

Evaluación mutagénica y antimutagénica de extractos totales de plantas medicinales mediante el ensayo de retromutación en *Salmonella typhimurium*

Mutagenic and antimutagenic evaluation of total extracts of medicinal plants by the retromutation test in Salmonella typhimurium

Willan Muñoz-Chamba*¹

¹ *Escuela de Medicina. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador*

Fecha de recepción del manuscrito: 27/09/2018

Fecha de aceptación del manuscrito: 23/06/2019

Fecha de publicación: 31/06/2019

Resumen— En varias regiones del sur del Ecuador diferentes especies de plantas son usadas para tratar una variedad de dolencias. Tres extractos metanólicos de plantas usadas en la medicina tradicional en la provincia de Loja fueron investigadas con el objetivo de evaluar su posible potencial mutagénico y antimutagénico usando el ensayo de retromutación en *Salmonella typhimurium* (test de Ames) con las cepas bacterianas TA1535, TA100, TA1538, TA98 (ensayo de mutagenicidad), TA100 y TA98 (ensayo de antimutagenicidad) en ausencia de activación metabólica (-S9). Los extractos metanólicos de las hojas de *Baccharis latifolia* y *Callisia repens* dieron positivo para el ensayo de mutagenicidad. *Ludwigia peruviana* mostró propiedades antimutagénicas, contra al menos uno de los mutágenos ensayados. Estos resultados contribuyen a obtener valiosos datos sobre el uso seguro de las plantas medicinales y sus posibles efectos quimiopreventivos. Teniendo en cuenta las excelentes actividades antimutagénicas extraídas de *Ludwigia peruviana* estos extractos podrían ser buenas fuentes de agentes quimiopreventivos. Sin embargo, *Baccharis latifolia* y *Callisia repens* mostraron actividad mutagénica lo que sugiere precaución en su uso. La actividad mutagénica y antimutagénica de estas especies indican que son recursos valiosos para ser conservados y considerados para futuras investigaciones.

Palabras clave—Extractos metanólicos; Plantas medicinales; Test de Ames

Abstract—In various regions of the South of the Ecuador different plant species are used to treat a variety of ailments. Methanol extracts from plants used in traditional medicine in the province of Loja, were investigated with the objective of evaluating their possible potential mutagenic and antimutagenic using retromutation test in *Salmonella typhimurium* (Ames Test) with bacterial strains TA1535, TA1538, TA98 and TA100 (mutagenicity test), TA100 and TA98 (antimutagenicity test) in the absence of metabolic activation (-S9). Methanol extracts from the leaves of *Baccharis latifolia* and *Callisia repens* were positive for mutagenicity testing. *Ludwigia peruviana* was found to be strongly antimutagenic against at least one of the mutagens tested. These results contribute to valuable data on the safe use of medicinal plants and their potential chemopreventive effects. Considering the excellent antimutagenic activities extracted from *Ludwigia peruviana* these extracts are good candidate source of chemopreventive agent. However, *Baccharis latifolia* and *Callisia repens* showed mutagenic activity, suggesting caution in their use. The mutagenic and antimutagenic activity of these species indicates that they are valuable resources that should be conserved and considered for future research.

Keywords—Ames Test; Medicinal plants; Metanolic extracts

INTRODUCCIÓN

En la última década, el uso de plantas medicinales ha aumentado sustancialmente, ya sea como agentes empleados en medicina tradicional y/o como material de origen para la producción de suplementos dietéticos, tanto en culturas occidentales como asiáticas (Sponchiado *et al.*, 2016).

Se sabe que el uso de plantas medicinales tradicionales presentes en la dieta tiene una gran importancia farmacológica, atribuida a la presencia de diversos componentes fitoquímicos. Estos compuestos químicos presentes en las plantas transmiten sus efectos biológicos ya sea actuando exclusiva o sinérgicamente, a través de uno o más mecanismos diferentes (Khan *et al.*, 2018). El uso de plantas medicinales en la medicina popular se basa en el conocimiento empírico acumulado durante siglos por grupos étnicos (Espanha *et al.*, 2014). Desde la antigüedad, los hombres han utilizado las plantas medicinales en el tratamiento de diferentes enferme-

dades humanas (Lagarto Parra *et al.*, 2001; Marques *et al.*, 2003). Datos de restos fósiles humanos de aproximadamente 60.000 años atrás comprueban el uso de estas (Elgorashi *et al.*, 2003). Las plantas medicinales han sido muy usadas en preparaciones caseras para tratar diversas enfermedades en muchas culturas del mundo (Marques *et al.*, 2003). Hoy en día, el 80 % de la población de los países en desarrollo depende de medicamentos de origen vegetal para las necesidades de atención primaria de salud frente al aumento implacable de las enfermedades crónicas no transmisibles (Gumisiriza *et al.*, 2019); el 65 % de la población mundial confía en las plantas como una parte integral en el cuidado de su salud primaria (Elgorashi *et al.*, 2003), debido principalmente al alto costo de los fármacos o porque las medicinas tradicionales son, generalmente, más aceptables, asequibles y accesibles desde una perspectiva cultural y espiritual (Verschaeve *et al.*, 2004).

A menudo se supone que, debido a que las plantas son parte de la historia de la evolución humana, mientras que los productos sintéticos son recientes, los productos naturales no pueden causar daño alguno. En los últimos años, se han realizado estudios en donde se ha demostrado que algunas plantas contienen compuestos que pueden ser potenciales carcinogénicos para el hombre (Ames *et al.*, 1990). Pero un gran rango de evidencia epidemiológica y estudios de laboratorio han demostrado también que algunas plantas o algunos de sus principios activos aislados tienen efectos de protección contra la mutagénesis y carcinogénesis en humanos (Nogueira *et al.*, 2006). Estas diversas propiedades de las plantas medicinales se deben a la presencia de diversos constituyentes fitoquímicos, que incluyen alcaloides, antraquinonas, flavonoides, glucósidos, fenoles, saponinas, esteroides, esteroides, taninos, terpenoides, triterpenoides, fitoesteroides, hidrocarburos, mono y sesquiterpenos y muchos otros metabolitos presentes en estas plantas (Shaheen *et al.*, 2019).

El test de Ames (Mortelmans y Zeiger, 2000), usado en este estudio, es comúnmente un procedimiento rápido y relativamente simple para probar la mutagenicidad de los productos químicos y también previo al metabolismo de los productos químicos no mutagénicos a sus formas potencialmente reactivas al ADN (Zeiger, 2019). Una respuesta positiva en cualquiera de estas cepas bacterianas con y sin activación metabólica es suficiente para designar a una sustancia como mutagénica (Reid *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta el uso popular de *Baccharis latifolia* (Ruiz y Pav.) Pers., *Ludwigia peruviana* L. y *Callisia repens* (Jacq.) L., y el valioso papel de las sustancias quimiopreventivas que pueden tener estas plantas, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad mutagénica y antimutagénica de los extractos metanólicos de plantas ante las cepas de *Salmonella typhimurium* (las cuales requieren de histidina para su desarrollo) en ausencia de activación metabólica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y preparación de los extractos vegetales

El material vegetal (Tabla 1) fue recolectado en la provincia de Loja y Zamora Chinchipe durante los meses de verano. Los factores para decidir usar esta planta fueron sus usos etnobotánicos y su disponibilidad en el medio natural. Los es-

pecímenes fueron depositados en el herbario de la Planta de Productos Naturales de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL). Luego fue colocado en un secadero de bandejas a 37°C por 48 horas, con una humedad relativa del 10 % y un flujo continuo de aire. Una vez obtenido el material en las condiciones necesarias se disminuyó el tamaño de partícula de la planta a aproximadamente 1 cm con la finalidad de facilitar la penetración del solvente en el tejido vegetal. La extracción de los compuestos se realizó por maceración dinámica, a temperatura ambiente por 5 horas, con una relación solvente/planta 10:1. La velocidad de agitación fue de 1500-2000 rpm. Se utilizó metanol como solvente debido a su alta polaridad y baja selectividad, lo que permitió obtener un extracto que contuviera la mayor parte de los constituyentes químicos de la planta. Luego, el macerado fue sometido a filtración (papel filtro Whatman N° 1) al vacío por medio de una bomba de succión para separar los restos vegetales sólidos, y posteriormente se llevó a cabo la concentración de los extractos en un rotaevaporador a 30 °C y presión reducida, a una velocidad de 150 rpm hasta que se obtuvo un extracto sólido o semisólido. Finalmente, los extractos obtenidos fueron liofilizados hasta contener una humedad máxima del 4-6%. *Callisia repens* se trabajó solamente con el extracto sólido sin ser sometido a liofilización. Los extractos secos fueron guardados en viales a 4 °C.

Se pesaron y prepararon alícuotas de los extractos crudos y secos de las plantas, los cuales se disolvieron en dimetil sulfoxido DMSO (0,3162, 1,00, 3,1623, 10,00, 50,00 mg/ml) adquirido en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), luego se tomaron 200 μ l de cada extracto y se colocaron en 2 ml de agar medio mínimo junto con inóculo hasta obtener una concentración final de 10,00, 31,62, 100,00, 316,23, 1000 y 5000 μ g/placa para este tipo de estudio.

Ensayo de retromutación en Salmonella typhimurium

Se estudiaron las posibles actividades mutagénicas y antimutagénicas de los extractos de plantas medicinales utilizando el ensayo de Ames como se indica a continuación:

Cepas Bacterianas

Las cepas de *Salmonella typhimurium* histidina dependientes (his-) TA1535, TA100, TA1538 y TA98 fueron proporcionadas por el Laboratorio de Mutagénesis Ambiental de la Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México. Antes de usar las cepas bacterianas cada una fue verificada para los marcadores específicos de la cepa según lo descrito por Maron y Ames (1983). Para todos los ensayos se inocularon 200 μ l del cultivo de la reserva criogénica a 20 ml de caldo nutritivo Oxoid No. 2 (Oxoid, England) y se incubó por agitación leve (120 rpm) a 37°C por 14 a 16 horas en la oscuridad. Para las bacterias con el plásmido de resistencia a ampicilina (TA98 y TA100), el medio Oxoid se suplementó con 25 μ g/ml de ampicilina. Una vez concluida la incubación la densidad celular debía oscilar entre 1-2 por 10⁹ células por ml.

Ensayo de Mutagenicidad

La mutagenicidad fue evaluada por el test de Ames, basado en el método de incorporación en placa. Se adicionó en un

tubo 2,0 ml de agar de superficie (histidina/ biotina 0,5 mM), 100 μ l del cultivo bacteriano (aproximadamente 10⁹ cells) y 200 μ l de la solución de prueba (el extracto de la planta, el control negativo y el control positivo). Posteriormente, la mezcla fue agitada y vertida sobre la superficie de placas con agar medio mínimo. A continuación, se incubaron las placas en la oscuridad a 37°C por 72 h en posición invertida. Después de la incubación se contaron las colonias revertantes y se compararon con el número de colonias formadas en el cultivo no expuesto a la solución de prueba. Un extracto es considerado mutagénico cuando duplica el número de revertantes espontáneos con respecto a los controles negativos (control de solvente), según la regla de las dos veces. El control positivo fue azida sódica (sin activación metabólica) para TA100, TA1535 y 1-nitropireno (sin activación metabólica) para TA1538 y TA98. El control negativo fue el control del solvente DMSO (puro). La L-histidina monohidratada, la D-biotina, la azida sódica (AS) y el 1-nitropireno (NP) fueron adquiridas en Sigma Chemical Co.

La concentración de los controles positivos y extractos a analizar fue seleccionada con base en su toxicidad en un test preliminar determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido del Test LSD (Least significant difference) de Fisher mediante el programa de computación INFOSAT/Profesional versión 1.1. Una probabilidad de menos 0,05 fue considerada estadísticamente significativa. El índice de mutagenicidad (IM) fue calculado para cada dosis: cociente resultante de dividir el número de colonias revertantes inducidas entre las colonias revertantes espontáneas (control negativo). Un extracto es considerado mutágeno positivo cuando $IM \geq 2$ en por lo menos una de las dosis probadas (Nogueira *et al.*, 2006). Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

Ensayo de Antimutagenicidad

El procedimiento para el ensayo de antimutagenicidad fue similar al descrito para el ensayo de mutagenicidad excepto que en cada tubo del agar de superficie que contenía la bacteria y el extracto, el agente mutagénico fue también agregado. Para evaluar el índice de antimutagénesis se calculó el porcentaje de inhibición de la mutagenicidad (%IM) según la fórmula siguiente propuesta por B. Lakshmi (Lakshmi *et al.*, 2006):

$$\text{Inhibicin \% Mutagenicidad} = \left[\frac{(R1 - RE) - (R2 - RE)}{(R1 - RE)} \right] \times 100$$

Donde R1 es el número de revertantes sin extracto con mutágeno, R2 es el número de revertantes con extracto y mutágeno y RE es el número de revertantes espontáneos. Se demuestra un efecto no antimutagénico cuando da un valor por debajo del 0-20% (negativo), un efecto débil cuando da un valor entre 20 y 40%, se considera antimutágeno (positivo) cuando da un valor entre el 40-60%, de 60 a 90% como muy buenos antimutágenos y valores >90% hay sospecha de toxicidad (Wall *et al.*, 1988; Ohtsuka *et al.*, 1995). Los mutágenos directos usados en este test sin activación metabólica fueron azida sódica (TA100) y 1-nitropireno (TA98). Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

RESULTADOS

Test de Mutagenicidad

En la Tabla 1 se muestra una lista de las plantas investigadas en este estudio, su uso etnofarmacológico y la parte de la planta que usan en diferentes comunidades de la zona. Los extractos metanólicos de *Baccharis latifolia* y *Callisia repens* reportaron actividad mutagénica: la Tabla 2 muestra la media de revertantes espontáneas por plato, la desviación estándar y la ratio de mutagenicidad después de los tratamientos con los tres extractos de plantas, observado en *S. typhimurium* cepas TA1535, TA1538, TA98 y TA100 en ausencia de activación metabólica (-S9). Los resultados muestran que las más altas concentraciones de *Baccharis latifolia* demostraron actividad mutagénica contra las cepas TA1538 (2,74 a 5000 μ g/placa) y TA98 (3,12 a 5000 μ g/placa) de *Salmonella typhimurium*, en ausencia de activación metabólica (-S9). Así también, *Callisia repens* reportó actividad mutagénica en ausencia de activación metabólica (-S9) contra las cepas TA 1535, TA1538 y TA98 a una concentración de 5000 μ g/placa (5,79, 7,20 y 3,61 respectivamente), induciendo un incremento en el número de colonias revertantes con respecto al control negativo, indicando actividad mutagénica. El extracto metanólico de *Ludwigia peruviana* no mostró actividad mutagénica pues no se evidenció aumento relativo del número de revertantes espontáneas por placa frente al control negativo en ausencia de actividad metabólica.

Test de Antimutagenicidad

Para el ensayo de antimutagenicidad, un resultado fue considerado positivo cuando el porcentaje de inhibición (%I) del mutágeno 1-nitropireno (TA98) y azida sódica (TA100) fue mayor o igual al 40% sin activación metabólica (-S9). Los extractos de las tres plantas en este estudio mostraron actividad antimutagénica como se puede apreciar en la Tabla 3. Sin embargo, los extractos metanólicos de *Baccharis latifolia* y *Callisia repens* presentaron toxicidad en sus más altas concentraciones al ser evaluadas junto con los mutágenos ya que se pudo apreciar una disminución considerable del tapete celular (background), lo cual determina si una sustancia es considerablemente tóxica y a la vez por los resultados obtenidos de estas dos plantas al ser consideradas que contienen compuestos mutagénicos. El extracto metanólico de las hojas de *Ludwigia peruviana* presentó potencial antimutagénico frente al mutágeno 1-nitropireno en *Salmonella typhimurium* TA98 a concentraciones de 316,23, 1000,00 y 5000,00 μ g/placa (53,05%, 76,70% y 91,10% respectivamente) y puede considerarse un antimutágeno fuerte, ya que mostro más del 40% de inhibición en tres de las concentraciones ensayadas. No así frente al mutágeno azida sódica donde no se pudo apreciar un porcentaje de inhibición considerable.

DISCUSIÓN

Las plantas medicinales han sido utilizadas tradicionalmente alrededor del mundo para el tratamiento de varias enfermedades humanas (Resende *et al.*, 2012), especialmente en áreas rurales remotas y entre las minorías étnicas de la sociedad moderna, como una necesidad para personas con

Tabla 1: Plantas medicinales usadas en la provincia de Loja y Zamora Chinchipe, su uso medicinal y parte de la planta usada. a= Tene et al., 2007; b= Singh et al., 2002; c= Leonti et al., 2003; d= Bourdy et al., 2004; e= De Feo, 2003.

Especies de plantas	Familia	Uso medicinal	Parte de la planta
Baccharis latifolia	Asteraceae	Tratamiento de la gangrena, cólico estomacal, cólico hepático y reumatismo (a).	Hojas
Callisia repens	Commelinaceae	transtornos nerviosos, en el tratamiento de la gangrena, fiebre, gastritis, reumatismo, hipertensión e infecciones (a)	Hojas
ruviana	Onagraceae	Diurético, para tratar el cólico hepático (a), para reducir la temperatura corporal mezclado con aceite de mostaza (b), para tratar enfermedades de la piel (c). Además se ha usado la infusión de las hojas para el dolor de estómago (d). Una decocción de la planta entera se prescribe para tratar las inflamaciones de la mucosa gástrica y en el tratamiento de dolores de cabeza (e).	Hojas

pocos recursos económicos o asistencia médica inaccesible (Corroto *et al.*, 2019). Lamentablemente, existe poca evidencia científica sobre los efectos que podría traer el uso indiscriminado de plantas medicinales, así como su beneficio, razón por la cual es necesario evaluar el potencial mutagénico y antimutagénico de diferentes extractos de plantas por el riesgo que estas podrían provocar a la salud humana pero también el beneficio que podrían traer. La ausencia de una respuesta mutagénica por extractos de plantas contra cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium* en el ensayo de Ames es un paso positivo para determinar el uso seguro de las plantas utilizadas en la medicina tradicional. Sin embargo, los extractos de plantas que muestran una respuesta positiva y, por lo tanto, un efecto mutagénico deben investigarse exhaustivamente para determinar su posible genotoxicidad para los seres humanos ya que su uso seguro en la medicina tradicional es cuestionable (Reid *et al.*, 2006). Se requiere un cribado para identificar y erradicar el uso de todas las plantas mutagénicas, ya que numerosos estudios han demostrado que la proporción de carcinógenos identificados como mutágenos por la prueba Ames oscila entre aproximadamente 50% y 90%. En Ecuador, las plantas medicinales *Baccharis latifolia*, *Callisia repens* y *Ludwigia peruviana* se usan en la medicina tradicional para el tratamiento de la gangrena, reumatismo, cólico y tratamiento de dolores de cabeza, son popularmente conocidas como “chilca”, “calcha”, “mejorana” respectivamente y crecen de forma silvestres en la vegetación de la región sur del Ecuador (Tene *et al.*, 2007). Los resultados de este estudio demuestran ausencia de actividad mutagénica en extractos de hojas de *Ludwigia peruviana* en todas las concentraciones ensayadas en las cuatro cepas de *S. typhimurium*, ya que el número de colonias revertantes observadas en cada placa de ensayo fue menos del doble que en el control negativo (Mortelmans y Zeiger, 2000). Sin embargo, el extracto de *Baccharis latifolia* duplicó el número de colonias revertantes en las cepas TA1538 y TA98 en ausencia de activación metabólica, lo que sugiere una capacidad para causar mutaciones de desplazamiento de marco de lectura. En las cepas TA1535, TA100 y TA1538, la dosis/respuesta de *Callisia repens* aumentó hasta una relación de mutagenicidad de 5,79, 3,61 y 7,20 respectivamente, dando evidencia de muta-

genicidad en ausencia de activación metabólica y puede ser considerado un inductor de mutaciones por sustitución de pares de bases y mutaciones con desplazamiento del marco de lectura respectivamente. Estudios fitoquímicos en el extracto metanólico de *Baccharis latifolia* demuestran la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, esteroides, lactonas sesquiterpénicas, cumarinas y aceites esenciales en esta especie. Así, también se demuestra la presencia de alcaloides, esteroides y lactonas sesquiterpénicas en *Callisia repens* (Ordóñez Vivanco *et al.*, 2006). Esta actividad mutagénica podría ser atribuible a ciertos flavonoides que se ha comprobado ser potentes mutágenos en diversas especies de plantas (Ames *et al.*, 1990). Considerando que algunos alcaloides presentan un potencial genotóxico, se podría suponer que estos son los responsables o estarían envueltos en la inducción de la mutagenicidad por los extractos (Elgorashi *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2003). Los resultados positivos en el test de Ames de los extractos metanólicos de *Callisia repens* y *Baccharis latifolia* sugieren que el uso indiscriminado de preparaciones de esta planta podría ser peligroso para la salud. Por ejemplo, se ha observado que los téis de hierbas y los complementos alimenticios de plantas contienen frecuentemente alcaloides de pirrolizidina tóxicos que han demostrado ser hepatotóxicas, genotóxicas y carcinógenas en ratas y otros roedores experimentales (Chen *et al.*, 2019). dos Santos *et al.* (2018), en sus estudios de genotoxicidad evalúan un compuesto presente en el género *Baccharis* (trimerosido), el cual demostró actividad mutagénica en la cepa TA100 con activación metabólica; algunos estudios sugieren que estas plantas están vinculadas a un estrés oxidativo que induce daño en el ADN, traduciendo-se en efectos genotóxicos (Menezes *et al.*, 2016) y actividad mutagénica (Rodrigues *et al.*, 2009).

Muchas plantas se han utilizado en la medicina tradicional para tratar o prevenir el cáncer, los productos naturales presentan una gran diversidad estructural que permite el descubrimiento de nuevos fármacos (dos Santos *et al.*, 2018). Las propiedades antimutagénicas de diferentes compuestos que poseen diferentes plantas tienen un gran rango de aplicaciones en el cuidado de la salud humana (Ramos *et al.*, 2003). Sustancias con esta propiedad podrían ser usadas para combatir el daño causado por agentes mutágenos ambienta-

Tabla 2: Actividad mutagénica expresada como la media \pm DS (desviación estándar) e IM (Índice de Mutación) de tres placas, del número de revertantes his+/placa en las cepas bacterianas TA1535, TA100, TA1538 y TA98 expuestas al extracto metanólico de *Baccharis latifolia*, *Ludwigia peruviana* y *Callisia repens* a varias dosis sin activación metabólica (S9-). 0= control negativo 200 μ l DMSO (dimetil sulfóxido). Controles positivos: S9- = 0,125 g/placa de azida de sodio para TA100 y TA1535; 0,125 μ g/placa de 1-Nitropireno para TA98 y TA1538. RE= revertantes espontáneos. Los resultados son reportados como la media. * $p < 0,05$: LSD Fisher.

Dosis μ g/placa	Número de revertantes his+/placa en <i>Salmonella typhimurium</i> (IM)			
	TA1535	TA100	TA1538	TA98
	S9-	S9-	S9-	S9-
Baccharis Latifolia				
0 (DMSO)	21,11 \pm 2,59	152,06 \pm 38,70	11,67 \pm 2,52	18,33 \pm 4,25
10,00	16,00 \pm 3,46 (0,76)	148,22 \pm 34,86 (0,97)	11,44 \pm 3,20 (0,98)	20,33 \pm 5,24 (1,11)
31,62	18,89 \pm 3,20 (0,89)	146,22 \pm 39,16 (0,96)	10,00 \pm 4,17 (0,86)	18,55 \pm 4,22 (1,01)
100,00	22,11 \pm 3,37 (1,05)	159,67 \pm 20,63 (1,05)	12,00 \pm 2,02 (1,03)	16,56 \pm 2,72 (0,90)
316,23	19,44 \pm 1,54 (0,92)	171,78 \pm 33,43 (1,13)	13,00 \pm 2,18 (1,11)	17,67 \pm 4,67 (0,96)
1000,00	20,00 \pm 2,60 (0,95)	165,00 \pm 33,03 (1,09)	14,00 \pm 2,89 (1,20)	33,78 \pm 15,25 (1,84)*
5000,00	17,37 \pm 1,73 (0,85)	196,67 \pm 10,02 (1,28)	32,00 \pm 8,00 (2,74)*	51,71 \pm 19,57 (3,12)*
Control+	113,56 \pm 24,37	296,00 \pm 18,36	36,67 \pm 1,53	86,67 \pm 28,24
R.E	21,78 \pm 2,71	151,78 \pm 34,72	12,44 \pm 1,93	19,56 \pm 0,51
Ludwigia peruviana				
0 (DMSO)	18.22 \pm 3.10	146.87 \pm 45.36	10.11 \pm 1.34	23.89 \pm 3.47
10,00	21.44 \pm 2.5 (1.18)	138.00 \pm 30.05 (0,94)	9.44 \pm 2.69 (0,93)	19.67 \pm 2.97 (0.82)
31,62	20.34 \pm 1.15 (1.12)	139.78 \pm 31.84 (0,95)	9.00 \pm 0.33 (0.89)	19.67 \pm 0.88 (0.82)
100,00	20.67 \pm 4.25 (1.13)	141.22 \pm 28.69 (0,96)	10.44 \pm 1.71 (1,03)	20.67 \pm 3.21 (0.87)
316,23	20.72 \pm 1.55 (1.14)	144.00 \pm 27.13 (0,98)	9.55 \pm 3.97 (0,94)	18.00 \pm 4.10 (0.75)
1000,00	19.78 \pm 1.07 (1.09)	156.22 \pm 34.05 (1.06)	9.78 \pm 2.87 (0,97)	19.67 \pm 1.34 (0.82)
5000,00	19.33 \pm 2.08 (1.06)	150.00 \pm 5.00 (1,02)	8.00 \pm 1.00 (0,79)	22.67 \pm 1,15(0,95)
Control+	118.94 \pm 23,69	277.67 \pm 30,89	27.55 \pm 2,34	88.44 \pm 18,59
R.E	20.22 \pm 3,66	156.33 \pm 29,81	9.22 \pm 3,03	22.78 \pm 1,02
Callisia repens				
0 (DMSO)	18.89 \pm 2,59	124.67 \pm 9,87	10.78 \pm 0,39	21.78 \pm 0,84
10,00	19.11 \pm 0,84(1,01)	115.00 \pm 15,00(0,92)	10.22 \pm 0,84(0,95)	22.56 \pm 1,17(1,04)
31,62	21.00 \pm 0,67(1,11)	120.67 \pm 11,02(0,97)	11.56 \pm 0,51(1,07)	22.11 \pm 0,38(1,02)
100,00	21.56 \pm 0,51(1,14)	115.67 \pm 17,21(0,93)	13.22 \pm 1,50(1,23)	22.22 \pm 0,51(1,02)
316,23	24.22 \pm 0,51(1,28)*	121.67 \pm 17,01(0,98)	15.22 \pm 0,84(1,41)*	27.90 \pm 1,89(1,28)
1000,00	36.00 \pm 0,67(1,91)*	126.67 \pm 16,50(1,02)	20.11 \pm 1,34(1,87)*	28.11 \pm 0,38(1,29)
5000,00	109.44 \pm 7,04(5,79)*	154.67 \pm 9,02(1,24)	77.55 \pm 1,35(7,20)*	78.56 \pm 13,17(3,61)*
Control+	112.11 \pm 5,01	229.33 \pm 3,06	41.11 \pm 6,48	89.80 \pm 0,96
R.E	17.89 \pm 1,50	127.00 \pm 3,00	12,11 \pm 1,02	24.44 \pm 1,02

les a los que estamos expuestos diariamente (Nogueira *et al.*, 2006). *Ludwigia peruviana* mostró en este estudio un efecto antimutagénico; aunque el extracto posee varios compuestos activos como triterpenos, -carotenos, alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos (Ordóñez Vivanco *et al.*, 2006), la actividad antimutagénica podría relacionarse por lo menos en parte a la clorofila contenida en el extracto (Osuna-Ruiz *et al.*, 2016). Esta asunción está de acuerdo con muchos estudios, presentándose una correlación positiva entre el contenido de clorofila de las plantas y la actividad antimutagénica (Nogueira *et al.*, 2006); igualmente, a ciertos compuestos flavonoides se les atribuyó su actividad antimutagénica por su hidrofobicidad (Khan *et al.*, 2018) y fuerte actividad antioxidante (Osuna-Ruiz *et al.*, 2016). Numerosos alcaloides seleccionados de plantas medicinales y hierbas (vinblastina, vinorelbina, vincristina) mostraron efectos antiproliferativos y anticancerosos en una amplia categoría de cánceres tanto in

vitro como in vivo, desarrollándose con éxito medicamentos contra el cáncer (Mondal *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos con este extracto animan más allá la investigación para identificar y aislar los compuestos químicos presentes en este, así como intentar elucidar el mecanismo envuelto en la antimutagénesis.

Diferentes extractos pueden tener propiedades mutagénicas/antimutagénicas. La razón puede ser atribuible a la mezcla compleja de componentes, algunos de los compuestos presentes en las plantas pueden ser capaces de defender la vida de maneras distintas (Park *et al.*, 2004). El hecho de que los extractos de plantas sean mezclas complejas (Elgorashi *et al.*, 2003) de compuestos orgánicos dificulta especular cuál de estos compuestos es responsable de las propiedades diferentes que presentan los extractos de plantas medicinales (Verschaeve *et al.*, 2004).

Tabla 3: Antimutagenicidad de los extractos metanólicos de *Baccharis latifolia*, *Ludwigia peruviana* y *Callisia repens* expresado como el porcentaje de inhibición del mutágeno 1-nitropireno 0,5 ug/placa (TA98) y Azida sódica 0.5 ug/placa (TA100) sin activación metabólica (S9-), en las cepas bacterianas TA98 y TA100. a Toxicidad aparente

Especies de plantas	Concentraciones probadas (ug/placa)	Salmonella typhimurium (% inhibición)	
		TA98	TA100
<i>Baccharis latifolia</i>	10,00	8,68	-0,73
	31,62	11,41	-2,45
	100,00	17,48	1,35
	316,23	29,81	0,13
	1000,00	63,00	3,97
	5000,00	90,90a	10,22
<i>Callisia repens</i>	10,00	19,50	4,28
	31,62	20,86	7,73
	100,00	33,42	11,81
	316,23	56,04a	7,94
	1000,00	80,79a	5,59
	5000,00	89,70a	8,16
<i>Ludwigia peruviana</i>	10,00	12,39	0,08
	31,62	20,62	2,38
	100,00	27,27	2,56
	316,23	53,05	-0,05
	1000,00	76,70	-1,24
	5000,00	91,10	-9,86

CONCLUSIONES

Los resultados revelaron que la evaluación de la actividad mutagénica y antimutagénica de los extractos totales de *Baccharis latifolia* (mutagénico), *Ludwigia peruviana* (antimutagénico) y *Callisia repens* (mutagénico) mostraron resultados positivos para esta prueba. La forma de actuar de los compuestos mutágenos fue principalmente por mutaciones por desplazamiento del marco de lectura (frameshift) o por sustitución de pares de bases. El efecto antimutagénico principalmente está determinado por contrarrestar las mutaciones por desplazamiento del marco de lectura. Estas actividades se pueden atribuir al efecto sinérgico de diferentes fitoconstituyentes presentes en las hojas. Con base en los resultados del presente estudio se sugiere seguir con el estudio del extracto metanólico de *Ludwigia peruviana* por los posibles efectos terapéuticos que esta planta puede tener, mientras tanto los extractos de *Callisia repens* y *Baccharis latifolia* deberán estudiarse más en profundidad en ensayos genotóxicos. Igualmente se recomienda realizar el estudio de estos ensayos con activación metabólica ya que muchos compuestos requieren ser activados para ejercer su función.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al Departamento de Química y Ciencias Exactas (antes Planta de Productos Naturales) de la Universidad Técnica Particular de Loja, por haber permitido la culminación de este trabajo de investigación, en especial al Dr. Iván Burneo, guía de este proyecto.

REFERENCIAS

- Ames, B. N., Profet, M., y Gold, L. S. (1990). Dietary pesticides (99.99% all natural). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(19), 7777–7781.
- Chen, L., Mulder, P. P., Peijnenburg, A., y Rietjens, I. M. (2019). Risk assessment of intake of pyrrolizidine alkaloids from herbal teas and medicines following realistic exposure scenarios. *Food and Chemical Toxicology*, 130, 142–153.
- Corroto, F., Torres, O. A. G., y Macía, M. J. (2019). Different patterns in medicinal plant use along an elevational gradient in northern peruvian andes. *Journal of ethnopharmacology*, 239, 111924.
- dos Santos, M. S., da Silva, J., Menezes, A. P. S., de Barros, F. M. C., Lemes, M. L. B., Rossatto, R. R., ... others (2018). Biotoxicological analyses of trimeroside from *baccharis trimera* using a battery of in vitro test systems. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.
- Elgorashi, E. E., Taylor, J. L., Maes, A., van Staden, J., De Kimpe, N., y Verschaeve, L. (2003). Screening of medicinal plants used in south african traditional medicine for genotoxic effects. *Toxicology letters*, 143(2), 195–207.
- Espanha, L. G., Resende, F. A., Neto, J. d. S. L., Boldrin, P. K., Nogueira, C. H., De Camargo, M. S., ... Varanda, E. A. (2014). Mutagenicity and antimutagenicity of six brazilian byrsonima species assessed by the ames test. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 182.
- Gumisiriza, H., Birungi, G., Olet, E. A., y Sesazzi, C. D. (2019). Medicinal plant species used by local communities around queen elizabeth national park, maramagambo central forest reserve and ihmbo central forest reserve, south western uganda. *Journal of ethnopharmacology*, 239, 111926.
- Khan, M. S., Abul Qais, F., Ahmad, I., Hussain, A., y Alajmi, M. F. (2018). Genotoxicity inhibition by *syzygium cumini* (L.) seed fraction and rutin: understanding the underlying mechanism of dna protection. *Toxicology*

- research*, 7(2), 156–171.
- Lagarto Parra, A., Silva Yhebra, R., Guerra Sardiñas, I., y Iglesias Buela, L. (2001). Comparative study of the assay of artemia salina l. and the estimate of the medium lethal dose (ld50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5), 395–400.
- Lakshmi, B., Ajith, T., Jose, N., y Janardhanan, K. (2006). Antimutagenic activity of methanolic extract of ganoderma lucidum and its effect on hepatic damage caused by benzo [a] pyrene. *Journal of ethnopharmacology*, 107(2), 297–303.
- Marques, R. C. P., de Medeiros, S. R. B., da Silva Dias, C., Barbosa-Filho, J. M., y Agnez-Lima, L. F. (2003). Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of ocoetea duckei by the ames test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 536(1-2), 117–120.
- Menezes, A. P. S., da Silva, J., Fisher, C., da Silva, F. R., Reyes, J. M., Picada, J. N., ... others (2016). Chemical and toxicological effects of medicinal baccharis trimera extract from coal burning area. *Chemosphere*, 146, 396–404.
- Mondal, A., Gandhi, A., Fimognari, C., Atanasov, A. G., y Bishayee, A. (2019). Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. *European journal of pharmacology*, 858, 172472.
- Mortelmans, K., y Zeiger, E. (2000). The ames salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 455(1-2), 29–60.
- Nogueira, M. E. I., Passoni, M. H., Biso, F. I., do Carmo Longo, M., Cardoso, C. R. P., Dos Santos, L. C., y Varanda, E. A. (2006). Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of melampodium divaricatum in salmonella typhimurium. *Toxicology in vitro*, 20(3), 361–366.
- Ohtsuka, M., Fukuda, K., Yano, H., y Kojiro, M. (1995). Effects of nine active ingredients in chinese herbal medicine sho-saiko-to on 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide mutagenicity. *Japanese journal of cancer research*, 86(12), 1131–1135.
- Ordóñez Vivanco, P., Vega Esparza, M., y Malagón Avilés, O. (2006). Phytochemical study of native plant species used in traditional medicine in loja province. *Lyonia*(10), 65–71.
- Osuna-Ruiz, I., López-Saiz, C.-M., Burgos-Hernández, A., Velázquez, C., Nieves-Soto, M., y Hurtado-Oliva, M. A. (2016). Antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweed species from sinaloa, mexico. *Pharmaceutical biology*, 54(10), 2196–2210.
- Park, K.-Y., Jung, G.-O., Lee, K.-T., Choi, J., Choi, M.-Y., Kim, G.-T., ... Park, H.-J. (2004). Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of rhus verniciflua. *Journal of ethnopharmacology*, 90(1), 73–79.
- Ramos, A., Visozo, A., Piloto, J., Garcia, A., Rodriguez, C., y Rivero, R. (2003). Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in cuban medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 87(2-3), 241–246.
- Reid, K., Maes, J., Maes, A., Van Staden, J., De Kimpe, N., Mulholland, D., y Verschaeve, L. (2006). Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of south african plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(1), 44–50.
- Resende, F. A., Munari, C. C., De Azevedo Bentes Monteiro Neto, M., Tavares, D. C., Bastos, J. K., da Silva Filho, A. A., y Varanda, E. A. (2012). Comparative studies of the (anti) mutagenicity of baccharis dracunculifolia and artemisia annua by the bacterial reverse mutation test. *Molecules*, 17(3), 2335–2350.
- Rodrigues, C. R., Dias, J. H., de Mello, R. N., Richter, M. F., Picada, J. N., y Ferraz, A. B. (2009). Genotoxic and antigenotoxic properties of baccharis trimera in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(1), 97–101.
- Shaheen, G., Akram, M., Jabeen, F., Ali Shah, S. M., Munir, N., Daniyal, M., ... others (2019). Therapeutic potential of medicinal plants for the management of urinary tract infection: A systematic review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 46(7), 613–624.
- Sponchiado, G., Adam, M. L., Silva, C. D., Soley, B. S., de Mello-Sampayo, C., Cabrini, D. A., ... Otuki, M. F. (2016). Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *Journal of ethnopharmacology*, 178, 289–296.
- Tene, V., Malagon, O., Finzi, P. V., Vidari, G., Armijos, C., y Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in loja and zamora-chinchipe, ecuador. *Journal of ethnopharmacology*, 111(1), 63–81.
- Verschaeve, L., Kestens, V., Taylor, J., Elgorashi, E., Maes, A., Van Puyvelde, L., ... Van Staden, J. (2004). Investigation of the antimutagenic effects of selected south african medicinal plant extracts. *Toxicology in vitro*, 18(1), 29–35.
- Wall, M. E., Wani, M. C., Hughes, T. J., y Taylor, H. (1988). Plant antimutagenic agents, 1. general bioassay and isolation procedures. *Journal of natural products*, 51(5), 866–873.
- Zeiger, E. (2019). The test that changed the world: The ames test and the regulation of chemicals. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 841, 43–48.