

## AUSENCIA DE EFECTO CITOTÓXICO, MUTAGÉNICO Y GENOTÓXICO DE EXTRACTO ACUOSO Y ACEITE ESENCIAL DE *CARICA CANDAMARCENSIS* HOOK. (PLANTAE: CARICACEAE)

ABSENCE OF CYTOTOXIC, MUTAGENIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF AQUEOUS EXTRACT  
AND ESSENTIAL OILS OF *CARICA CANDAMARCENSIS* HOOK. (PLANTAE: CARICACEAE)

Jaqueine Mena-Huertas<sup>1, 2, 5, 6</sup>, Carmen Embus-Córdoba<sup>2, 7</sup>, Vivian L. Rosero-Ruiz<sup>2, 8</sup>, Juliana Navarro-Yépez<sup>3, 9</sup>,  
Isabel C. Ortiz-Trujillo<sup>4, 10</sup>, María C. Yépez-Chamorro<sup>1, 2, 11</sup>

### Resumen

El extracto acuoso y el aceite esencial de la pulpa de frutos maduros de *Carica candamarcensis* Hook. f. (1875) (chilacuán, papayuela de clima frío) presentan actividad in vitro anti-*Helicobacter pylori*, por lo cual se consideran promisorios para realizar una terapia complementaria para controlar la infección gástrica por esta bacteria. El presente trabajo contribuye a profundizar en el estudio de estos extractos evaluando: **a**) citotoxicidad mediante análisis de viabilidad de linfocitos humanos aislados por el método tradicional en gradiente de Hystopaque® y en cultivo con medio RPMI-1640; **b**) mutagenicidad mediante el ensayo de Ames; **c**) genotoxicidad a través de electroforesis alcalina de células individuales [ensayo cometa (SGCE)]. Para extracto acuoso (EA) se evaluaron dosis desde el extracto concentrado original hasta  $10^{-2}$  (diluciones en agua destilada estéril) y para el caso de aceite esencial (AE) desde el extracto original diluido en DMSO al 1% hasta  $10^{-6}$ . Este estudio demuestra que según las pruebas utilizadas todas las concentraciones evaluadas son seguras a nivel mutagénico, genotóxico y citotóxico. Sin embargo, se requieren estudios adicionales con otros métodos de ensayo que permitan confirmar o descartar si los extractos inducen daños relevantes sobre el ADN, si tienen efectos antimutagénicos y antigenotóxicos para contemplar, así, su posterior inclusión en el desarrollo de un fitofármaco de *C. candamarcensis* como tratamiento complementario en pacientes con antecedentes de infección de *H. pylori*.

**Palabras clave:** aceites esenciales, *Carica candamarcensis*, extractos acuosos, genotoxicidad, *Helicobacter pylori*, mutagenicidad

### Abstract

The aqueous extract and essential oils from the pulp of ripe fruits of *Carica candamarcensis* Hook. f. (1875) (chilacuán, cold weather papayuela) showed in vitro anti-*Helicobacter pylori* activity; therefore, they may be considered promissory for a complementary therapy to control gastric infection of this bacterium. The present study contributes to further examine these extracts, evaluating: **a**) cytotoxicity through analysis of human lymphocytes isolated by the traditional Hystopaque® gradient method and cultured in RPMI-1640 medium; **b**) mutagenicity through the Ames assay; **c**) genotoxicity through alkaline electrophoresis of individual cells [comet assay (SGCE)]. For aqueous extract (AE), doses ranging from the original concentrated extract to  $10^{-2}$  were evaluated (dilutions in sterile distilled water) and for essential oils (EO) they ranged from the original extract diluted in 1% DMSO up to  $10^{-6}$ . This study demonstrated that based upon the tests used, all evaluated concentrations were safe in a

---

Recibido: febrero 2011; aceptado: octubre 2011.

<sup>1</sup> Docente. Universidad de Nariño. Pasto (Nariño), Colombia.

<sup>2</sup> Grupo Salud Pública. Departamento de Biología. Universidad de Nariño. Pasto (Nariño), Colombia.

<sup>3</sup> Bióloga. Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia.

<sup>4</sup> Docente. Facultad de Medicina. Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín (Antioquia), Colombia.

Correos electrónicos: <sup>5</sup> <sajamena@udenar.edu.co>; <sup>6</sup> <jmenahuertas@ymail.com.co>; <sup>7</sup> <karmen0077@hotmail.com>;

<sup>8</sup> <lore1079@hotmail.com>; <sup>9</sup> <junay14@hotmail.com>; <sup>10</sup> <isabel.ortiz@upb.edu.co>; <sup>11</sup> <mcych@udenar.edu.co>.

mutagenic, genotoxic and cytotoxic level. However, further studies are required with other test methods to confirm or refute whether extracts induce significant DNA damage, or have antimutagenic and antigenotoxic effects, to permit a subsequent development of a herbal medicine based upon *C. candamarcensis* as complementary therapy in patients with a record of infection with *H. pylori*.

**Key words:** aqueous extracts, *Carica candamarcensis*, essential oils, genotoxicity, *Helicobacter pylori*, mutagenicity

## INTRODUCCIÓN

La infección de la mucosa gástrica con *Helicobacter pylori* es una de las más frecuentes en los seres humanos y está relacionada con diferentes enfermedades gástricas como úlcera péptica, gastritis crónica, cáncer gástrico, además de algunas enfermedades cardiovasculares, autoinmunes, anemia ferropénica, urticaria y retraso en el crecimiento, entre otras (Gasbarrini et al. 1998, González-Carbajal 2002). En el departamento de Nariño (Colombia) se ha encontrado alta incidencia de infección por *H. pylori* y elevada asociación con desarrollo de cáncer gástrico sobre todo en la zona andina (Camargo et al. 2004 y Goodman et al. 1996). Teniendo en cuenta la importancia oncogénica de la bacteria se han implementado una serie de terapias agresivas (combinación de un inhibidor de la bomba de protones y un compuesto a base de bismuto y 2-3 antibióticos) con el fin de lograr su erradicación. Estos tratamientos “triples o cuádruples” han sido 80 a 90% exitosos; sin embargo, el costo y los efectos colaterales son continua causa del aborto de terapias generando una marcada resistencia a los antibióticos usados (Sherif et al. 2004, Wu et al. 2005). Por ello, se han adelantado varios estudios en busca de terapias complementarias para el control de la bacteria, tales como: prebióticos, dietas ricas en antioxidantes y extractos de diversas plantas, que ayuden a incrementar la efectividad del tratamiento convencional como lo recomienda Bergonzelli (2003). Con este propósito, el grupo de investigación de Salud Pública de la Universidad de Nariño

(Pasto), Colombia, realizó un estudio con el cual se evidenció actividad anti-*H. pylori* in vitro del aceite esencial y el extracto acuoso de la pulpa de frutos maduros de *Carica candamarcensis* Hook. f. (1875) (chilacúan, papayuela de clima frío) Mena et al. (2005). La especie *C. candamarcensis* es originaria de los Andes de la América meridional (Colombia o Perú) y se distribuye desde Panamá hasta los Andes de Bolivia y parte de Chile, se utiliza normalmente para consumo humano y se han registrado muchas propiedades terapéuticas del látex de la planta como eliminación de hematomas y verrugas, en el tratamiento de arteriosclerosis y amigdalitis, se ha evidenciado actividad mitogénica tanto in vitro como in vivo (en recuperación de quemaduras en pacientes diabéticos), también actividad proteasa utilizada en procesos de extracción y purificación de ADN (Gomes et al. 2005, Mello et al. 2008, Teixeira et al. 2008).

Para verificar la inocuidad del aceite esencial y el extracto acuoso de frutos maduros de *C. candamarcensis* y poder recomendarlos como alternativa terapéutica, en este estudio se evaluó su posible efecto citotóxico, genotóxico y mutagénico. Inicialmente, se determinó el potencial premutagénico y mutagénico mediante la prueba de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium*, usando la cepa TA 100 his<sup>r</sup> donada por el Laboratorio de Mutagénesis de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia) y diseñada por Bruce Ames en 1970, la que permite detectar un ámbito amplio de sustancias químicas con el potencial de producir daño genético al hombre, y para el caso específico

de esta cepa, permite detectar mutaciones por sustitución de pares de bases (Maron y Ames 1983).

Para evaluar el efecto genotóxico de los extractos se siguió la metodología propuesta por Singh et al. (1988) y modificada por Rojas et al. (1999) y Tice et al. (2000), denominada *electroforesis alcalina de células individuales* [ensayo cometa (SGCE)]; al someter a electroforesis las células expuestas a una sustancia problema, los quiebres generados en el ADN hacen que estos fragmentos se muevan desde el núcleo hacia el ánodo migrando en forma de un cometa que se puede visualizar con un colorante fluorescente afín al ADN.

## MATERIALES Y METODOS

**Obtención de los extractos de *Carica candamarcensis*.** Para obtener una muestra representativa de la población vegetal de *Carica candamarcensis* Hook. f. (1875), la recolección de los frutos maduros se realizó siguiendo el modelo de muestreo aleatorio simple, en 15 árboles de cultivos caseros del corregimiento el Encano de Pasto (Nariño), Colombia. Se recolectaron al azar 150 frutos maduros de tamaño variable (aproximadamente, 5 por cada árbol); posteriormente se empacaron en bolsas plásticas y se almacenaron a 4 °C para su transporte. Para obtener los extractos de aceite esencial (AE) y acuoso (EA) se utilizó el método de hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD) según el protocolo estandarizado por Gómez y Moran (2005). Los frutos se lavaron con solución de hipoclorito al 2% para eliminar agentes contaminantes y se realizó la separación de la pulpa y las semillas. Se trituraron 1.500 g de pulpa junto con la cáscara y se introdujeron en un balón de 4 litros de capacidad, al que se adicionaron 200 ml de agua destilada y se acopló al sistema de hidrodestilación tipo Clevenger, con reservorio de destilación tipo Dean-Stark y calentamiento por radiación mediante un horno microondas

LG, modelo MB-14VG, con una potencia de salida 2.450 MHz (7% de la potencia máxima) durante 90 min, con 1 min intermedio de pausa cada 10 min. El aceite esencial y el remanente acuoso fueron recolectados en tubos ependorff de 1,5 ml estériles, cubiertos con papel aluminio y conservados a -20 °C hasta su uso.

**Análisis de citotoxicidad y determinación de concentraciones de trabajo.** Para esta prueba se emplearon linfocitos humanos de sangre periférica de un donante sano, quien firmó el respectivo consentimiento para participar en este estudio, y mediante interrogatorio medico cumplió con los siguientes requisitos: ser joven, no fumador, no haber ingerido alcohol un mes antes del ensayo ni durante las pruebas. Los linfocitos se aislaron por el método tradicional en gradiente de Hystopaque® (Boyum 1968). Para esto, se depositaron 10 ml de sangre en un tubo Vacutainer con heparina que fue tratado con buffer fosfato de sodio (PBS) e Hystopaque®1077 de Sigma (Boyum 1968), se centrifugó durante 30 min a 2.000 rpm, se extrajo con precaución la capa de linfocitos y se transfirió a otro tubo limpio y seco. Se descartó el PBS y se agregó 1 ml de medio RPMI-1640 (sigma) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, se evaluó viabilidad inicial mediante azul de tripano, el cual se basa en que las células muertas pierden la permeabilidad selectiva y por lo tanto el colorante ingresa por difusión a ellas adquiriendo una coloración azul, en contraste las células vivas son refringentes y selectivas al colorante, posteriormente se incubó a 37 °C.

El EA puro fue considerado como la primera dosis de trabajo, a partir de la cual se realizaron 5 diluciones con agua destilada estéril desde  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  ml. Para el AE se preparó una solución stock agregando DMSO al 1% a 100 µl de AE puro hasta que se formó una emulsión, a partir de esta solución stock se hicieron las diluciones en DMSO al 1% hasta  $10^{-6}$  ml de extracto.

La prueba se realizó en una solución de 100.000 linfocitos y 10 µl de la solución del extracto a evaluar en cada una de las concentraciones, además de los controles respectivos con agua destilada estéril y DMSO al 1%, se cultivaron en medio RPMI suplementado con SFB al 10% en un volumen final de 250 µl. Se incubó a 37 °C y cada hora se evaluó la viabilidad mediante el método de exclusión de azul de tripano, durante 6 h.

Se calculó el porcentaje de viabilidad absoluta y los resultados se graficaron verificando su ajuste a la distribución lineal a lo largo del tiempo, se consideraron citotóxicos si alcanzaban una viabilidad igual a 0, ligeramente citotóxica entre 40-79% de viabilidad, y no citotóxicos con una viabilidad superior o igual a 80%.

**Ensayo de mutagenecidad y premutagenecidad.** Se verificó que los controles de reversión espontánea de la cepa TA100 estuviesen dentro del rango reportado a nivel mundial (Mortelmans y Zeiger 2000) y se siguió el protocolo descrito por Maron y Ames (1983). La ejecución del ensayo consistió en el análisis de las dosis previamente determinadas

de los dos tipos de extractos con la cepa TA100 *sin* y *con* activación metabólica (**S9**). Se incubó durante 30 min, y posteriormente, se mezcló con el *top agar*, esta mezcla se sirvió en *agar* mínimo, se llevó a incubación a 37 °C durante 48 h. Al finalizar este tiempo se hizo el recuento de colonias revertentes y se creó una base de datos con estos resultados para su posterior análisis. Se realizaron tres experimentos independientes, cada uno por duplicado y se incluyeron como controles positivos: 2 aminofluoreno (**2AF**) en el tratamiento *con* S9 y azida de sodio (**A<sub>z</sub>Na**) en el tratamiento *sin* S9, los controles negativos fueron DMSO al 50% y agua destilada estéril para AE y EA, respectivamente. Posteriormente, se incubaron las cajas por 48 h a 37 °C y se contaron las colonias revertentes.

Para cuantificar la mutagenecidad se utilizó el índice de mutagenecidad (**IM**), obtenido de los promedios de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado. El IM se refiere a las veces que es superada la mutagenecidad del control por el tratamiento. Teniendo en cuenta los criterios de Watanabe et al. (2003), se establecieron las siguientes categorías:

---

<b>N M</b>	= No mutagénico	índice menor de 1,5
<b>L M</b>	= Ligeramente mutagénico	índice entre 1,5-1,9
<b>M M</b>	= Medianamente mutagénico	índice entre 2,0-2,9
<b>A M</b>	= Altamente mutagénico	índice mayor o igual a 3

---

**Análisis de genotoxicidad. Ensayo cometa.** El daño en el ADN se detectó en linfocitos humanos aislados de sangre periférica. La separación de los linfocitos se hizo a partir de 5 ml de sangre con gradiente de Hystopaque®, las células se resuspendieron en *buffer* fosfato salino (**PBS**) libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> 1995 (Day

1972). Con el fin de determinar efecto de dosis, los linfocitos se trataron con 10 µl de cada dosis a evaluar de cada extracto, luego se incubaron a 37 °C durante una hora. Se determinó la viabilidad celular por microscopía, utilizando el método de exclusión con el colorante azul de tripano (0,02%) antes y después del tratamiento. El ensayo cometa

se procesó según la metodología propuesta por Singh et al. (1988) y modificada por Pandrangi et al. (1995).

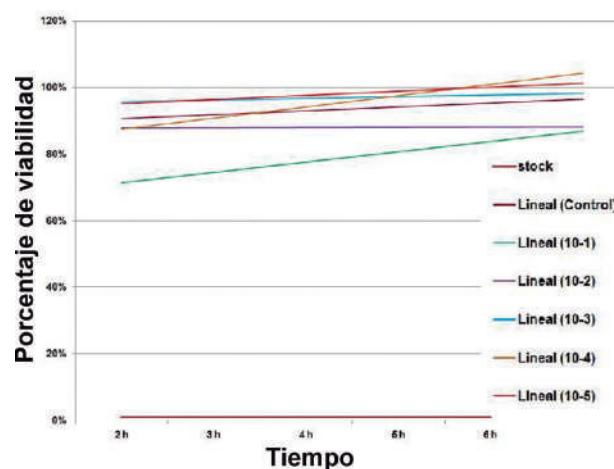
Las células tratadas fueron mezcladas con agarosa de bajo punto de fusión (**LMA**) al 0,5%, se transfirieron a portaobjetos previamente impregnados con agarosa de punto de fusión normal (**NMA**), inmediatamente se cubrieron con cubreobjetos para sumergirlo en solución de lisis fresca durante al menos 1 h. Después, los portaobjetos se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal con tampón alcalino ( $\text{pH} > 13$ ) ( $\text{NaOH}$  10N y EDTA 200 mM) a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 min para que el pH alcalino desnaturalice el ADN y optimice las rupturas de los sitios apurínicos (**AP**) ocasionados por los genotóxicos. Al cumplirse este tiempo, se corrió la electroforesis a 25 V, 300 mA por 30 min. Los portaobjetos se lavaron con tampón neutralizante y se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración de 0,02 mg/ml. Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia Nikon® con filtro verde de longitud de onda de 540 nm y con aumento de 400 X. Se realizaron tres ensayos independientes, cada uno por duplicado y se analizaron 80 células por cada tratamiento. El daño del ADN se determinó con base en la longitud (en  $\mu\text{m}$ ) de la migración de los fragmentos de ADN (cola) de los cometas (a mayor longitud de cola se supone que hay más fraccionamiento del ADN). Para medir el daño también se tuvo en cuenta el porcentaje de células dañadas, los linfocitos cuyas colas sean mayores a la longitud promedio del control se clasificaron como células dañadas. El daño del ADN se cuantificó visualmente en cuatro categorías según la media de longitud de la cola (cometa)  $\pm$  la desviación estándar, así: *categoría 0* (no daño): de 0 a 27  $\mu\text{m}$ , (control negativo más 2 desviaciones estándar del control); *categoría 1* (daño bajo): de 28 a 31  $\mu\text{m}$  (más de 2 desviaciones estándar del control); *categoría 2* (daño medio): de 32 a 35  $\mu\text{m}$ ; *categoría 3* (daño alto): mayor a 36  $\mu\text{m}$  (Brugés y Reguero 2008).

**Análisis estadístico.** Los resultados de las diferentes pruebas se analizaron usando el programa Past 2008, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un  $\alpha = 0,05$  y un valor de confiabilidad del 99%, y un análisis de medias tipo Tukey.

En el caso de ensayo cometa además se evaluó la presencia de heterogeneidad en los datos y de posibles valores atípicos o errores en los datos aplicando la prueba de Levene modificada.

## RESULTADOS

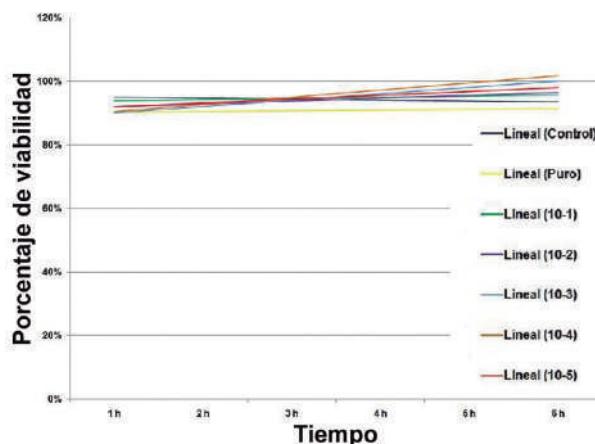
**Toxicidad en linfocitos para determinación de dosis a dosis.** En el ensayo de toxicidad con linfocitos humanos, murieron todas las células en el tratamiento *stock* de AE de frutos maduros de *C. candamarcensis* por lo tanto se consideró citotóxica y se eliminó del ensayo de mutagenicidad (figura 1), así las dosis de trabajo v/v se tomaron a partir de AE  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ .



**Figura 1.** Línea de tendencia de porcentaje de viabilidad de linfocitos tratados con diferentes dosis de aceite esencial (AE) de *Carica candamarcensis* Hook. f. (1875)

En el EA todos los porcentajes de viabilidad son superiores al 85% demostrando que este extracto no es citotóxico en ninguna concentración (figura 2), por lo tanto las dosis seleccionadas

(v/v) para los análisis de premutagenicidad y mutagenicidad fueron desde el extracto concentrado original hasta  $10^{-2}$ .



**Figura 2.** Línea de tendencia de porcentaje de viabilidad de linfocitos tratados con diferentes dosis de extracto acuoso (EA) de *Carica candamarcensis* Hook. f. (1875)

Con los resultados obtenidos se determinó que la solución stock del AE induce citotoxicidad, el resto de dosis evaluadas se consideran no citotóxicas según los estudios realizados, sin embargo se deben realizar otras pruebas de este tipo para descartar cualquier tipo de daño celular que pueda causar.

**Ensayo de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium*. Prueba de Ames.** Todas las pruebas para la confirmación del genotipo de la cepa fueron positivas, los valores de reversión espontánea observados se encontraron dentro del ámbito estandarizado en el Laboratorio de Mutagénesis de la Universidad de Antioquia. Los resultados de la prueba se presentan en la tabla 1.

**Índice de mutación (IM).** En la tabla 2, se muestran los valores correspondientes al IM obtenidos para los extractos evaluados de *C. candamarcensis*. Estos resultados sugieren que no hubo actividad mutagénica con la cepa TA100 de *S. typhimurium*, para el AE y EA ( $IM > 1,5$ ). Los tratamientos de AE y EA

no presentaron diferencias estadísticamente significativas con el control negativo con un  $P_{value} = 0,75$  y  $P_{value} = 0,51$  para un  $\alpha = 0,05$ , respectivamente. Esto corrobora el efecto no mutagénico de las concentraciones evaluadas.

**Tabla 1.** Colonias revertentes en la cepa TA 100 tratada con aceite esencial (AE) (micrométodo) y extracto acuoso (EA) (estándar) de *Carica candamarcensis* Hook. f. (1875), con y sin activación metabólica (S-9)

Colonias	Tratamiento	
	Sin S-9	Con S-9
DMSO (50%)	88	103
AzNa/2AF	4.072	1.238
$10^{-1}$	99	100
$10^{-2}$	113	102
$10^{-3}$	109	103
$10^{-4}$	114	102
$10^{-5}$	97	103
$10^{-6}$	99	101
<i>aceite esencial (AE)</i>		
H <sub>2</sub> O	81	94
AzNa/2AF	2.477	3.720
Puro	107	98
$10^{-1}$	94	85
$10^{-2}$	81	91
<i>extracto acuoso (EA)</i>		

**Ensayo cometa.** El efecto genotóxico sobre linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de los extractos de AE y EA se muestra en la figura 3. En el tratamiento de 1 h se observó una longitud media de cola de 14  $\mu\text{m}$  para el DMSO 1% utilizado como control negativo y en el control positivo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50  $\mu\text{M}$ ) una longitud de cola media de 40  $\mu\text{m}$ ; esto permite constatar la adecuada ejecución de la técnica puesto que estas medidas superan ampliamente las obtenidas para el DMSO 1%.

**Tabla 2.** Índice de mutagenicidad (**IM**) de los extractos de aceite esencial (**AE**) y extracto acuoso (**EA**) *con* y *sin* activación metabólica (**S-9**) de la cepa TA-100 de *Salmonella typhimurium* a diferentes concentraciones (**[c v/v]**) (**A M** = altamente mutágeno; **N M** = no mutágeno)

<b>[c v/v]</b>	<b>Tratamiento</b>			
	<b>Sin S-9</b>		<b>Con S-9</b>	
	<b>IM</b>	<b>Cualidad</b>	<b>IM</b>	<b>Cualidad</b>
<b>Aceite esencial (AE)</b>				
AzNa/2AF	46,09	A M	11,98	A M
10 <sup>-1</sup>	1,12	N M	0,96	N M
10 <sup>-2</sup>	1,28	N M	0,98	N M
10 <sup>-3</sup>	1,23	N M	0,99	N M
10 <sup>-4</sup>	1,28	N M	0,99	N M
10 <sup>-5</sup>	1,09	N M	0,99	N M
10 <sup>-6</sup>	1,12	N M	0,97	N M
<b>Extracto acuoso (EA)</b>				
AzNa/2AF	30,58	A M	39,57	A M
Puro	1,32	N M	1,04	N M
10 <sup>-1</sup>	1,16	N M	0,90	N M
10 <sup>-2</sup>	1,00	N M	0,96	N M

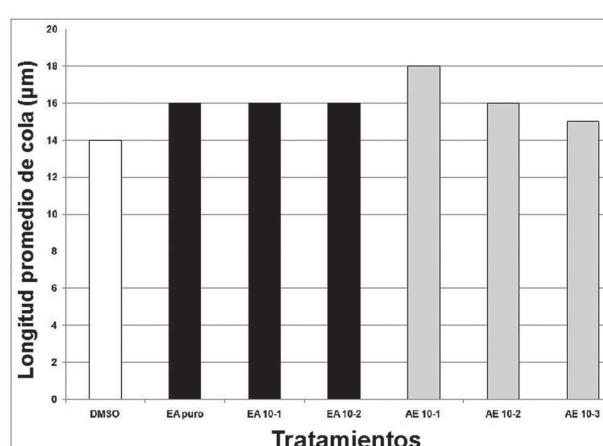
Teniendo en cuenta esto, los resultados del ensayo cometa registran valores que permiten concluir que tanto el AE y EA no inducen efectos genotóxicos, como se presenta en la tabla 3.

La prueba Kruskal Wallis, como era de esperar, indica diferencias significativas con respecto a la longitud de cola del cometa entre el control positivo y los tratamientos con un  $P_{value} = 0,15$  y un  $\alpha = 0,05$ .

## DISCUSIÓN

El estudio realizado por Bakkali et al. (2008), demostró que en las células eucarióticas los AE de plantas pueden actuar como prooxidantes y, que según el tipo y la concentración estos pueden exhibir efectos citotóxicos en las células vivas, esto coincide con lo observado en el ensayo realizado con la solución *stock* donde se presentó una mortalidad del 100%.

Sin embargo, a partir de la dosis AE 10<sup>-1</sup> los porcentajes de viabilidad celular fueron superiores al 90% resultando concentraciones inocuas para el modelo celular utilizado. Ensayos



**Figura 3.** Resultados del efecto genotóxico de tres dosis de aceite esencial (**AE**) y extracto acuoso (**EA**) de *Carica candamarcensis* Hook. f. (1875) en ensayo cometa (longitud promedio de cola en  $\mu\text{m}$  vs tratamiento)

**Tabla 3.** Resultados del efecto genotóxico de tres dosis de aceite esencial (AE) y extracto acuoso (EA) en ensayo cometa (los resultados se expresan como la media de las longitudes ( $\mu\text{m}$ ) de cola en tres experimentos independientes)

Tratamientos	Placas	Media ± ds	Promedio	Estadio
DMSO 1%	1	15,1	14,4	0
	2	13,7		
$\text{H}_2\text{O}_2$ 50 $\mu\text{M}$	1	41,4	40,0	3
	2	38,6		
EA Puro	1	16,1	16,0	0
	2	16,0		
EA $10^{-1}$	1	16,2	16,0	0
	2	15,0		
EA $10^{-2}$	1	15,4	16,0	0
	2	15,7		
AE $10^{-2}$	1	17,8	18,0	0
	2	18,3		
AE $10^{-3}$	1	15,3	15,0	0
	2	15,4		
AE $10^{-4}$	1	14,5	15,0	0
	2	15,8		

fisicoquímicos in vitro han caracterizado a los AE, en su mayoría como antioxidantes y demuestran que las mezclas complejas de compuestos aromáticos presentes en aceites esenciales aislados de plantas pueden tener efectos protectores celulares actuando también como antinflamatorios (Miguel 2010). Los resultados de este estudio concuerdan con los de otras investigaciones donde aceites esenciales de plantas han sido utilizados

de manera exitosa en terapias para control microbiano pues presentan de manera simultánea actividad antimicrobiana y efecto inocuo sobre el humano (Laciar et al. 2009).

Teniendo en cuenta el modelo utilizado se puede afirmar que el extracto acuoso de *C. candamarcensis* no induce citotoxicidad en ninguna de las dosis evaluadas, sin embargo no se cuenta con un análisis químico que permita

hacer inferencias al respecto; estudios realizados por Chinoy et al. (1994), con el extracto acuoso de semillas de otras especies del género *Carica* demuestran que no generan ningún tipo de daño en células reproductivas y renales.

El ensayo de mutagenecidad en *S. typhimurium* (Test de Ames cepa TA100) realizado en este estudio, demostró que las dosis evaluadas para AE y EA de *C. candamarcensis* no inducen efecto mutagénico *con* y *sin* activación metabólica en la cepa TA 100 de *S. typhimurium*. Estudios con diferentes aceites esenciales o sus componentes principales han demostrado que, de manera general no inducen mutaciones nucleares. Según Bakkali et al. (2008), la mayor parte de los aceites esenciales se han caracterizado por ser citotóxicos sin ser mutagénicos, es probable que también estén desprovistos de carcinogenicidad; esto concuerda con los resultados de este estudio donde a pesar que se detectó efectos citotóxicos en dosis elevadas de AE, en ninguna dosis se encontró efecto mutagénico.

La caracterización preliminar del AE de frutos maduros de *C. candamarcensis* obtenida por MWHD mediante cromatografía de gases indica la presencia de varias especies químicas en donde predominan los compuestos oxigenados con un 72% y el restante 28% está conformado por hidrocarburos saturados, insaturados y aromáticos, monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos nitrogenados (Gómez y Moran 2005) Mena et al. (2005). Rompelberg et al. (1995) señalaron que estos extractos constituyen mezclas complejas en las que se pueden encontrar compuestos con actividad antimutagénica, como monoterpenos y sesquiterpenos que pueden debilitar o inhibir el efecto genotóxico potencial.

Jahangir et al. (2006) encontraron que farnesol, uno de los compuestos presentes en el aceite esencial de chilacuán, tiene propiedades quimiopreventivas ya que disminuye el daño oxidativo que causa el hierro en tejidos y

órganos, previniendo la formación de tumores en modelos murinos. Este sesquiterpeno es un compuesto ampliamente utilizado en la industria farmacéutica y cosmética gracias a que presenta diferentes niveles de actividad biológica como: bactericida, fungicida y antinflamatorio como lo demostró Koo (2003).

Di Sotto et al. (2008) realizaron estudios *in vitro* mediante el ensayo de Ames con *S. typhimurium* en las cepas TA 98 y TA 100, y sobre *Escherichia coli* con la cepa WP2uvrA que demostraron que el linalool, monoterpено presente en el AE de chilacuán, es un agente antioxidante que puede estar ejerciendo un efecto protector con acción antimutagénica.

Se recomienda sin embargo ampliar la evaluación de estos extractos con otras cepas como la TA 98 que permitan descartar otro tipo de mutaciones.

En el ensayo de genotoxicidad (ensayo cometa), tanto el EA como el AE de chilacuán no inducen efecto genotóxico en ninguna de las dosis evaluadas en el sistema de ensayo empleado. Bakkali et al. (2008), señalaron que una ventaja representativa de los aceites esenciales es el hecho que ellos por lo general son desprovistos de riesgos genotóxicos a largo plazo. Además, Bakkali et al. (2005) demostraron que algunos de ellos presentan capacidad antimutagénica muy clara que bien podría ser vinculada a una actividad anticancerígena.

Beric et al. (2008) determinaron que el linaool redujo la mutagénesis espontánea en la cepa de *E. coli* K12 del 27 en un 44%; las pruebas del efecto antigenotóxico fueron comparables al modelo antioxidante de la vitamina E, ya que redujeron el número de cometas inducidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre el 45 al 70%, este efecto podría ser atribuido a sus propiedades antioxidantes.

Particularmente sobre el compuesto farnesol, Jahangir et al. (2006) han registrado los

efectos protectores, la disminución del daño oxidativo y quimiopreventivo; con base en esto es posible suponer que este compuesto, o en conjunto con otros, puede haber influido en que la respuesta haya sido negativa al antagonizar cualquier efecto genotóxico que pudiera inducir algún otro compuesto presente en el extracto, situación muy común en la mayoría de las especies vegetales y que contribuye a fundamentar la inocuidad de su uso en la medicina tradicional.

De igual manera, existen registros de extractos acuosos de plantas con actividad antigenotóxica y antitumoral como el de Silva et al. (2008); es importante señalar que estudios de Mello et al. (2008) con enzimas proteolíticas obtenidas de frutos de *C. candamarcensis* han evidenciado un efecto protector ante la ulceración de la mucosa gástrica en modelos murinos, que probablemente este asociado a un efecto mitogénico que favorece la recuperación de la mucosa gástrica; por lo tanto, y con base en los resultados de este estudio es importante realizar estudios de antimutagenecidad con la misma prueba de Ames y antigenotoxicidad con ensayo cometa con los dos extractos evaluados, además del efecto antioxidante y quimio protector que puedan tener.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los extractos de *C. candamarcensis*, con base en los modelos usados en este estudio se pueden considerar que, el EA es seguro para consumo desde los aspectos citotóxico, genotóxico y mutagénico; y que para el caso de AE se consideran dosis seguras de  $10^{-2}$  e inferiores.

Sánchez et al. (2003) consideraron que existen tres diferentes niveles de daño al ADN que deben ser evaluados por diferentes métodos, el primer nivel, se evalúa usando ensayos que detecten específicamente daño por rupturas en el ADN, el segundo, es por mutación en los genes, y el tercero, mediante ensayos de citogenética,

en este se realizaron ensayos para descartar daño en los dos primeros niveles.

En conclusión, este estudio demuestra que según las pruebas utilizadas todas las concentraciones evaluadas son seguras a nivel citotóxico, genotóxico y mutagénico. Sin embargo, se requieren estudios adicionales con otros métodos de ensayo que permitan confirmar o descartar si los extractos inducen daños relevantes sobre el ADN, si tienen efectos antigenotóxicos y antimutagénicos para contemplar, así, su posterior inclusión en el desarrollo de un fitofármaco de *C. candamarcensis* como tratamiento complementario en pacientes con antecedentes de infección de *H. pylori*.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la financiación de este trabajo al Sistema de Investigaciones y al Centro de Estudios en Salud de la Universidad de Nariño, al Grupo de Investigación Salud Pública de la Universidad de Nariño, a Jaime Calle y al equipo de Laboratorio de Mutagénesis de la Universidad de Antioquia por su colaboración en el desarrollo del proyecto y a Jhon Jairo Calderón por sus aportes en el componente estadístico.

## REFERENCIAS

- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Zhiri A, Idaomar M. 2005. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mutation Research, 585 (1-2): 1-13.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils. Food and Chemical Toxicology [Internet], 46 (2): 446-475. Fecha de acceso: 08 de enero de 2010. Disponible en: <<http://es.scribd.com/doc/25331323/2008-Biological-Effects-of-Essential-Oils-A-Review>>.
- Bergonzelli GE, Donnicola D, Porta N, Corthésy-Theulaz IE. 2003. Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47 (10): 3240-3246.
- Beric T, Nikolic B, Stanojevic J, Vukovic-Gacic B, Knezevic-Vukcevic J. 2008. Protective effect of basil

- (*Ocimumbasilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. Food and Chemical Toxicology, 46 (2): 724-732.
- Boyum A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, Supplement, 97: 77-89.
- Brugés K, Reguero-Reza M. 2008. Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. Revista Colombiana de Biotecnología [Internet], 9 (1): 5-13. Fecha de acceso: 10 de agosto de 2011. Disponible en: <<http://redalyc.uaemex.mx/pdf/776/77690102.pdf>>.
- Camargo MC, Yepez MC, Ceron C, Guerrero N, Bravo LE, Correa P, Fonham E. 2004. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: comparison of two areas with contrasting risk o gastric cancer. Helicobacter, 9 (3): 262-270.
- Chinoy NJ, D'Souza JM, Padman P. 1994. Effects of crude aqueous extract of *Carica papaya* seeds in male albino mice. Reproductive Toxicology, 8 (1): 75-79.
- Day RP. 1972. Basophil leucocyte separation from human peripheral blood: a technique for their isolation in high purity and high yield. Clinical and Experimental Allergy, 2 (3): 205-212.
- DiSotto A, Evandri MG, Mazzanti G. 2008. Antimutagenic and mutagenic activities of some terpenes in the bacterial reverse mutation assay. Mutation Research, 653 (1-2): 130-133.
- Gasbarrini A, Franceschi F, Gasbarrini G. 1998. *Helicobacter pylori* y enfermedades extradigestivas. En: Pajares JM, Correa P, Pérez GI, editores. Infección por *Helicobacter pylori* en lesiones gastroduodenales. La segunda década. Barcelona (España): Prous Science, S. A. p. 99-105.
- Gomes MT, Mello VJ, Rodrigues KC, Bemquerer MP, Lopes MT, Faça VM, Salas CE. 2005. Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogens for mammalian cells. Planta Medica, 71 (3): 244-248.
- Gómez D, Morán M. 2005. Extracción e identificación de los metabolitos secundarios presentes en los frutos maduros de *Carica candamarcensis Hooker filius* [Tesis de Grado]. [Pasto (Colombia)]: Universidad de Nariño. p. 250.
- González-Carbajal PM. 2002. El problema de la erradicación del *Helicobacter pylori*, la infección bacteriana más difundida en el mundo. Revista Cubana de Medicina General Integral, 18 (3): editorial. Fecha de acceso: 5 de junio de 2010. Disponible en: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_issues&cid=0864-212520020003&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_issues&cid=0864-212520020003&lng=es&nrm=iso)>.
- Goodman KJ, Correa P, Tenganá-Aux HJ, Ramírez H, JP DeLany, Guerrero-Pepinosa O, López-Quiñones M, Collazos-Parra T. 1996. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathways. American Journal of Epidemiology, 144 (3): 290-299.
- Jahangir T, Khan TH, Prasad L, Sultana S. 2006. Farnesol prevents Fe-NTA-mediated renal oxidative stress and early tumour promotion markers in rats. Human and Experimental Toxicology, 5: 235-242.
- Koo H. 2003. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 52 (5): 782-789.
- Laciár A, Ruiz ML, Flores RC, Saad JR. 2009. Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia echevariae* Hieron (Asteraceae). Revista Argentina de Microbiología, 41 (4): 226-231.
- Maron D, Ames B. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research, 113 (3-4): 173-215.
- Mello VJ, Gomes MT, Lemos FO, Delfino JL, Andrade SP, Lopes MT, Salas CE. 2008. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. Phytomedicine, 15 (4): 237-244.
- Mena J, Yepez M, Santacruz A, Noguera E. 2005. Actividad antibacteriana in vitro de extractos de *Carica candamarcensis* sobre aislamientos de *Helicobacter pylori*. Revista del Centro de Estudios en Salud (Universidad de Nariño), 5 (6): 13-21.
- Miguel MG. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. Molecules, 15 (12): 9252-9286.
- Mortelmans K, Zeiger E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Mutation Research, 455 (1-2): 29-60.
- Pandrangi R, Petras M, Ralph S, Vrzoc M. 1995. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. Environmental and molecular mutagenesis, 26 (4): 345-356.
- Rojas E, Lopez MC, Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 722 (1-2): 225-254.
- Rompelberg CJ, Stenhuis WH, de Vogel N, van Osenbruggen WA, Schouten A, Vehagen H. 1995. Antimutagenicity of eugenolin in the rodent bone marrow micronucleus test. Mutation Research, 346 (2): 69-75.
- Sánchez F, Radaeva TV, Nikonenko BV, Persson AS, Sengul S, Schalling M, Schurr E, Apt AS, Lavebratt C. 2003. Multigenic control of disease severity after virulent *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. Infection and Immunity, 71 (1): 126-131.
- Sherif M, Mohran Z, Fathy H, Rockabrand DM, Rozmajzl PJ, French RW. 2004. Universal high-level primary metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* isolated from children in Egypt. Journal of Clinical Microbiology, 42 (10): 4832-4834.

- Silva CR, Monteiro MR, Rocha HM, Ribeiro AF, Caldeira-de-Araujo A, Leitão AC, Bezerra RJ, Pádua M. 2008. Assessment of antimutagenic and genotoxic potential of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) aqueous extract using in vitro assays. *Toxicology In Vitro*, 22 (1): 212-218.
- Singh NP, Mccoy MC, Tice RR, Schneider. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175 (1): 184-191.
- Teixeira RD, Ribeiro HAL, Gomes MTR, Lopes MTP, Salas CE. 2008. The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46 (11): 956-961.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J-C, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221.
- Watanabe T, Hasei T, Takahashi Y, Otake S, Murahashi T, Takamura T, Hirayama T, Wakabayashi K. 2003. Mutagenic activity and quantification of nitroarenes in surface soil in the Kinki region of Japan. *Mutation Research*, 538 (1-2): 121-131.
- Wu JY, Kim JJ, Reddy R, Wang WM, Graham DY, Kwon DH. 2005. Tetracycline-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (2): 578-583.