1976:31-53.
7. Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, Matsushima T, et al. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutat Res* 1994;312:217-33.
8. Spegazzini ED. Ethnopharmacobotany of wornwood of popular medicine in Argentina. *Acta Farm Bonaerense* 1984;3:2-5.

Recibido: 29 de diciembre de 1999. Aprobado: 12 de septiembre del 2000.
Lic. *Janet Piloto Ferrer*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave. 26 No. 1605 entre Boyeros y Puentes Grandes. Ciudad de La Habana, Cuba. CP 10600.