

## ARTÍCULO ORIGINAL

## Evaluación genotóxica del aceite esencial y el extracto etanólico de *Piper elongatum* Vahl

### Genotoxic evaluation of essential oil and ethanolic extract of *Piper elongatum* Vahl

Ana Paula Jiménez Dasilba<sup>1</sup>, Araceli Pillco Tito<sup>2</sup>, Ninoska Flores Quisbert<sup>1</sup>, Eduardo Gonzáles Dávalos<sup>1</sup>, Paulia Bermejo Benito<sup>3</sup>

<sup>1</sup>UMSA - FCFB - Instituto de Investigación fármaco Bioquímicas. La Paz. Bolivia.

<sup>2</sup>Laboratorio de Mutagénesis del Centro de Ciencias Medio ambientales del CSIC-Madrid España.

<sup>3</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

Dirección para correspondencia: Eduardo Gonzáles Dávalos Ph.D. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra #2224, Miraflores, La Paz, Bolivia

Teléfono 2229021

Email: eduardo.gonzales@gmail.com

Recibido para publicación en: 7/11/11

Aceptado en 24/12/11

#### RESUMEN

Se realizó la evaluación genotóxica del aceite esencial y el extracto etanólico de *Piper elongatum* Vahl mediante la prueba *in vivo* de mutación y recombinación somática (SMART), que emplea a *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) como organismo experimental. Se utilizaron dos diferentes tipos de cruces con los marcadores genéticos *flr*<sup>3</sup> y *mwh*: El cruce Estándar (ST) y el cruce de Alta Bioactivación (HB); como control positivo se empleó Mitomicina C (MMC). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el estadístico de *Kastenbaum-Bowman* ( $\alpha = 0,05$ ), y sugieren que el extracto etanólico de *Piper elongatum* Vahl a concentraciones por debajo de 100mg/ml, así como el aceite esencial en concentraciones por debajo de 0.5% (p/v), no producen daño genotóxico detectado mediante la prueba de SMART.

**Palabras Clave:** *Piper elongatum* Vahl, aceite esencial, genotoxicidad, SMART y Mitomicina C.

#### ABSTRACT

Genotoxic studies of the essential oil and ethanol extract of *Piper elongatum* Vahl was conducted by testing *in vivo* somatic mutation and recombination (SMART), which employs *Drosophila melanogaster* (fruit fly). Two types of crosses were used with genetic markers *flr*<sup>3</sup> and *mwh*. The Standard cross (ST) and high

bioactivation cross (HB), was employed, as a positive control mitomycin C (MMC) was used. The results were analyzed using statistical *Kastenbaum-Bowman* ( $\alpha = 0.05$ ) and they suggest that the ethanol extract of *Piper elongatum* Vahl at concentrations below 100mg/ml, and the essential oil at concentrations below 0.5% (w / v), do not produce genotoxic damage detected by the SMART test.

**Key Words:** *Piper elongatum* Vahl, essential oil, genotoxicity, SMART and MMC.

#### INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales han sido utilizadas desde principio de los tiempos como fuente primaria para la elaboración de medicamentos. Las culturas asiáticas, hindúes y anglosajonas son líderes en el empleo de la medicina tradicional, proporcionando datos importantes de la utilización de estos recursos<sup>1</sup>.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), hasta 1996 el 80% de la población mundial utilizaba las plantas medicinales en atención primaria. También es importante destacar que cerca de 7 mil fármacos provienen de conocimientos botánicos<sup>2</sup> y que actualmente las investigaciones farmacéuticas están enfocadas a buscar principios activos de diversas especies vegetales<sup>3</sup>.

Debido a las características ecológicas de Bolivia, se puede apreciar una amplia variedad de especies vegetales (3.000 especies reconocidas hasta el 2006), que son empleadas como medicina tradicional por diversas culturas. En este sentido, la cultura Kallawayá ha contribuido al conocimiento del uso y manejo de plantas medicinales que se desarrollan en la región altiplánica<sup>4</sup>.

Los recursos genéticos representan oportunidades para impulsar el desarrollo económico, enmarcado dentro la sostenibilidad y equidad social. Estos recursos genéticos necesitan ser conservados junto al conocimiento tradicional, por ello se están incentivando diversas investigaciones<sup>5</sup>.

El Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas (IIFB) está realizando continuas investigaciones para valorar la actividad biológica de varias especies vegetales. Por ejemplo, se ha demostrado los efectos antiparasitarios y genotóxicos de *Galipea longiflora* (Evanta)<sup>5</sup> y *Baccharis latifolia* (Chillka). Respecto a la especie *Piper elongatum* Vahl se ha probado actividades antiinflamatorias, antifúngicas contra *Neurospora crassa*, cicatrizantes, efecto anti-*Helicobacter pylori* y efecto antiparasitario frente a *Leishmania*<sup>6,7</sup>.

*Piper elongatum* Vahl crece en la región de Sud Yungas de Bolivia, es conocida comúnmente como “Matico”. La medicina tradicional la emplea como antiinflamatorio, hemostático, antiséptico<sup>8</sup> y anti-infeccioso, descongestivo, contra la leucorrea y antiparasitario<sup>9</sup>. Esta especie posee en sus hojas un grupo de compuestos químicos llamados los crómenos, que han evidenciado efectos tóxicos en células y bacterias. Otros metabolitos secundarios presentes son los derivados del ácido benzoico prenilados que poseen actividad anti-bacteriana, citotóxica y las dihidrochalconas que poseen actividad contra los parásitos de *Leishmania*, además de una marcada relación de estructura-actividad contra el moho<sup>10, 11, 12, 13, 14</sup>.

Las características benéficas demostradas por *Piper elongatum* Vahl sugieren la necesidad de profundizar las investigaciones, por ello en este trabajo de investigación se emplea un ensayo biológico *in vivo* denominado “Test de Mutación y Recombinación Somática” (SMART), que utiliza a *Drosophila melanogaster* como organismo experimental, para evaluar los niveles de genotoxicidad de esta especie vegetal.

Teniendo en cuenta la situación actual de los estudios genotóxicos de las plantas medicinales, específicamente de *Piper elongatum* Vahl (Matico) y conociendo las características antiinflamatoria, antifúngica, cicatrizante y antiparasitaria de este género, además de estar catalogada como una especie ampliamente utilizada por la población boliviana, es necesario que se realicen estudios de toxicidad y genotoxicidad.

En el presente trabajo se evalúa la genotoxicidad del aceite esencial y del extracto etanólico de las hojas de *Piper elongatum* Vahl.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Recolección y preparación del material vegetal.** La especie vegetal *P. elongatum* fue recolectada del área de Sud Yungas del Cantón de Chicaloma (16°26'41.54"S; 67°28'47.85" W), población de Irupana ubicado en el departamento de La Paz. Se realizó la verificación de la especie vegetal con ayuda del Herbario Nacional de Bolivia LPB, Voucher 1p. Se pesó 500 g de la planta seca y pulverizada, se realizó una maceración con 2 litros de etanol destilado al 70% durante 48 horas a temperatura ambiente, posteriormente el macerado se filtró con ayuda de gasa y algodón, separando de esta manera la parte acuosa del residuo. Se procedió a concentrar el extracto acuoso, por rota vaporación (marca Laborata 4000 efficient – Heidolph HB digital) a 120rpm y 40°C.

**Obtención del aceite esencial.** Para la obtención del aceite esencial, se pesó 500g de hojas secas, las mismas fueron desmenuzadas y colocadas en el destilador realizándose así una extracción del aceite esencial mediante destilación por arrastre de vapor de agua.

**Test de Mutación y Recombinación Somática en *Drosophila melanogaster***<sup>15</sup>. Para la determinación de la toxicidad del extracto etanólico y el aceite esencial, se emplearon 100 larvas de tercer instar de *Drosophila melanogaster* a diferentes concentraciones, tanto para el cruce Estándar (ST) como para el cruce de alta Bioactivación (HB), utilizando como control negativo Tween al 3.5% (disolvente del extracto y aceite esencial). Como parámetro para determinar la toxicidad de un compuesto, se utilizó el porcentaje de sobrevivencia de los individuos tratados, considerando como dosis tóxica cuando el porcentaje de sobrevivencia fuese menor a 60% y una dosis sub-tóxica cuando el porcentaje de sobrevivencia fuese mayor a 60%

**Tratamiento de individuos.** Para la evaluación de la genotoxicidad tanto del extracto (75, 50, 25 mg/ml) como del aceite esencial (0.5, 0.1, 0.05 y 0.01%), se procedió al recuento de las larvas de tercer instar procedentes de los cruce Estándar y Alta Bioactivación. En un número de 100 larvas por cada concentración de muestra empleada, fueron trasladados a sus respectivos frascos que contenían 1.5 g de *Drosophila* Instant Medium (Carolina Biological Supply, Burlington) y 5 mL de extracto por un lapso de 48 horas. Una vez desarrolladas las larvas que sobrevivieron hasta convertirse en moscas adultas, fueron recontadas y recolectadas en frascos con etanol al 70% para su

mantenimiento. Este procedimiento se realizó para cada una de las 2 etapas bajo las mismas condiciones de 25°C y 60% de humedad relativa.

Para el análisis de las alas tanto del cruce Estándar como el cruce de Alta Bioactivación se tomaron en cuenta los genotipos Trans-heterocigoto (*mwh/flr<sup>3</sup>*) y Heterocigoto (*mwh/TM3*), tanto de machos como de hembras que fueron fijadas con solución de Faure en portaobjetos, según el procedimiento de Graf y col. (2000). La lectura se realizó tomando en cuenta las diferentes áreas en que se subdivide el ala de la mosca descrita por Graf y col. (1984), donde se buscan marcadores genéticos *fl<sup>3</sup>* o *mwh*<sup>16,17</sup>.

## RESULTADOS

Las hojas secas de la planta fueron sometidas a una extracción por arrastre de vapor para obtener el aceite esencial, con un rendimiento del 3.26% (15 ml); por otra parte se determinó que la densidad del aceite fue de 0.996 g/ml.

Las hojas secas de *P. elongatum*, fueron sometidas a una maceración con etanol durante 48 hrs. para luego ser procederse a la filtración y rotaevaporación,

obteniéndose así el extracto total etanólico, con un porcentaje de rendimiento del 8%.

Tanto el aceite esencial y el extracto etanólico obtenido, se utilizaron para realizar los ensayos de toxicidad y genotoxicidad mediante la prueba de SMART.

Para la evaluación del potencial genotóxico del extracto etanólico de *P. elongatum* Vahl, se tomó en cuenta el número de moscas nacidas, que llegaron a su etapa adulta, las que posteriormente fueron recolectadas en etanol al 70% para proceder al montaje de alas para cada cruce (ST y HB) y genotipo (heterocigoto y trans-heterocigoto) de donde se obtuvo la frecuencia de pelos mutados presentes en cada ala.

En la Tabla 1 se observa que en el cruce Estándar la mayor frecuencia observada corresponde al control negativo, observándose una disminución proporcional en la frecuencia de manchas con relación a la concentración para los grupos con tratamiento, para MSP. Los valores obtenidos mediante el paquete estadístico, muestran resultados negativos para la actividad genotóxica del extracto a las 3 concentraciones evaluadas.

**Tabla 1. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico del extracto etanólico de *P. elongatum* mediante Cruce Estándar**

Genotipos	Concentración (mg/ml)	N° de moscas (N)	Manchas por mosca ( N° de manchas ) diagnóstico estadístico <sup>a</sup>				Total de Manchas	de Total de manchas <i>mwh</i> <sup>c</sup> (n)
			Manchas Pequeñas (1-2 céls) <sup>b</sup> m = 2	Manchas Simples	Manchas Simples Grandes (>2 céls) <sup>b</sup> m = 5	Manchas Gemelas m = 5		
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>	0	30	1,53 (46)		0,20 (06)	0,10 (03)	1,83 (55)	131
	25	40	1,18 (47)	-	0,23 (09) i	0,10 (04) i	1,50 (60)	- 82
	50	40	0,33 (13)	-	0,18 (07) i	0,05 (02) i	0,55 (22)	- 88
	75	40	0,45 (18)	-	0,00 (00)	0,00 (00)	0,45 (18)	- 23
	MMC 0.05mM (Control Positivo)	20	9,90 (198)	+	3,35 (67) +	0,25 (05) i	13,50 (270)	+ 265

<sup>a</sup>Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo.

<sup>b</sup>m, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia  $\alpha = 0,05$

<sup>c</sup>Incluso las manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras.

<sup>d</sup>Considerando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

Control positivo: Mitomicina C 0.05 mM (0.016mg/ml)

Para las Manchas Simples Grandes, a la concentración de 25mg/ml se observó una frecuencia de 0.23 (MSG)/mosca, comparado con el control negativo que fue de 0.20 (MSG)/mosca, lo cual no representa significancia estadística.

La frecuencia de Mancha Gemela (MG) encontradas en el control negativo es de 0.1 MG/mosca a una concentración de 25mg/ml; una frecuencia de 0.10

MG/mosca a 50 mg/ml y una frecuencia de 0.05 MG/mosca a la concentración de 75 mg/kg, estos datos nos reportan la ausencia de Manchas Gemelas.

En los datos obtenidos en el cruce HB, se analizó el genotipo trans-heterocigoto, reportados en la Tabla 2; donde se observó una frecuencia de 1.0 MSP/moscas para el control negativo, la cual es superior a las frecuencias obtenidas en los tratamientos con las

diferentes concentraciones del extracto, mostrando en éstos, un rango que varía de 0.10 a 0.80 MSP/mosca, reportándose el resultado como negativo para la

actividad genotóxica del extracto etanólico, según el análisis estadístico aplicado.

**Tabla 2. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico del extracto etanólico de *P. elongatum* mediante Cruce Alta Bioactivación**

Genotipo	Concentración ( mg/ml )	N° de moscas ( N )	Manchas por mosca ( N° de manchas ) diagnóstico estadístico <sup>a</sup>								
			Manchas Simples Pequeñas (1-2 céls) <sup>b</sup>		Manchas Simples Grandes (>2 céls) <sup>b</sup>		Manchas Gemelas		Total de Manchas		Total de manchas mwh <sup>c</sup>
			m = 2		m = 5		m = 5		m = 2		( n )
<i>mwh/flr</i> <sup>3</sup>	0	20	1,00	(20)	0,30	(06)	0,15	(03)	1,45	(29)	59
	25	30	0,53	(16)	-	0,10	(03)	-	0,63	(19)	- 30
	50	30	0,80	(24)	-	0,13	(04)	-	0,93	(28)	- 40
	75	30	0,10	(03)	-	0,10	(03)	-	0,20	(06)	- 18
	MMC 0.05mM (Control Positivo)	20	4,70	(94)	+	2,20	(44)	+	0,15	(03)	<b>i</b> 7,05 (141) + 138

<sup>a</sup>Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo.

m, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia  $\alpha = 0,05$

<sup>b</sup>Incluso las manchas simples *flr3* raras.

<sup>c</sup>Considerando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

Control positivo: Mitomicina C 0.05 mM (0.016mg/ml)

Para el marcador MSG la frecuencia encontrada en el control negativo es de 0.30 MSG/mosca, la cual es mayor a las frecuencias obtenidas en los tratamientos con el extracto, que varía en un rango entre 0.10 a 0.13 MSG/mosca, datos que permiten determinar la actividad genotóxica del extracto como negativo, para este marcador a las concentraciones evaluadas.

No se observó ningún marcador de mancha gemela (MG) en los tres tratamientos con el extracto; en el control negativo la frecuencia fue de 0.15 MG/mosca. Estos datos permiten establecer que la actividad genotóxica del extracto es negativa.

Para el análisis del aceite esencial las larvas de tercer instar del cruce ST fueron sometidas a tratamiento crónico por 48 horas, a las concentraciones sub-tóxicas encontradas en la evaluación de toxicidad 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 %, analizándose el genotipo trans-heterocigoto. Los datos obtenidos permiten determinar una frecuencia de 0.40 manchas simples pequeñas MSP/mosca, a una concentración de 0.01% y 0.05% del aceite esencial de *P. elongatum*; a una concentración máxima de 0.5% la frecuencia encontrada fue de 0.75 MSP/mosca; en el control negativo la frecuencia de manchas encontradas fue de 1.00 MSP/mosca como se evidencia en la Tabla 3.

**Tabla 3. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico del Aceite esencial de *P. elongatum* mediante Cruce Estándar**

Genotipo	Concentración ( mg/ml )	N° de moscas ( N )	Manchas por mosca ( N° de manchas ) diagnóstico estadístico <sup>a</sup>							
			Manchas Simples Pequeñas (1-2 céls) <sup>b</sup>		Manchas Simples Grandes (>2 céls) <sup>b</sup>		Manchas Gemelas		Total de Manchas	Total de manchas mwh <sup>c</sup>
			<i>m</i> = 2		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 2	( <i>n</i> )
<i>mwh/flr</i> <sup>3</sup>	0	20	1,00 (20)	0,30 (06)	0,15 (03)	1,45 (29)	59			
	0,01	20	0,40 (08)	- 0,05 (01)	- 0,00 (00)	- 0,45 (09)	- 11			
	0,05	20	0,40 (08)	- 0,10 (02)	- 0,00 (00)	- 0,50 (10)	- 28			
	0,1	20	0,60 (12)	- 0,10 (02)	- 0,00 (00)	- 0,70 (14)	- 16			
	0,5	20	0,75 (15)	- 0,25 (05)	i 0,05 (01)	i 1,05 (21)	- 57			
	MMC 0.05mM ( Control Positivo)	20	9,90 198	+ 3,35 (67)	+ 0,25 (05)	i 13,50 0)	+ 265		(27)	

<sup>a</sup>Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo.

*m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia  $\alpha = 0,05$

<sup>b</sup>Incluso las manchas simples *flr*<sup>3</sup> raras.

<sup>c</sup>Considerando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

Control positivo: Mitomicina C 0.05 mM (0.016mg/ml)

En los datos obtenidos en el cruce HB se analizó el genotipo trans-heterocigoto, los mismos se reportan en la Tabla 4. Se observa que la frecuencia de manchas encontradas en los tratamientos con aceite esencial es menor a la frecuencia del control negativo, incluso se

tiene ausencia de manchas gemelas que es un marcador relevante para la determinación de la genotoxicidad producida. De esta manera se confirma que el extracto, a las concentraciones evaluadas no induce genotoxicidad.

**Tabla 4. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico del aceite esencial de *P. elongatum* mediante Cruce Alta Bioactivación**

Genotipo	Concentración ( mg/ml )	N° de moscas ( N )	Manchas por mosca ( N° de manchas ) diagnóstico estadístico <sup>a</sup>							
			Manchas Simples Pequeñas (1-2 céls) <sup>b</sup>		Manchas Simples Grandes (>2 céls) <sup>b</sup>		Manchas Gemelas		Total de Manchas	Total de manchas mwh <sup>c</sup>
			<i>m</i> = 2		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 2	( <i>n</i> )
<i>mwh/flr</i> <sup>3</sup>	0	20	1,00 (20)	0,30 (06)	0,15 (03)	1,45 (29)	59			
	0,01	20	0,70 (14)	- 0,05 (01)	- 0,00 (00)	- 0,75 (15)	- 14			
	0,05	20	0,15 (03)	- 0,00 (00)	- 0,00 (00)	- 0,15 (03)	- 4			
	0,1	20	0,10 (02)	- 0,05 (01)	- 0,00 (00)	- 0,15 (03)	- 11			
	0,5	15	0,53 (08)	- 0,07 (01)	- 0,00 (00)	i 0,60 (09)	- 11			
	MMC 0.05mM ( Contr. Positiv.)	20	4,70 (94)	+ 2,20 (44)	+ 0,15 (03)	i 7,05 (141)	+ 138			

<sup>a</sup>Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo.

*m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia  $\alpha = 0,05$

<sup>b</sup>Incluso las manchas simples *flr*<sup>3</sup> raras.

<sup>c</sup>Considerando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

Control positivo: Mitomicina C 0.05 mM (0.016mg/ml)vv

## DISCUSIÓN

De las larvas que se sometieron al tratamiento crónico con el extracto a concentraciones de 25, 50 y 75 mg/ml, durante 48 horas, se han obtenido los datos del porcentaje de sobrevivencia tanto para el cruce ST y el cruce HB, analizándose el genotipo trans-heterocigoto; en el cruce ST se evidenció una frecuencia de 1.18 de manchas simples pequeñas MSP/mosca a la concentración de 25mg/ml y una frecuencia de 0.45 MSP/mosca a una concentración de 75mg/ml del extracto etanólico de *P. elongatum*. En el control negativo se observó una frecuencia de 1.53 MSP/mosca.

Los datos obtenidos en el análisis estadístico del potencial genotóxico mediante el cruce estándar, refieren que el extracto etanólico a las concentraciones evaluadas no induce daño genotóxico, debido a que las frecuencias de manchas encontradas son inferiores respecto al control negativo, lo cual indica que la genotoxicidad para el cruce ST el genotipo trans-heterocigoto, es negativo de acuerdo a los datos obtenidos mediante el paquete estadístico empleado.

Los resultados que se presentan en la Tabla 2, muestran que el extracto no es genotóxico ya que la frecuencia de manchas encontradas es menor a la frecuencia del control negativo. Incluso se tiene ausencia de manchas gemelas que es un marcador relevante para la determinación de la genotoxicidad producida. Se confirma, entonces, que el extracto a las concentraciones evaluadas no es genotóxico.

Realizando el análisis comparativo de la frecuencia total de manchas entre el cruce ST y HB, se puede observar que la frecuencia máxima es de 1.5 total de manchas (TM)/mosca a 25 mg/ml y la mínima frecuencia de 0.45 a una concentración de 75 mg/ml para el cruce ST; para el cruce HB la frecuencia máxima es de 0.93 TM/mosca a 50 mg/ml y la frecuencia mínima es de 0.45 a 75 mg/ml.

El análisis comparativo del total de manchas entre el cruce ST y HB en relación al control negativo, demuestran que el extracto etanólico de *P. elongatum*, no presenta efecto genotóxico a las concentraciones evaluadas.

Por otra parte en la Tabla 3, se evidencia que la mayor frecuencia observada, en el cruce ST, respecto a MSP corresponde al control negativo, y los resultados demuestran una disminución en la frecuencia de manchas en relación a la concentración de cada tratamiento. La interpretación de estos valores mediante el paquete estadístico, demuestra un resultado negativo

para la actividad genotóxica del aceite esencial, a las concentraciones evaluadas.

Respecto a las manchas simples grandes (MSG), la frecuencia encontrada fue de 0.05 MSG/mosca a una concentración de 0.01% y de 0.25 a una concentración 0.5%; las cuales están por debajo de la frecuencia del control 0.30 MSG/mosca, información que permite determinar que la genotoxicidad frente a este marcador es negativa.

En cuanto a la frecuencia de mancha gemela (MG), se ha determinado 0.15 MG/mosca para el control negativo. Comparando con los grupos de tratamiento, se ha observado que el rango de frecuencia de manchas está por debajo, entre 0.00 - 0.05 MG/mosca. Estos datos indican que el aceite esencial no presenta actividad genotóxica a ninguna de las concentraciones evaluadas, en comparación con el control negativo.

Los resultados obtenidos muestran que en ninguno de los marcadores analizados MSP, MSG y MG, el aceite esencial a concentraciones de 0.01, 0.05 y 0.1 % presenta genotoxicidad; sin embargo a la concentración de 0.5% los resultados obtenidos no permiten conclusiones definitivas debido a que el número de manchas encontradas son insuficientes para poder establecer si el aceite esencial presenta o no genotoxicidad a esa concentración.

Asimismo en el cruce HB se analizó el genotipo trans-heterocigoto, el cual se reporta en la Tabla 4. En el análisis de los datos de las MSP, se observó una frecuencia de 1.0 MSP/moscas para el control negativo, que es superior a las frecuencias obtenidas en los tratamientos con el aceite esencial de *P. elongatum*, que varía en un rango de 0.70 a 0.10 MSP/mosca. Comparando estos datos con el control negativo, aplicando el análisis estadístico, se pudo determinar que el aceite esencial no es genotóxico a las concentraciones evaluadas.

Para el marcador MSG, la frecuencia encontrada en el control negativo es de 0.30 MSG/mosca, mayor a la frecuencia de los tratamientos con el aceite esencial, en un rango que varía entre 0.05 a 0.07 MSG/mosca para la mínima y máxima concentración empleada respectivamente.

Por otra parte, respecto al marcador de manchas gemelas MG, no se ha observado presencia de las mismas a las concentraciones evaluadas, a excepción del control negativo que presentó una frecuencia de 0.15 MG/mosca, lo cual demuestra que los resultados son negativos. De esta forma se determinó que el aceite esencial no es genotóxico para este marcador a las

concentraciones evaluadas, ya que los resultados evidencian que la frecuencia de manchas encontradas está significativamente por debajo de la frecuencia del control negativo.

El análisis estadístico de todos estos datos indica que el aceite esencial no evidencia actividad genotóxica mediante el ensayo de SMART.

La observación de una baja frecuencia de MSP/mosca en el cruce ST a las concentraciones evaluadas, tanto para el extracto etanólico como para el aceite esencial, indican que sus componentes son de acción directa, pues cuando un compuesto actúa de manera directa normalmente se producen daños genéticos tardíos, debido a que los compuestos necesitan activarse para poseer actividad, dando como expresión fenotípica la formación de mayor número de manchas simples pequeñas, en relación a las manchas simples grandes, las cuales se presentan cuando el compuesto actúa en las etapas iniciales de división mitótica.<sup>18</sup>

Un comportamiento similar se observó en las moscas provenientes del cruce HB, dando un resultado de actividad genotóxica negativa para todas las concentraciones evaluadas, tanto para el marcador MSP como para MSG. Estos resultados sugieren que los compuestos presentes en el extracto y aceite esencial al pasar por la ruta metabólica vía Citocromo P-450 se convierten en metabolitos menos activos, que aquellos que sufren metabolización, considerando que el Cruce HB posee un nivel elevado del citocromo P-450 en comparación con el cruce ST, sugiriendo así que el extracto no posee capacidad pro-mutagénica, o que sus componentes no sufren metabolización por la Vía Citocromo P – 450, mediante la prueba de mutación y recombinación somática.<sup>17</sup> Es importante esta observación pues existen compuestos que reportaron resultados negativos en el cruce ST, detectándose que su actividad es mutagénica sólo mediante el cruce HB, tal es el caso de nitro derivados, o compuestos como el safrol y eugenol, que son genotóxicos de acción directa.<sup>19</sup>

Los resultados obtenidos en la evaluación genotóxica del extracto etanólico muestran que el mismo no es genotóxico, mediante el cruce ST en *D. melanogaster*, debido a que la frecuencia total de manchas encontradas en las tres concentraciones evaluadas son inferiores a las del control negativo. Respecto al aceite esencial, los datos obtenidos muestran un comportamiento similar a los del extracto etanólico, debido a que a las concentraciones evaluadas dieron una frecuencia total de manchas para el cruce ST que son menores a las del control negativo.

Si se comparan las frecuencias de manchas totales encontradas tanto en el extracto etanólico como en el aceite esencial de *P. elongatum* Vahl, con las de la Mitomicina C, se observa que las frecuencias encontradas en el aceite esencial son significativamente inferiores a las frecuencias de Manchas Totales reportadas con Mitomicina C, a concentraciones de 0.05 mM (0.016mg/ml).

La frecuencia total de manchas en las moscas transheterocigotas no posee un incremento estadísticamente significativo, interpretando este resultado como negativo para el cruce ST, lo que significa que ni el extracto etanólico ni el aceite esencial, son capaces de producir mutaciones puntuales, disyunción, delección o recombinación, sugiriendo así que ninguna de las muestras poseen actividad mutagénica directa mediante el Test de Mutación y Recombinación Somática.

En el presente estudio, el aceite esencial y el extracto etanólico de *P. elongatum*, tanto para los mutágenos directos como los indirectos en las concentraciones evaluadas, dan una respuesta negativa, razón por la cual se descarta a la especie vegetal *P. elongatum* Vahl como agente recombinogénico, mediante la prueba de SMART, debido a que el total de manchas no presenta un incremento estadísticamente significativo dando como expresión fenotípica la formación de MSP en un número mayor a las MSG y la ausencia de MG nulas. En la mayoría de los casos, estas últimas son producidas exclusivamente por la recombinación mitótica, lo que indica que, ni el aceite esencial ni el extracto etanólico, inducen a una recombinación mitótica en forma directa sobre el DNA, ni de manera indirecta. En cuanto a las manchas simples pueden ser producidas por varios mecanismos.<sup>20</sup>

El análisis de los datos obtenidos en este estudio sugieren que el extracto etanólico y el aceite esencial, no poseen la capacidad de promover el desarrollo de procesos cancerígenos, debido a que el proceso de recombinación mitótica inhibe la acción de los genes supresores de tumores siendo en muchos casos un factor desencadenante de cáncer.

El extracto total etanólico de *P. elongatum* no ejerce una actividad genotóxica directa y tampoco una actividad genotóxica indirecta detectada por el test de mutación y recombinación somática SMART de *D. melanogaster*. El aceite esencial de *P. elongatum* no demuestra actividad genotóxica directa y tampoco actividad genotóxica indirecta detectada por el test de mutación y recombinación somática ( SMART) de *D. melanogaster*.

## AGRADECIMIENTOS

Al proyecto de acción de integrada “Plantas medicinales en Bolivia como recurso terapéutico”, PCI D/020523/08; al proyecto IDH, “Evaluación de la Toxicidad de Plantas medicinales”; a la comunidad de Chicaloma de Irupana - Yungas por permitir la colecta de la especie vegetal.

## REFERENCIAS

- Flores N. Metabolitos Bioactivos aislados de cinco especies *Piper* con actividad antiparasitaria y/o leishmanicida. [Tesis magistral]. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. La Paz, Bolivia. 2001
- Betancourt A. Betancourt A. Ganan 40 mmdd al año por venta de fármacos basados en medicina tradicional. Explotan laboratorios el conocimiento indígena. Reportaje de periódico. La Jornada, Lunes en la Ciencia, México. 2002. [acceso 19 de septiembre del 2008]. Disponible en: <http://www.jornada.unam.mx/2002/03/11/cien-indigena.html>
- Centro de Noticias OPS/OMS Bolivia OMS advierte sobre las medicinas alternativas. BBC Mundo. Londres, Inglaterra. 2004. [acceso 20 de diciembre del 2008]. Disponible en: <http://www.ops.org.bo/servicios/?DB=B&S11=4362&SE=SN>
- Vidaurre P. Plantas medicinales en los Andes de Bolivia. Botánica Económica de los Andes Centrales. 2006: 268-284.
- Organización de las Naciones Unidas para el desarrollo industrial, Subdivisión de Promoción de Inversión y Tecnología, Gobierno de Bolivia, Ministerio de Planificación y Desarrollo, Viceministerio de Ciencia y Tecnología Plantas Medicinales en Bolivia. Estado del Arte. 2007.
- Claros M. Determinación de la actividad anti – Helicobacter pylori de *Plantago major*, *Verbena officinalis*, *Clinopodium bolivianum*, *Calendula officinalis*, *Piper angustifolium* y *Rubus boliviensis* por el método de difusión de disco. [Tesis de licenciatura]. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, UMSA. La Paz, Bolivia. 2006.
- Flores E, Vargas F, Gimenez A, Jiménez A. Aislamiento y caracterización de los principios antifúngicos y leishmanicidas del Matico - *Piper elongatum* Vahl. BIOFARBO. 2001; 9: 45-50.
- Palacios V. “Plantas Medicinales Nativas”. *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONCYTE*. 2º ed. Perú; 1997.
- Monzote L, Sario I, Montalvo A, Garrido N, Scull R, Abreu J. Propiedades antiprotozoarias de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas. Rev Cubana Med Trop. 2004;56(3):230-233
- Navarro A. Análisis Físico y Químico de *Piper angustifolium* (Matico) [acceso el 20 de mayo del 2008]. Disponible en: [Http://Pdf.Rincondelvago.Com/Analisis-Fisico-Y-Quimico-De-La-Piper-Angustifolium.Html](http://Pdf.Rincondelvago.Com/Analisis-Fisico-Y-Quimico-De-La-Piper-Angustifolium.Html).
- Vander Put A. Plantas medicinales: las enfermedades y su tratamiento por las plantas; tratado práctico de medicina vegetal para la eficaz aplicación de las plantas curativas, basado en las más modernas investigaciones. 1ª ed. Barcelona: SINTES; 1972: 9-205
- Palacios V J. Plantas Medicinales Nativas del Perú. Lima: CONCYTE; 1993.
- Lipkin M. Progress report: in Defense of the gastric mucosa. *Gut*. 1971; 12: 599-603.
- Plazas A, Cuca L, Delgado W. Flavonoides aislados de las inflorescencias de *Piper hispidum* kunth (piperaceae) y derivados acetilados. Rev. Colomb. Quim.2008; 37(2):135-144
- Graf U, Spano M, Guzman G, Suresh K, Andrade E. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. Electronic Journals: African Newsletter: 2000: 1996-2001.
- Graf U & Würigler F. Investigation of coffee in *Drosophila* genotoxicity tests. Food and Chemical Toxicology. 1986; 24: 835-842.
- Graf U, Würigler F, Katz A, Frey H. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environmental Mutagenesis.1984; 6:153-188.
- Cortinas C. Cáncer: Herencia y ambiente. 2ªed. México: D. R. © 1997, Fondo de Cultura Económica; 1997.
- Mamani P, Gonzales M, Pillco A, Giménez A, Gonzales E. Determinación genotóxica del extracto total diclorometánico de corteza de *Galipea longiflora* krause, mediante el test de mutación y recombinación somática (SMART). Rev. Bol. Quim. 2006; 23 (1): 53-57.
- Ribeiro R, Favero D, Kanan E Métodos para diagnóstico da exposição genotóxica ambiental e ocupacional. Mutagenese Ambiental. 1º ed. Rio Grande De Soul. Ulbra: 2003; 281-305.