

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos  
Departamento de Investigaciones Microbiológicas y Productos Naturales

## EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DE UN EXTRACTO FLUIDO CON UN MENSTRUO ETANÓLICO AL 70 % DE *TELOXYS AMBROSIODES* L.WEBER (APASOTE)

Lic. Ángel Vizoso Parra,<sup>1</sup> Lic. Arilia García López,<sup>2</sup> Lic. Alberto Ramos Ruiz,<sup>3</sup> Lic. Janet Piloto Ferrer,<sup>4</sup>

Lic. Vania Pavón González<sup>5</sup> y Lic. Madeleine Peniche<sup>5</sup>

### Resumen

Se presentan los resultados obtenidos al evaluar el potencial mutagénico de un extracto fluido con un mensturo etanólico al 70 % de *Teloxys ambrosioides* L. Weber (apasote) en 2 sistemas de ensayos a corto plazo, empleando el sistema *in vitro* *Salmonella/microsoma* (*Ames*) y el sistema *in vivo*, utilizando el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón. En el ensayo de *Ames* se observó una respuesta positiva con las cepas de *Salmonella typhimurium* con y sin activación metabólica dentro del rango de concentraciones estudiadas. En el ensayo de inducción de micronúcleos se emplearon dosis de 500, 1 000 y 2 000 mg/kg de peso corporal (pc). Los resultados obtenidos demuestran que el extracto de *Teloxys ambrosioides* L. Weber fue mutagénico en el sistema *Salmonella/microsoma*. En el ensayo *in vivo* no se observó respuesta genotóxica en las dosis estudiadas.

Descriptores DeCS: PLANTAS MEDICINALES/genética; PLANTAS MEDICINALES/toxicidad; EXTRACTOS VEGETALES/toxicidad; IN VITRO; SALMONELLA TYPHIMURIUM; ANIMALES DE LABORATORIO; RATONES; MEDICINA HERBARIA.

### Summary

The results obtained on evaluating the mutagenic potential of a fluid extract with an ethanol menstuum 70 % of *Teloxys ambrosioides* L. Weber (wormseed) in 2 systems of short-term tests, *in vitro* *Salmonella/microsome* system (*Ames*) and the *in vivo* system using the micronucleus induction test in mouse bone marrow, are presented. In the *Ames*' test, it was observed a positive response with the strains of *Salmonella typhimurium* with and without metabolic activation within the range of studied concentrations. Doses of 500, 1000 and 2000 mg/kg of body weight were used in the micronucleus induction test. The results showed that the extract of *Teloxys ambrosioides* L. Weber was mutagenic in the *Salmonella/microsome* system. No genotoxic response was found among the doses studied in the *in vivo* assay.

Subject headings: PLANTS, MEDICINAL/genetic; PLANTS, MEDICINAL/toxicity; PLANT EXTRACTS/toxicity; IN VITRO; SALMONELLA TYPHIMURIUM; ANIMALS, LABORATORY; MICE; MEDICINE, HERBAL.

El *Teloxys ambrosioides* (L.) Weber, conocido como apasote, epazote, pasote, ipasote, paico, etc., pertenece a la familia *Chenopodiaceae* y crece en toda la América Latina. La planta entera es rica en aceite esencial, uno de cuyo

componentes principales es el ascaridol, causante del efecto antiparasitario de esta planta. El mayor contenido de este aceite se encuentra en las semillas. En el aceite esencial se reporta la presencia de p-cimeno, (-)-limoneno, (+) alcanfor,

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

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

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

<sup>4</sup> Licenciada en Biología.

<sup>5</sup> Licenciada en Farmacia.

artisona, safrol, dimetilsulfoxido, d-terpinol. Además se le reportan en diferentes partes de la planta los siguientes compuestos: ambrósidos, betaína, chenoposdiosidos A y B, saponinas A, rhamnósidos y santoína.

El ascaridol (peróxido terpénico) constituye el 75-80 % del aceite, siendo este el componente con actividad antihelmíntica y antibacteriana demostrada farmacológicamente.<sup>1,2</sup> Se plantea que el ascaridol posee un mecanismo de acción paralizante y narcótica sobre los *ascaris* y los *ancylostomas*, pero inactivo contra la tenia y tricocéfalos.<sup>3</sup> En diferentes países de América Latina se reporta su empleo tradicional como: vermífugo, emenagogo, abortivo, antiasmático, sudorífero, etc.<sup>4</sup> También se le ha reportado actividad antifúngica y antibacteriana frente a la *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.<sup>5,6</sup> Se reporta que el aceite esencial del apazote es cancerígeno en ratas a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal (pc).<sup>7</sup> Para la evaluación genotóxica de extracto fluido de *Teloxys ambrosioides* (L.) Weber, se emplearon 2 sistemas de ensayos a corto plazo reconocidos internacionalmente: el ensayo *in vitro* de *Salmonella/Microsomas* (Ames) que detecta mutaciones puntuales y el ensayo *in vivo* de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón que detecta aberraciones cromosómicas inducidas por agentes clastogénicos y aneugénicos.

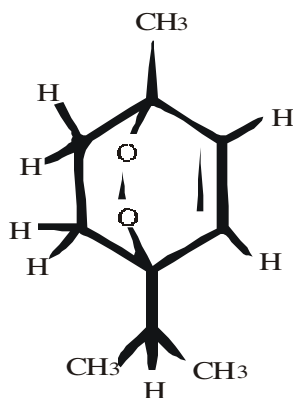


Fig. Estructura química del Ascaridol (endo-peróxido).

## Métodos

### MATERIAL VEGETAL

Se emplearon frutos maduros y verdes, el follaje y las flores de *Teloxys ambrosioides* (L.) Weber, cultivadas en la Estación Experimental de Plantas Medicinales "Dr. Juan Tomas Roig", Güira de Melena, Provincia Habana. El extracto fluido de la planta se obtuvo en el Laboratorio de Productos Naturales del CIDEM. La composición físico-química del extracto fluido del *Teloxys ambrosioides* (L.) Weber es la siguiente: etanol, 60 %; sólidos totales, 6,03 %, cenizas totales, 10-47 %; pH, 6,0-7,0; contenido de aceite, 0,1148 %.<sup>8</sup>

El número de herbario de este espécimen corresponde a Roig 4639.

### ENSAYO DE *SALMONELLA*/MICROSOMA (AMES)

Se empleó una batería de 4 cepas de *Salmonella typhimurium*. TA-1535, TA-1537, TA-98 y TA-100, donadas por el Dr. Bruce N Ames (Universidad de California en Berkeley, USA). Se empleó el método de incorporación en placa con un protocolo de trabajo bien estandarizado para evaluar el extracto fluido de *Teloxys ambrosioides* (L.) Weber. Se ensayaron concentraciones de 50, 150, 15 00 y 5 000 µ/placa de sólidos totales, sembrándose 3 placas por concentración en un experimento único.<sup>9</sup> El ensayo se realizó en presencia y ausencia de activación metabólica exógena, conteniendo 4 % de fracción S9 en solución de co-factores, obtenida a partir de hígado de ratas tratadas con fenobarbital y 5,6 naftoflavona. Las placas se incubaron a 37 °C y se contaron las colonias revertantes a las 48 h. Para el análisis estadístico se aplicó el programa SANALAL, versión 1.0 (ILS Research Triangle Park, NC, USA).

### ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

El extracto hidroalcohólico del apasote 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 en el momento de la administración a los animales. Se establecieron 5 grupos experimentales: 3 dosis (2 000, 1 000 y 500 mg/kg de peso corporal, pc), control negativo (etanol al 60 %), control positivo (ciclofosfamida, 20 mg/kg pc). Cada grupo contó con 10 animales: 5 machos y 5 hembras. Se emplearon ratones Suizos de 5 semanas de nacidos con un peso promedio de aproximadamente 20 g, provenientes del Laboratorio de Control Biológico del CIDEM. Estos se aclimataron durante una semana en el bioterio de la Fac. de Medicina "Dr. Salvador Allende". Se alimentaron con pienzo peletizado (Ratonina, CENPALAB) y agua sin restricción. El extracto se aplicó por vía oral a razón de 10 mL/kg pc, en dosis separadas por 24 h y se procedió al sacrificio 24 h después de la última aplicación. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Las muestras de médula ósea se obtuvieron según Schmid.<sup>10</sup> Las láminas se fijaron con etanol al 95 % (v/v) durante 5 min y se secaron al aire durante 24 h. Finalmente se tiñeron con Giemsa al 5 % (v/v) en buffer fosfato pH = 7,0 durante aproximadamente 20 min. Se contaron 2 000 eritrocitos policromáticos (PCE) por animal y además los eritrocitos normocromáticos (NCE) presentes en 250 PCE para estimar el daño citotóxico (IT = PCE/NCE).

Para el tratamiento estadístico de los datos, se normalizaron los valores PCE/NCE y el % MNPCE (PCE micronucleados) para cada animal empleando la transformación  $\sqrt{(x+1)}$ . Después se procedió a realizar un análisis de

**TABLA 1.** Resultados del ensayo de Ames frente a un extracto fluido con un menstruo etanólico al 70 % de *Telexys ambrosioides* (L.) Weber

Colonias revertantes/placa ± D.S.				
TA-100	TA-98			
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
0 <sup>a</sup>	30,00 ± 7,94	26,00 ± 3,46	152,67 ± 18,34	127,00 ± 8,19
50	26,33 ± 2,52	39,00 ± 7,94	139,33 ± 26,58	139,67 ± 7,37
150	29,00 ± 5,29	39,33 ± 4,04*	207,67 ± 39,80	144,00 ± 29,46
500	31,00 ± 3,61	37,67 ± 4,16*	124,67 ± 6,51	131,00 ± 11,53
1 500	39,00 ± 4,58	44,67 ± 4,04*	127,33 ± 8,52	153,33 ± 4,04*
5 000	23,67 ± 2,89	54,67 ± 11,02*	170,67 ± 36,00	172,67 ± 4,73**
Control positivo <sup>2</sup>	709,33 ± 12,49**	995,66 ± 68,00**	604,00 ± 17,44**	2 029,33 ± 47,24**

Colonias revertantes/placa ± D.S.				
Concentración µg/placa	TA-1535		TA-1537	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
0 <sup>a</sup>	6,33 ± 3,21	12,00 ± 3,16	12,33 ± 2,31	18,33 ± 5,51
50	8,33 ± 3,51	8,00 ± 2,65	12,67 ± 2,89	17,00 ± 5,20
150	8,00 ± 3,61	8,67 ± 1,53	14,33 ± 2,66	14,00 ± 2,08
500	11,00 ± 3,46	6,67 ± 1,15	14,67 ± 2,52	19,33 ± 4,16
1500	8,00 ± 0,00	8,00 ± 2,00	14,00 ± 2,52	17,00 ± 6,24
5 000	11,67 ± 1,15	10,00 ± 3,79	25,00 ± 2,00*	18,00 ± 4,58
Control positivo <sup>2</sup>	243,00 ± 47,51**	520,00 ± 43,82**	3155,33 ± 43,56**	894,66 ± 30,94**

<sup>a</sup> Control negativo: Dimetilsulfóxido (DMS).

<sup>b</sup> Controles positivos:

TA-1535 (-S9) ázida de sodio, 1,5µg/placa; (+S9) Ciclofosfamida, 500 µg/placa.

TA-1537 (-S9) 9-aminoantraceno, 100µg/placa; (+S9) 2 aminofluoreno, 100 µg/placa.

TA-98 (-S9) ácido picrolónico, 100µg/placa; (+S9) 2 aminofluoreno, 10 µg/placa

TA-100 (-S9) ázida de sodio, 1,5 µg/placa; (+S9), benzo(a) pireno, 10 µg/placa.

Anova: p <0,05\*; p <0,01\*\*

**TABLA 2.** Ensayo de micronúcleos en ratones tratados con un extracto fluido con un menstruo etanólico al 70 % de *Telexys ambrosioides* (L.) Weber

Dosis (mg/kg/día)	Sexo <sup>a</sup>	PCE/NCE (media ± DS)	MNPCE/1000 PCE (media ± DS) <sup>b</sup>
Etanol al 60 % <sup>c</sup>	M	1,52 ± 0,22	2,50 ± 0,20
	F	1,54 ± 0,05	2,60 ± 0,14
500	M	1,55 ± 0,05	2,40 ± 0,48
	F	1,56 ± 0,07	3,60 ± 0,7
1000	M	1,54 ± 0,03	3,60 ± 0,14
	F	1,57 ± 0,09	3,20 ± 0,64
2000	M	1,53 ± 0,09	3,30 ± 0,66
	F	1,50 ± 0,09	2,60 ± 0,56
CP 20 <sup>d</sup>	M	0,65 ± 0,04**	20,50 ± 0,70**
	F	0,65 ± 0,04**	23,80 ± 1,10**

<sup>a</sup> M, machos; F, hembras.

ANOVA; \*\* p < 0,01 (*t-Student*)

<sup>b</sup> PCE micronucleados.

*Cochran-Armitage*, p = 0,128 (M)

<sup>c</sup> Control negativo

*Cochran-Armitage*, p = 0,619 (F)

<sup>d</sup> Ciclofosfamida, control positivo.

varianza de 2 vías considerando sexo, dosis e interacción de ambos. La existencia de una posible relación dosis-efecto se estimó por el estadígrafo para tendencias en proporciones lineales (*test de Cochran-Armitage*).<sup>11</sup> Para que el producto sea genotóxico debe observarse incrementos significativos en la frecuencia de PCE micronucleados y que los mismos tengan una relación dosis-respuesta.

## RESULTADOS

La tabla 1, muestra los resultados del ensayo de *Ames*. Se puede observar un efecto mutagénico en las cepas TA-1537 a la concentración de 5 000 µg/placa, sin activación metabólica, en la TA-100 en las concentraciones de 1 500 y 5 000 µg/placa y en la cepa TA-98 en las concentraciones desde 150-5 000 µg/placa, ambas con activación metabólica.

En el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón, la tabla 2 demuestra que no existen diferencias significativas en el índice de citotoxicidad medular dada por la relación PCE/NCE, tanto para los ratones machos (P = 0,677), como para los ratones hembras (P = 0,525). La frecuencia de inducción de micronúcleos (% MNPCE) no presentó tampoco diferencias significativas para ambos sexos (ratones machos P = 0,178; ratones hembras P = 0,422). El estadígrafo de tendencias lineales (*Cochran-Armitage*) tampoco resultó significativo ni para ratones machos P = 0,128, ni hembras, P = 0,619.

## Discusión

El extracto fluido de *Teloxys ambrosioides* (L.) Weber en estudio fue positivo (mutagénico) en el ensayo de *Ames*, induciendo corrimiento del marco de lectura en el triplete de bases por adición (frameshift + 1) en la cepa TA-1537, y por delección (frameshift - 1) en la cepa TA-98 y sustitución de pares de bases en la cepa TA-100.

Estas micro-lesiones genéticas concuerdan con un estudio llevado a cabo a partir de un extracto acuoso (decocción e infusión) de dicha planta en el sistema *in vitro* empleando linfocitos de sangre periférica, al reportarse macro-lesiones genéticas dado por un incremento en el porcentaje de aberraciones cromosómicas y en la frecuencia de intercambio aberraciones cromosómicas y en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (A. *Gadano*, et al. Evaluación del potencial genotóxico de Plantas Medicinales *in vitro* XVII. Jornada Interdisciplinarias de Toxicología. Buenos Aires. 1998). Por ser el Ascaridol el compuesto mayoritario y ser un peróxido terpénico (endoperóxido), se pudiera inferir que debido a su estructura química genere radicales libres reactivos (grupos \*OH), los cuales pueden formar aductos del ADN e inducir el efecto mutagénico en el sistema bacteriano.

Considerando que aunque la concentración del aceite esencial es baja (0,1148 %) las posibilidades de exposición

directa del mutágeno con la célula bacteriana es más factible. Además, esta reportado que la planta contiene safrol, compuesto hepatocarcinógeno débil y mutagénico y quercitina, reportada también como mutagénica en el ensayo de *Ames*.<sup>12,13</sup> El efecto observado en el ensayo *in vitro* no fue confirmado *in vivo* en el ensayo de micronúcleos, pues la inactivación de la genotoxina(s) puede estar relacionada principalmente con los perfiles farmacocinéticos de absorción-distribución-metabolismo y excreción o por la baja biodisponibilidad de los mutágenos antes referidos y presentes en el aceite esencial contenido en el extracto fluido del *Teloxys ambrosioides* (L.) Weber.<sup>14</sup>

## Conclusiones

- El extracto fluido de *Teloxys ambrosioides* (L.) Weber es marcadamente mutagénico en el ensayo *in vitro* de *Ames*.
- No presentó efecto mutagénico en el ensayo de inducción de micronúcleos.
- Se recomienda determinar la concentración de Ascaridol en el extracto fluido de la planta.

## Referencias bibliográficas

1. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. 2 ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1988;t 1:166-9.
2. Gupta MP. 270 plantas medicinales iberoamericanas. Colombia: Programa Iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo. CYTED. Convenio Andrés Bello, 1995:230-37.
3. Okuyama E, Umeyama K, Sarto Y, Yamazaqui M, Satakae M. Ascaridole asa pharmacologically active principles of Paico; a medicinal Peruvian plant. Chem Pharm Bull Tokio, 1993;41(7):1309-11.
4. Conway GA, Glocumb JC. Plants used as abortifacients and emenagogues by Spanish-Mexican. J Pharmacol 1977;1:241-61.
5. Kishore N. Fungitoxicity of some volatile natural products against human pathogenic fungi. Indian Perf 1981;25(84):1-3.
6. Ross SA, El-Keltawi NL, Megallas SE. Antimicrobial activity of some Egyptian aromatic plants. Fitoterapia 1980;51:201-5.
7. Kapadia G. Carcinogenicity of some folk medicinal herbs in rats. J Nat Cancer Inst 1978;60:683-6.
8. Soler B, Méndez G, García M, Miranda M. Normas Ramales. Medicamentos de Origen Vegetal. Tinturas y Extractos fluidos. MINSAP, La Habana, pág. 1-3.
9. Gatehouse D, Howarth G, Cebula I. Recommendations for the performance of the bacterial mutation assay. Mutation Res 1994;312:217-33.
10. Schimid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. En: Hollaender A, ed. Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. New York: Plenum, 1976:31-53.
11. Lovell DT, Albanese R, Clare G, Richold M, Savage JR, Andersen D, et al. Statistical analysis in vivo cytogenetic assays. En: Kirland DL, ed. Statistical evaluation of mutagenicity test data. Cambridge: University Press, 1989:184-230.
12. Hirohiko D, Sbigeki S, Shoji A, Fumio S. Analysis of cytogenetic effect of DNA adduct formation induced by safrol in Chinese Hamster lung cells. Teratogen Carcinogen Mutagen 1997;17:7-18.
13. Zeiger E, Andersen B, Howarth S, Timoty L, Mortelmar F. Salmonella mutagenicity test: V. Results from the testing of 311 chemical. Env Molec Mutat 1992;21:2-141.
14. Ashby J. The unique role of rodents in the detection of possible human carcinogens and mutagens. Mutat Res 1983;115:177-213.

Recibido: 27 de junio del 2000. Aprobado: 7 de septiembre del 2000. Lic. *Ángel Vizoso Parra*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Ave 26 No. 1605 el Cerro y Boyeros. Plaza, Ciudad de La Habana. CP 10600.