

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM)

Departamento de Investigaciones Microbiológicas

**EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE CERA DE CAÑA NO INDUCE DAÑO GENÉTICO***Lic. Ángel Vizoso Parra<sup>1</sup>, Lic. Arilia García López<sup>2</sup>, Lic. Alberto Ramos Ruiz<sup>3</sup>, Lic. Aida Villaescusa González<sup>4</sup>, Lic. Aymee Edreira Armenteros<sup>5</sup>, Dra. Irma Castro Méndez<sup>6</sup> y Lic. Janet Piloto Ferrer<sup>7</sup>***Resumen**

El empleo de las plantas medicinales y sus derivados en la medicina tradicional halla su expresión natural y su desarrollo ulterior en la atención primaria de la salud. Cuba ha sabido aprovechar su rica flora y su vasta tradición en el empleo de los fitofármacos. Dentro de estos productos alternativos se encuentra la cera de caña con propiedades farmacológicas reconocidas (antiinflamatoria, cicatrizante, etc.), la cual es obtenida como subproducto en el proceso de elaboración del azúcar. Los estudios genotóxicos se llevaron a cabo empleando 3 sistemas de ensayos a corto plazo, 2 *in vitro* y 1 *in vivo*. Para las pruebas *in vitro* se emplearon los ensayos de *Salmonella/Microsomas (Ames)* y *segregación mitótica (Aspergillus nidulans D-30)* a una concentración máxima del producto de 5 mg/placa y 1,00 mg/mL, respectivamente. En el ensayo *in vivo* de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón se emplearon dosis hasta de 2 000 mg/kg de peso corporal. Los resultados obtenidos demuestran que el extracto hidroalcohólico de cera de caña no tiene efecto mutagénico en ninguno de los ensayos empleados.

DeCs: PLANTAS MEDICINALES/toxicidad; EXTRACTOS VEGETALES/toxicidad; TESTS DE MUTAGENICIDAD; SALMONELLA; ASPERGILLUS NIDULANS; TESTS DE MICRONUCLEOS; RATAS WISTAR.

**Summary**

The utilization of medicinal plants and their derivatives in traditional medicine finds its natural expression and its further development in primary health care. Cuba has taken advantage of its rich flora and of its vast tradition in the use of phytodrugs. The sugar cane wax is among these alternative products. It is obtained as a by-product in the sugar manufacture process and it has well-known pharmacological properties (antiinflammatory, healing, etc.). The genotoxic studies were conducted by using 3 short-term test systems, 2 *in vitro* and 1 *in vivo*. The tests of *Salmonella/Microsomas (Ames)* and mitotic segregation (*Aspergillus nidulans D-30*) were used for *in vitro* assays at a maximum concentration of the product of 5 mg/plate and 1.00 mg/mL, respectively. In the *in vivo* test of micronucleus induction in mouse bone marrow, doses of up to 2 000 mg/kg of body weight were used. The results showed that the hydroalcoholic extract of sugar cane wax has no mutagenic effect on any of the tests used.

Subject headings: PLANTS, MEDICINAL/toxicity; PLANT EXTRACTS/toxicity; MUTAGENECITY TESTS, SALMONELLA; ASPERGILLUS NIDULANS; MICRONUCLEUS TESTS; RATS, WISTAR.

Las plantas medicinales son una parte pequeña pero importante de la herencia biológica de la tierra. El empleo de las plantas medicinales y sus derivados en la medicina tradi-

cional halla su expresión natural y su desarrollo ulterior en la atención primaria de la salud.<sup>1</sup> Cuba ha sabido aprovechar su rica flora y su vasta tradición en el empleo de los fitofármacos,

<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. Investigadora Agregada.

<sup>5</sup> Licenciada en Bioquímica. Investigadora Aspirante.

<sup>6</sup> Doctora en Ciencias Químicas. Investigadora Titular.

<sup>7</sup> Licenciada en Biología.

pero su aplicación sin un aval científico representa un riesgo para la salud humana. Por esta razón el ensayo toxicogenético de los medicamentos de origen herbario se hace necesario para descartar cualquier daño al material hereditario y que el fitofármaco puede ser consumido por la población. Dentro de estos productos alternativos se encuentra la cera de caña con propiedades farmacológicas reconocidas (cicatrizante, antiinflamatoria, antimicrobiana, además se le atribuyen efectos positivos en algunas afecciones dérmicas como acné juvenil, picadas de insectos, linfangitis, etc.) la cual es obtenida como subproducto en la elaboración de la caña de azúcar, compuesta por una mezcla de ésteres céreos, ácidos grasos y fitosteroles entre otros cuya actividad biológica ha sido reportada por algunos investigadores (Tillán J. Laboratorio de Control Biológico del CIDEM, comunicación personal).<sup>2</sup> Para el estudio se seleccionaron 3 ensayos reconocidos internacionalmente: 2 *in vitro* y 1 *in vivo*. Para las pruebas *in vitro* se emplearon los ensayos de *Salmonella/Microsomas (Ames)* el cual detecta mutaciones génicas y el ensayo de *Segregación Somática* con el hongo diploide *Aspergillus nidulans* D-30 el cual detecta recombinación mitótica, aneuploidía o daño clastogénico, mecanismos genéticos que pueden conducir a desarrollo de procesos tumorales.<sup>3,4</sup> Para la prueba *in vivo* se empleó el ensayo de *inducción de micronúcleos* en médula ósea de ratón, que detecta la ocurrencia de aberraciones cromosómicas en eritroblastos expuestos a agentes que ocasionan clastogénesis y aneuploidía.<sup>5</sup>

## Métodos

### MATERIAL VEGETAL

Subproducto de la caña de azúcar denominado cera de caña, elaborado por la Empresa Farmacéutica “Dr. Mario Muñoz”, perteneciente a la Industria Médico Farmacéutica. El extracto de cera de caña es un producto sólido de aspecto uniforme, color verde y de olor característico. Está constituido por ácidos grasos (mirístico, palmítico, esteárico, aráquico, docosanoico, etc.), por alcoholes superiores (tetracosanol, hexacosanol, octacosanol, triacosanol, etc.), por alcoholes superiores (tetracosanol, hexacosanol, octacosanol, triacosanol, etc.) y por fitosteroles (stigmasterol, campesterol y beta-sitosterol).

### ENSAYO DE 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 descrito por Maron y Ames.<sup>3</sup> El extracto hidroalcohólico de cera de caña se disolvió en dimetilsulfóxido (DMS) hasta una concentración final de 50 mg/mL. Se ensayaron concen-

traciones de 50, 150, 500, 1 500, y 5 000 µg/placa de sólidos totales, se sembraron 3 placas por concentración en un experimento único.<sup>6,7</sup> El ensayo se realizó en presencia y ausencia de activación metabólica exógena, que contenía 4 % de fracción S9 en solución de cofactores, obtenida a partir del homogenato de hígado de ratas *Wistar* de 200 g de peso tratadas con fenobarbital y 5,6 naftoflavona. Las placas se incubaron a 37 °C y se contaron las colonias revertantes (colonias mutantes prototróficas) a las 48 h. Para el análisis estadístico se aplicó un ANOVA simple y se empleó el programa *SALANAL* versión 1,0 (ILS Research Triangle Park, NC, USA).

### ENSAYO DE SEGREGACIÓN SOMÁTICA

Se empleó la cepa *Aspergillus nidulans* D-30,<sup>8</sup> obtenida de los haploides A593(a) y A594(b) procedentes del *Fungal Genetic Stock Center* (FGSC), en Atlanta, USA. Es una cepa diploide heterocigótica para varios marcadores auxotrofos, de resistencia y 4 recesivos para el 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.<sup>9</sup> El medio de cultivo empleado fue medio completo (MC).<sup>10</sup> Se siguió un protocolo de ensayo de exposición en medio de cultivo agarizado donde se siembran los conidios en punto al centro de las placas. El extracto hidroalcohólico de cera de caña se disolvió en polipropilenglicol al 2 % (v/v) y se emplearon concentraciones del extracto de 0,1 mg/mL hasta 1,0 mg/mL de sólidos totales. A las 72 h de incubación a 37 °C se midió el diámetro de las colonias para determinar el índice de citotoxicidad (IT) dado por el por ciento de reducción del diámetro de las colonias con respecto al control negativo. Se analizaron 4 placas por concentración. Como criterio de toxicidad se tomó lo reportado por *Kappas*.<sup>11</sup>

Toxicidad	IT
Baja	0-15
Media	16-30
Alta	>30

Para determinar si el fitofármaco induce daño genético las placas con MC se suplementaron con las siguientes concentraciones del extracto hidroalcohólico de cera de caña (0,1; 0,2; 0,4; 0,8 y 1,0 mg/mL de sólidos totales). Las placas se inocularon en 5 puntos equidistantes y se incubaron a 30 °C durante 6-10 d. A los 6 d se contaron los sectores segregantes coloreados y se calculó la frecuencia de sectores por colonia (FSC) para cada concentración ensayada. Se calculó el índice de segregación mitótica (ISMI) expresado como la FSC para la concentración estudiada respecto a la FSC del control negativo. Como control negativo se empleó

polipropilenglicol al 2 % (v/v) y como control positivo, hidrato de cloral (6 mM). Para el análisis estadístico, los datos primarios se transformaron según la fórmula  $\sqrt{(x + 0,5)}$ . A la FSC correspondiente a los datos transformados se le realizó un ANOVA simple empleando el paquete estadístico MICROSTA. La genotoxicidad se evaluó en términos de la frecuencia de sectores segregantes coloreados de los conidios (FSC) marcadores recesivos en homocigosis observada para cada concentración ensayada.<sup>12,13</sup>

Se consideraron genotóxicas aquellas concentraciones que incrementan la FSC el doble o más respecto al control negativo, que sean estadísticamente significativas y dependientes de la concentración.

## ENSAYO DE INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS

Se emplearon ratones de la línea isogénica Suizos de 5 semanas de nacidos con un peso promedio de aproximadamente  $21 \pm 2,5$  g, provenientes del Laboratorio de Control Biológico del CIDEM. Estos se aclimataron durante una semana en el bioterio de la facultad de medicina "Dr. Salvador

Allende". Se alimentaron con pienso peletizado (Ratonina, CENPALAB) y agua sin restricción. El extracto hidroalcohólico de cera de caña se administró una vez disuelta en aceite de maní, por vía oral a razón de 10 mL/kg pc. en 2 aplicaciones separadas por 24 h. Se emplearon 3 dosis y 5 animales de ambos sexos por grupo experimental. La dosis más alta correspondió a 2 000 mg/kg de peso corporal y a partir de esta se tomaron el 50 % y el 25 % de la dosis máxima.<sup>14</sup> El control positivo fue ciclofosfamida 20 mg/kg pc, el control negativo empleado fue aceite de maní. Se empleó un grupo de animales como control espontáneo. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical 24 h después del último tratamiento. Las muestras de médula ósea se obtuvieron según Schmid.<sup>5</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* (Empresa de Productos Farmacéuticos C. J. Finlay) al 5 % (v/v) en agua corriente 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 ( $IT=PCE/NCE$ ).

**TABLA 1.** Resultados del ensayo de AMES frente a un extracto hidroalcohólico de cera de caña

Concentración µg/placa	Colonias revertantes/placa ± D.S			
	TA-98		TA-100	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
0 <sup>a</sup>	70,30 ± 4,51	71,00 ± 3,61	121,00 ± 5,77	112,30 ± 11,60
50	72,70 ± 6,66	74,70 ± 8,08	126,70 ± 4,93	120,70 ± 7,37
150	73,70 ± 5,51	69,30 ± 1,53	124,00 ± 5,29	121,00 ± 10,54
500	71,30 ± 3,21	71,30 ± 3,51	119,70 ± 8,06	121,30 ± 5,36
1 500	66,00 ± 4,36	69,00 ± 3,61	124,70 ± 5,69	115,70 ± 5,86
5 000	67,00 ± 3,61	70,00 ± 4,35	121,70 ± 2,89	117,30 ± 3,79
Control positivo <sup>b</sup>	1 130,33 ± 40,60**	3 095 ± 40,00**	549,70 ± 92,40**	671,00 ± 166,50**

  

Concentración µg/placa	Colonias revertantes/placa ± DS			
	TA-1535		TA-1537	
	(-S9)	(+ S9)	(-S9)	(+S9)
0 <sup>a</sup>	13,00 ± 3,46	16,70 ± 1,15	8,30 ± 1,58	8,70 ± 1,15
50	14,70 ± 2,31	20,30 ± 0,58	6,70 ± 1,58	7,30 ± 2,08
150	13,70 ± 1,15	16,30 ± 1,53	9,70 ± 2,00	7,70 ± 3,06
500	16,30 ± 1,53	15,70 ± 0,58	7,70 ± 2,08	8,70 ± 2,89
1 500	16,00 ± 1,78	16,80 ± 1,15	7,00 ± 2,00	9,70 ± 1,53
5 000	11,30 ± 0,58	16,00 ± 2,65	7,00 ± 2,00	9,00 ± 2,00
Control positivo <sup>b</sup>	190,00 ± 49,51**	298,00 ± 40,00**	651,33 ± 109,70**	1 080 ± 38,60**

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

<sup>b</sup> Controles positivos:

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

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

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

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

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

**TABLA 2.** Resultados de la segregación somática en el hongo *Aspergillus nidulans* D-30 frente al extracto hidroalcohólico de cera de caña

Concentración mg/mL	Colonias	Toxicidad <sup>a</sup>		Sectores segregantes	Genotoxicidad	
		(IT %)	Colonias		FSC <sup>b</sup>	ISMI <sup>c</sup>
Polipropilenglicol al 2 % v/v <sup>d</sup>	8	-	97	48	0,495	1,00
0,1	8	-10,5	100	82	0,820	1,56
0,2	8	-13,2	99	74	0,747	1,51
0,4	8	-18,5	90	50	0,556	1,12
0,8	8	-10,5	100	46	0,460	0,93
1,00	8	-5,3	100	31	0,310	0,53
Hidrato de cloral 6 mM <sup>**</sup>	8	58,4	100	217	2,170	4,38

<sup>a</sup> Reducción del diámetro de las colonias las 72 h de incubación respecto al control negativo; <sup>b</sup> Índice de segregación mitótica; <sup>c</sup> Control negativo; <sup>d</sup> Control positivo; <sup>\*\*</sup> p < 0,01.

**TABLA 3.** Resultados del ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón frente al extracto hidroalcohólico de cera de caña

Dosis mg/kg pc	Animales	PCE/NCE ± DS <sup>a</sup>	MPCE <sup>b</sup>	PCE Total	% MPCE ± DS
Aceite de maní <sup>c</sup>	10	1,71 ± 0,09	17	20023	0,09 ± 0,03
500	10	1,83 ± 0,27	21	20007	0,11 ± 0,07
1 000	10	1,88 ± 0,10	23	20048	0,12 ± 0,03
2 000	10	1,97 ± 0,71	20	20052	0,10 ± 0,07
Ciclofosfamida <sup>d</sup>	10	1,56 ± 0,12 <sup>**</sup>	334	20080	1,66 ± 0,41 <sup>**</sup>
No tratados	10	1,72 ± 0,33	19	20071	0,05 ± 0,04

<sup>a</sup> PCE/NCE – Índice de citotoxicidad medular; <sup>b</sup> MPCE – eritrocitos policromáticos micronucleados; <sup>c</sup> Control negativo; <sup>d</sup> Control positivo (20 mg/kg pc)

\* p < 0,05; \*\* p < 0,01. Estadígrafo para tendencias lineales, *Cochran-Armitage* p < 0,34.

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 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 (prueba de *Cochran-Armitage*).<sup>16</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

En la tabla 1 se muestran los resultados del ensayo de *Ames* frente al extracto hidroalcohólico de cera de caña. Como puede observarse no hay evidencia de efecto citotóxico ni genotóxico.

En el ensayo de segregación somática con el hongo *Aspergillus nidulans* D-30 (tabla 2) se puede apreciar un incremento del diámetro de las colonias con respecto al control negativo dado por el signo negativo del (% IT). Tampoco se observó efecto genotóxico significativo al realizarle un análisis

de varianza simple a las FSC comparado con el control negativo (solvente) para todas las concentraciones estudiadas.

En la tabla 3 se muestran los resultados del ensayo *in vivo* en donde se observa la no inducción de micronúcleos, los cuales se originan como resultado de daños clastogénicos o aneugénicos después de la exposición al agente genotóxico al ser dañado durante la mitosis los cromosomas del tejido eritropoyético, dado por un incremento significativo del por ciento de los eritrocitos policromáticos micronucleados ( $P_{\text{sexo}} = 0,66$ ;  $P_{\text{dosis}} = 0,70$ ) por la acción del extracto hidroalcohólico de cera de caña. No se observa un incremento significativo en el ensayo de tendencias lineales (*Cochran-Armitage*; p=0,34). Tampoco se presenta toxicidad en médula ósea al no demostrarse cambios significativos en la relación PCE/NCE después del tratamiento ( $P_{\text{sexo}} = 0,17$ ;  $P_{\text{dosis}} = 0,87$ ).

## Discusión

El extracto hidroalcohólico de cera de caña, un subproducto de la caña de azúcar, no induce daño genético en los 3 sistemas estudiados, demostrando que este fitofármaco no contiene genotoxinas que pudieran dañar el genoma celular. Se observa en el ensayo de segregación

somática con el *Aspergillus nidulans* D-30 un incremento del diámetro de las colonias debido posiblemente a componentes del extracto, que pudieran actuar como estimuladores del crecimiento dado por la presencia de ácidos grasos y de los alcoholes superiores. También pudiéramos inferir que la ausencia de mutaciones se deba a la presencia de esteroides, los cuales se reportan con acción antimutagénica ya sea por un mecanismo de inhibición de la interacción entre genes y mutágenos bioquímicamente reactivo o inhibiendo la activación metabólica de agentes mutagénicos que actúan indirectamente.<sup>17</sup>

Por los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, era de esperarse la ausencia de genotoxicidad en el ensayo *in vivo*, como efectivamente se comprobó.

## Referencias bibliográficas

1. Akerale O. Medicina tradicional. Plantas medicinales y atención primaria de salud: un calendario para la acción. Bol Medicam Esenc 1990;10:8-9.
2. Belkevich P. Cera de la turba y del carbón mineral. Instituto de la Turba de Minsk. La Habana: Editorial de Ciencia y Técnica; 1989.
3. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity. Mutat Res 1983;113:173-85.
4. Kafer 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.
5. Salamone MF, Mavournin KH. Bone marrow micronucleus assays: a review of mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. Environ Mol Mutagen 1994;23:239-73.
6. Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, et al. Report from the working groups on bacterial mutation assays: International Workshop on Standardization of Genotoxicity by Test Procedure. Mutat Res 1994;312:217-33.
7. Guidelines for Genetic Toxicology. Paris: OECD; 1994.
8. Vizoso A, Ramos A, Villaescusa A, Décalo M, Betancourt J. Estudio genotóxico *in vitro* e *in vivo* en tinturas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Mentha piperita* L. (toronjil de menta). Rev Cubana Plant Med 1997;2(1):6-11.
9. Ramos A, Edreira A, Vizoso A, Betancourt J, López M, Décalo M. Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. J Ethopharmacol 1998;61:49-55.

## Conclusiones

En las condiciones de ensayo descritas, el extracto hidroalcohólico de cera de caña no se presentó acción genotóxica ya que:

- No indujo un incremento significativo en el número de mutantes prototróficos en el ensayo de *Ames* con y sin activación metabólica.
- No indujo un aumento significativo en la frecuencia de sectores por colonias en la cepa de *Aspergillus nidulans* D-30.
- No se observó un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos.

10. Scott BR, Kafer E. *Aspergillus nidulans*: An organism for detecting a range of genetic damage. En: Serres FJ, Hollander A, eds. Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. New York: Plenum, 1982:447-9.
11. Kappas A. Genotoxic activity of plant growth-regulating hormone in *Aspergillus nidulans*. Carcinogens 1983;4:1409.
12. Torre RA de la, Rúa R de la, Hernández G. Genotoxic effects of niclosamide in *Aspergillus nidulans*. Mutat Res 1989;222:337-41.
13. Sigarroa A. Biometría y diseño experimental. La Habana: Ministerio de Educación Superior, 1985:276-337.
14. Hayashi M, Tice RR, Macgregor JT, Anderson D, Bladley DH, Kirshvolders M, et al. *In vivo* rodent erythrocytes micronucleus assay. Mutat Res 1994;312:293-304.
15. Schmid W. The micronuclei test for cytogenetic analysis. En: Hollander A. Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. New York: Plenum, 1976:31-53.
16. Lovell DP, Albanese R, Clare G, et al. Statistical analysis on *in vivo* cytogenetic assay. En: Kirland DJ, ed. Statistical evaluation of mutagenicity test data. Cambridge: University Press, 1989: 184-230.
17. Sarkar D. Plant extract as modulators of genotoxic effects. Botanic Rev 1996;62(4):275-300.

Recibido: 20 de febrero de 2001. Aprobado: 12 de julio de 2001.  
Lic. Angel Vizoso Parra. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Ave 26 No. 1605 e/n Boyeros y Puentes Grandes, municipio Plaza, Ciudad de La Habana, Cuba.