

Efecto antimutagénico del extracto etanólico de *Bauhinia forficata* Link (Pata de buey) en *Drosophila melanogaster* mediante el Test de Mutación y Recombinación Somática

Marín Insfrán, L.^{1*}; Gayozo, E.¹ & Zamorano-Ponce, E.²

¹Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biología. Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental.

²Universidad del Bío-Bío. Facultad de Ciencias. Departamento de Ciencias Básicas. Laboratorio de Genética Toxicológica (GENETOX).

*E-mail del autor: luis.marinsfran@gmail.com

Efecto antimutagénico del extracto etanólico de *Bauhinia forficata* Link (Pata de buey) en *Drosophila melanogaster* mediante el Test de Mutación y Recombinación Somática. En Paraguay la cultura de la fitoterapia, para el tratamiento de numerosas afecciones, se encuentra muy arraigada a la población. *Bauhinia forficata* es consumida en decocciones e infusiones para tratar afecciones de piel, garganta, pecho y estómago principalmente. El objetivo de este trabajo fue evaluar las acciones mutagénicas y antimutagénicas del extracto etanólico de hojas de *B. forficata* empleando el test SMART en *Drosophila melanogaster*. Para ello, se realizó el extracto etanólico de hojas de *B. forficata* obteniéndose un rendimiento de 5,05% en extracto crudo. La evaluación antimutagénica se llevó a cabo en larvas trans-heterocigotas *mwh+/*flr*³* mediante cuatro procedimientos, (1) el tratamiento simple, que comprobó que el extracto etanólico de hojas de *B. forficata* a 52,01 mg.mL⁻¹ no posee efecto genotóxico, en comparación con el Peróxido de Hidrógeno 0,96 M, que presentó dicho efecto, (2) tratamiento combinado (Peróxido de Hidrógeno al 0,96 M + extracto 52,01 mg.mL⁻¹) evidenció reducción del 57,89% en el total de clones mutantes; (3) el post-tratamiento (Peróxido de Hidrógeno 0,96 M por una hora + extracto 52,01 mg.mL⁻¹ por 48 horas) presentó una reducción del 57,89%; (4) el pretratamiento (extracto 52,01 mg.mL⁻¹ por 72 horas + tratamiento con el Peróxido de Hidrógeno 0,96 M por 48 horas) demostró una disminución del 78,94% de clones mutantes inducidos. Dichos resultados fueron analizados mediante el test de Kastenbaum-Bowman $\alpha=\beta=0,05$, evidenciando resultados positivos para el potencial antimutagénico del extracto de *B. forficata* 52,01 mg.mL⁻¹, demostrando también su acción protectora en la reducción del daño genético ocasionado por eventos mutagénicos inducidos.

Palabras claves: *Drosophila melanogaster*, SMART, *Bauhinia forficata*, antigenotoxicidad, mutaciones

Antimutagenic effect of the ethanolic extract of *Bauhinia forficata* Link (Ox paw) in *Drosophila melanogaster* by the Mutation and Somatic Recombination Test. In Paraguay, phytotherapy culture, for treatment of numerous affections, is deeply rooted in the population. *Bauhinia forficata* is consumed in decoctions and infusions to treat mainly skin, throat, chest and stomach affections. The objective of this investigation was to evaluate the mutagenic and antimutagenic action of ethanolic leaf extract of *B. forficata* using SMART test in *Drosophila melanogaster*. For this, the ethanolic extract of *B. forficata* leaves was obtained, with a yield of 5.05% in crude extract. The antimutagenic evaluation was carried out on trans-heterozygous larvae *mwh+/*flr*³* by four procedures, (1) the simple treatment, which proved that the ethanolic extract at 52.01 mg.mL⁻¹ doesn't possess genotoxic effect, compared to the Hydrogen Peroxide 0.96 M, which showed this effect, (2) combined treatment (Hydrogen Peroxide 0.96 M + extract 52.01 mg.mL⁻¹) showed a reduction of 57, 89 % in the total of mutant clones; (3) post-treatment (Hydrogen Peroxide 0.96 M for one hour + extract 52.01 mg.mL⁻¹ for 48 hours) showed a reduction of 57.89 %; (4) pretreatment (extract 52.01 mg.mL⁻¹ for 72 hours + Hydrogen Peroxide 0.96 M for 48 hours) showed a decrease of 78.94 % in induced mutant clones. These results were analyzed by the Kastenbaum-Bowman test

Steviana, Vol. 11(1), 2019 pp. 15 – 25.

Original recibido el 30 de julio de 2019.

Aceptado el 09 de setiembre de 2019

$\alpha = \beta = 0.05$, showing positive results for antimutagenic potential of *B. forficata* extract 52.01 mg.mL⁻¹, also demonstrating its protective action in reducing genetic damage caused by induced mutagenic events.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, SMART, *Bauhinia forficata*, antigenotoxicity, mutations

INTRODUCCIÓN

En Paraguay existe una cultura arraigada en la utilización de plantas medicinales procedentes de los guaraníes, conocedores de las propiedades beneficiosas de plantas nativas y que emplearon acertadamente en la prevención y tratamiento de enfermedades que afectan al hombre (Melgarejo, 2014).

La *B. forficata*, conocida popularmente como “pata de buey” es empleada en decocción o con el tereré para el tratamiento de afecciones de piel, garganta, pecho, estómago, hígado y riñón; se conoce sus efectos como hipoglucemiante, antiinflamatorio, hipocolesterolemiante y diurético (Menezes *et al.*, 2007; de Sousa Lino *et al.*, 2004; Volpato *et al.*, 2008; Pin *et al.*, 2009).

La elevada concentración de flavonoides y compuestos fenólicos (Oliveira *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2006; Sartorelli & Correa 2007; Menezes *et al.*, 2007; Düsman *et al.*, 2013) permiten a esta planta poseer un potencial efecto antioxidante y consecuentemente preventivo a procesos mutagénicos inducidos por especies oxígeno-reactivas y que pueden conllevar a cambios genéticos conducente a procesos de transformación celular y subsecuentemente cáncer.

El extracto acuoso de *B. forficata* puede inactivar química o enzimáticamente e inhibir la formación de mutaciones en el ADN, también puede inhibir la activación metabólica de agentes promutágenos o pueden recoger moléculas reactivas, ya que pueden actuar directamente sobre los re-

ceptores de los mismos (Kada *et al.*, 1978; Kojima *et al.*, 1992; Kuroda *et al.*, 1992).

La actividad antioxidante que presenta el extracto acuoso de *B. forficata* se debe especialmente a la presencia de polifenoles y flavonoides, los cuales fueron encontrados en el trabajo de Salgueiro *et al.* (2016), mediante la reducción de la peroxidación lipídica y los niveles de tioles totales (SH) no proteicos en eritrocitos humanos.

Los polifenoles, especialmente los flavonoides, al poseer una estructura ideal para la eliminación de radicales libres y para la interacción con los grupos activos mutágenos o para la protección de los sitios de ADN podrían ser afectados por el mutágeno (Droge, 2002; Ratnam *et al.*, 2006; Toloza & Fernández, 2015).

Se ha demostrado que el efecto causado por la generación de los radicales hidroxilos y por otras especies reactivas de oxígeno sobre la estructura del ADN es nocivo, ya que promueve la ruptura entre los fosfatos de la doble cadena debido a la inestabilidad de la misma, ocasionando mayores daños a nivel de cromatina, generando transcripciones erróneas de información genética y subsecuentes alteraciones a la estructura general de las células y los tejidos (Conde, 2004).

El Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) es un agente genotóxico, que es capaz de producir modificaciones de las características particulares del ADN, capaz de dar lugar a múltiples reacciones, llegando a producir un daño celular al encontrarse en elevadas cantidades, ocurre sobre diferentes macromoléculas, tal es el caso de

lípidos, proteínas y ADN, conociéndose a este daño como estrés oxidativo. En el ADN, el estrés oxidativo puede dar lugar a fenómenos como mutaciones y carcinogénesis. Los linfocitos humanos periféricos representan una población celular donde el ADN está predominantemente en la etapa presintética del ciclo celular, fase G0 (Camacho *et al.*, 2010).

Con los antecedentes expuestos y atendiendo a la riqueza de flavonoides en la planta, en esta investigación se propone como objetivo general evaluar el efecto antimutagénico de *B. forficata* utilizando el Test de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en *D. melanogaster* y debido a que la planta es utilizada como terapia alternativa para la prevención de patologías asociadas a estrés oxidativo celular, esta técnica permitirá la detección de la actividad antioxidante in vivo (antimutagénica) y la seguridad para su uso.

MATERIALES & MÉTODOS

Material vegetal estudiado

Las muestras vegetales fueron colectadas del vivero de plantas medicinales (coordenadas: -25.253529, -57.567852), del Jardín Botánico y Zoológico de Asunción (JBZA). Paraguay. Ciudad de Asunción. JBZA. Arbol, con frutos secos. Las muestras fueron depositadas en el Herbario del Laboratorio de Recursos Vegetales de la FACEN (Marín, L., 01) para la identificación botánica por especialistas con claves taxonómicas y base de datos de Fortunato (1986).

Preparación del extracto etanólico de hojas de *B. forficata* Link

Las hojas fueron secadas a temperatura ambiente de entre 19-21° C. Estas fueron trituradas con ayuda de un molino manual

de granos hasta que quedaron pulverizadas. De esta se pesó 500 gramos y se disolvió en 2 litros de etanol destilado al 70% durante 30 días (cada 48 horas se procedió al agitación) a temperatura ambiente, posteriormente, el macerado se filtró con ayuda de un equipo filtrador. La concentración del extracto etanólico se hizo mediante un evaporador rotativo QUIMIS® a 80° C, luego de esto se procedió al calentamiento con ayuda de baño maría para eliminar totalmente el solvente de la muestra, obteniéndose el extracto crudo. El rendimiento fue de 5,05% y fue conservada a 4° C hasta su utilización. Para la preparación del extracto etanólico se utilizó Tween 80 0,1%.

Test de Mutación Somática y Recombinación (SMART) para determinar el efecto antimutagénico del extracto etanólico de *Bauhinia forficata* frente al Peróxido de Hidrógeno

Previa a la determinación de la actividad antimutagénica de la planta se procedió al análisis de su posible efecto mutagénico y debido a que no se encontró efecto mutagénico en diferentes concentraciones (10,01 mg.mL⁻¹, 25,50 mg.mL⁻¹, 52,01 mg.mL⁻¹, 75,41 mg.mL⁻¹ y 101,76 mg.mL⁻¹) y en la concentración de 52,01 mg.mL⁻¹ se encontraron menor cantidad de pelos mutados y por tal motivo, se decidió a elegir esa concentración como la ideal para determinar la antimutagenicidad de la planta.

Para esta parte se obtuvieron hembras vírgenes de *Drosophila melanogaster* (cepa *flr³/In(3LR)TM3, ri p^{sep} I(3)89Aa bx^{34e} y Bd^S*) en condiciones normales de temperatura ambiente (22°-24° C). Las hembras obtenidas se cruzaron con machos de *Drosophila melanogaster* (cepa *mwh/mwh*), todas las cruces fueron

depositadas en un medio ovopositor (Graf *et al.*, 1984). Se procedió a la extracción de 600 larvas de tercer estadio (tercer instar), de las cuales 500 fueron expuestas a diferentes tratamientos crónicos (A, B, C, D, E), 100 fueron tratadas por una hora con el agente mutágeno (F), pasada esa hora se procedió a lavarlas con agua destilada a modo de deshacer restos del mutágeno y fueron transferidas a otro medio que contenía el extracto etanólico. También se extrajeron 100 larvas de segundo estadio (segundo instar) para ser sometidas por 72 horas con el extracto etanólico (G), después de ese tiempo se lavaron las larvas con agua destilada, para de esa manera eliminar los restos del extracto y fueron trasladadas a otro medio, para ser sometidas por 48 horas con el agente mutágeno. Todos los medios fueron preparados con 1,5 g de puré de papa instantáneo Knorr®, rehidratados con las diferentes sustancias testadas.

Se procedió también al análisis de toxicidad del Tween 80 0,1 % (C) debido a que este compuesto se empleó para la preparación de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de la planta.

Como control positivo se utilizó H₂O₂ a una concentración de 0,96 M resultante de la prueba de determinación de dosis letal 50 (DL₅₀), esto debido a que dicho compuesto genera con facilidad radicales libres.

Como control negativo se utilizó agua destilada - **Tabla 1**.

Procedimientos para el análisis de las láminas

Una vez eclosionadas las moscas adultas, se procedió sacrificarlos por sobredosis con Éter Etilico, y se seleccionaron al azar 10 individuos transhetero-

cigotas *mwh+/+flr³* de cada tratamiento (5 individuos de cada sexo), de las cuales se extrajeron las alas con ayuda de una Lupa estereoscópica Carl Zeiss® y se montaron en una lámina con Solución de Faüre (Goma arábica 300 gramos, Glicerol 20 mL, Hidrato de Cloral 50 gramos, y Agua destilada 50 mL). La observación de las láminas con las alas correspondientes se realizó con ayuda del microscopio óptico Olympus® a un aumento de 400X, los sectores o regiones de las alas analizadas fueron las regiones A, B, C', C, D', D y E según lo descrito por Rodrigues de Andrade *et al.* (2004).

Se cuantificó el índice de aparición de las manchas mutantes, se clasificó los clones mutantes según los criterios descritos por Rodrigues de Andrade *et al.* (2004).

Se determinó el porcentaje de inhibición ejercida por el extracto etanólico de *B. forficata* a la acción del agente mutágeno, empleando la siguiente ecuación:

$$\left\{ \frac{\text{TM con el AM} - (\text{TM con el extracto} + \text{AM})}{\text{TM con el AM}} \right\} * 100$$

Dónde:

TM: Total de mutaciones

AM: Agente mutágeno

Análisis estadístico de datos

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante tablas propuestas por Frei y Würzler (1988) que corresponde a un modelo estadístico Binomial Condicional (Test de Kastenbaum-Bowman) (Kastenbaum & Bowman, 1970) $\alpha=\beta=0,05$. Los gráficos estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 6.00, La Jolla California USA.

Tabla 1. Diseño metodológico de los tratamientos

Unidad Experimental	Número de larvas	Tratamientos	Pretratamiento	Postratamiento
Tratamiento simple	100	5 mL de Agua destilada (A)		
	100	5 mL de extracto etanólico (52,01 mg.mL ⁻¹) (B)	—	—
	100	5 mL de Tween 80 al 0.1% (C)		
	100	5 mL Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) (D)		
Tratamiento combinado	100	5 mL Extracto etanólico (52,01 mg.mL ⁻¹) junto con el Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) (E)	—	—
Pretratamiento con el agente mutágeno y post tratamiento con el extracto	100		5 mL de Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) tratado por una hora	5 mL de Extracto etanólico (52,01 mg.mL ⁻¹) por 48 horas (F)
Pre tratamiento con el extracto y postratamiento con el mutágeno	100 (2do. Estadio)		5 mL de Extracto etanólico (52,01 mg.mL ⁻¹) por 72 horas	5 mL de Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) tratado por 48 horas (G)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados hallados en el tratamiento simple con el extracto etanólico de *B. forficata* (52,01 mg.mL⁻¹) (**B**), evidenciaron 6 clones para manchas simples y pequeñas, con una frecuencia de 0,3, ningún clon para manchas simples grandes al igual que para manchas gemelas; a su vez, en el tratamiento con el H₂O₂ a 0,96 M (**D**) se contaron 19 clones para manchas simples y pequeñas, con una frecuencia de 0,95 ningún clon para manchas simples y grandes, al igual que para manchas gemelas; en cuanto al tratamiento con Agua des-

tilada (**A**) se contaron 7 clones para manchas simples y pequeñas, 2 clones para manchas simples y grandes; y ningún clon para manchas gemelas, con frecuencias de 0,35, 0,1, respectivamente; el tratamiento con Tween 80 a 0,1% (**C**) se contabilizaron 9 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, al igual que los clones gemelos, con frecuencias de 0,45 para las primeras - Tabla 2, Fig. 1.

Este tratamiento demuestra que el extracto etanólico a la concentración evaluada (52,01 mg.mL⁻¹) resultó negativo para su acción genotóxica ($P=0,0308$); en

Tabla 2. Análisis estadístico del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de *B. forficata*. Cruce estándar.

Tra- ta- mien- -tos	Número de alas	MSP (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	a	MSG (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5	a	MG <i>m</i> = 5	a	TM <i>m</i> = 2	a	Inhibi- ción (%)
A	20	0,35 (07)		0,10 (02)		0,00 (00)		0,45 (09)		-
B	20	0,30 (06)	i	0,00 (00)	i	0,00 (00)	i	0,30 (06)	-	-
C	20	0,45 (09)	i	0,00 (00)	i	0,00 (00)	i	0,45 (09)	i	-
D	20	0,95 (19)	+	0,00 (00)	i	0,00 (00)	i	0,95 (19)	+	-
E	20	0,40 (08)	i	0,00 (00)	i	0,00 (00)	i	0,40 (08)	i	57,89
F	20	0,40 (08)	i	0,00 (00)	i	0,00 (00)	i	0,40 (08)	i	57,89
G	20	0,15 (03)	-	0,05 (01)	i	0,00 (00)	i	0,20 (04)	-	78,94

a (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 $\alpha = \beta = 0,05$)

^b Incluso las manchas simples *flr*³ raras.

A: Agua destilada, **B:** Extracto etanólico a 52,01 mg.mL⁻¹, **C:** Tween 80 0,1%, **D:** Peróxido de Hidrógeno a 0,96M, **E:** Extracto etanólico a 52,01 mg.mL⁻¹ + Peróxido de Hidrógeno a 0,96M, **F:** Postratamiento con el extracto etanólico a 52,01 mg.mL⁻¹, **G:** Pretratamiento con el extracto etanólico a 52,01 mg.mL⁻¹.

comparación con las registradas con el H₂O₂ a 0,96 M que si presentaron acciones mutagénicas ($P = 0,6228$) (Tabla 2).

Pereira *et al.* (2014) demostraron que el extracto hidroalcohólico de las hojas no presentaba actividad mutagénica, mediante el test de micronúcleos en ratones albinos (Swiss) usando concentraciones de 1000, 1500 y 2000 mg.kg⁻¹. Camparoto *et al.* (2002) empleando células de la médula ósea de rata Wistar (*Rattus norvegicus*), tampoco encontraron actividad citotóxica para el extracto acuoso de *B. forficata* en una concentración de 4,65 g.L⁻¹. Pepato *et al.* (2004), recurriendo a ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina y post tratadas con el extracto acuoso de hojas de *B. forficata* a una concentración de 150 g.L⁻¹,

han demostrado que el extracto acuoso disminuye la actividad diabética, sin causar daño tisular.

En el tratamiento combinado del extracto a 52,01 mg.mL⁻¹ junto con el H₂O₂ a 0,96 M (**E**), se contaron 8 clones para manchas simples y pequeñas, con una frecuencia de 0,8, ningún clon para manchas simples y grandes, al igual que para manchas gemelas (Tabla 2, Fig. 1).

El tratamiento combinado muestra resultados inconclusos, a pesar de tener menos cantidad de clones, en este caso 8 clones, con frecuencia de 0,40 comparado con los 19 clones, con frecuencia de 0,95 del H₂O₂ a 0,96 M, registrándose una reducción de 57,89% de inhibición mutagénica (Tabla 2)

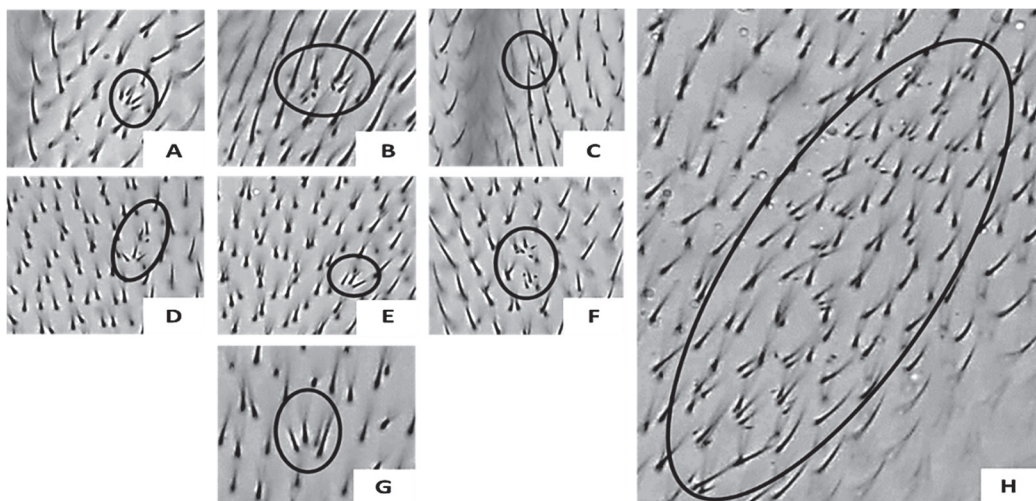


Figura 1. Clones encontrados en alas de *D. melanogaster* tratadas para la determinación del potencial antimutagénico del extracto etanólico de *B. forficata* frente al Peróxido de Hidrógeno. **Tratamiento simple:** Mancha Simple y Pequeña (MSP) del tipo *mwh* (A y B). **Tratamiento combinado:** Mancha Simple y Pequeñas (MSP) del tipo *mwh* (C y D). **Post tratamiento:** Mancha Simple y Pequeñas (MSP) del tipo *mwh* (E y F). **Pretratamiento:** Mancha Simple y Pequeñas (MSP) del tipo *mwh* (G) y Mancha Simple y Grande (MSG) del tipo *mwh* (H). Aumento (400X). Microscopio Óptico Compuesto Motic®.

La disminución en la cantidad de clones mutantes comparadas con las observadas en el tratamiento con el agente mutágeno, podría deberse, según Graf *et al.* (1984) y Jiménez (2013), a que la sustancia evaluada tiene un efecto general sobre la actividad de la genotoxina. A su vez, Ribeiro *et al.* (2013) demostraron también actividad antimutagénica del extracto etanólico de *B. holophylla* a concentración de $7,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en células del carcinoma hepatocelular (HepG2) registrándose una disminución del 76% en la frecuencia de micronúcleos inducidos por Benzopireno y Düsman *et al.* (2013) utilizando ratas Wistar y un extracto acuoso de hojas frescas de *B. forficata*, a la concentración de $4,65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, encontraron una reducción del 91,4% en las alteracio-

nes cromosómicas inducidas por la Ciclofosfamida.

En el pretratamiento del H_2O_2 a 0,96 M con el extracto etanólico (F) se contaron 8 clones para manchas simples y pequeñas, con una frecuencia de 0,4, ningún clon para manchas simples y grandes, al igual que para manchas gemelas (Tabla 2, Fig. 1).

El pretratamiento con H_2O_2 a 0,96 M muestra resultado inconcluso, pero contiene menos cantidad de clones, en este caso 8 clones con frecuencia de 0,40 comparado con 19 clones con frecuencia de 0,95 del H_2O_2 a 0,96 M del tratamiento con el agente mutágeno, evidenciándose una reducción de 57,89% en la acción del H_2O_2 (Tabla 2).

La disminución en la cantidad de clones

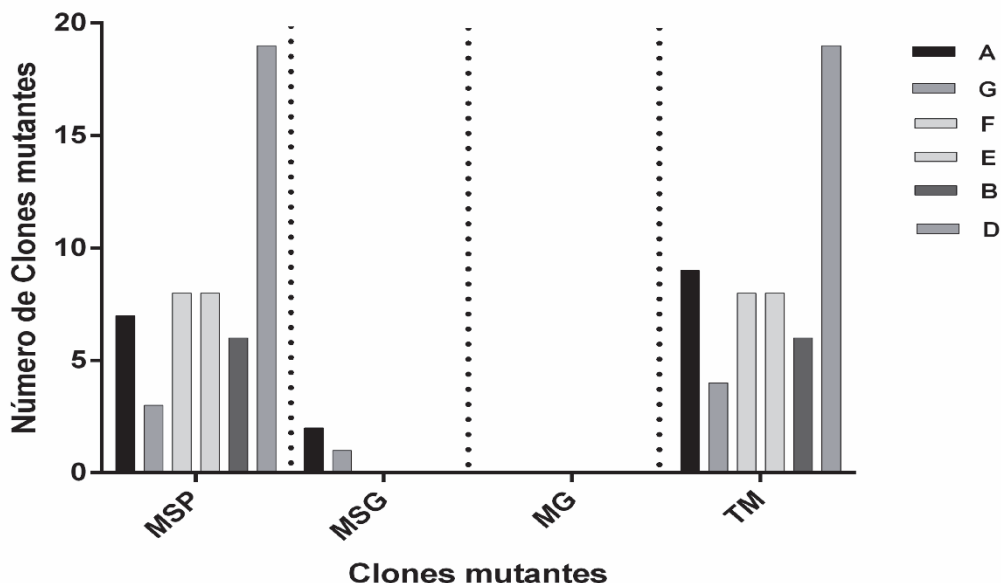


Figura 2: Número de Clones mutantes observados en los ensayos por tratamiento. (A): Agua destilada. (B): Extracto etanólico de *B. forficata* 52,01 mg.mL⁻¹. (D): Peróxido de Hidrógeno 0,96 M (E): Peróxido de Hidrógeno 0,96 M junto con el extracto etanólico de *Bauhinia forficata* (52,01 mg.mL⁻¹). (F): Peróxido de Hidrógeno 0,96 M (1 hora) post tratado con el extracto etanólico de *B. forficata* 52,01 mg.mL⁻¹ (48 horas). (G)= Extracto etanólico de *B. forficata* 52,01 mg.mL⁻¹ (72 horas) post tratado con el Peróxido de hidrógeno 0,96 M (48 horas).

con el pretratamiento podría deberse según Graf *et al.* (1984) y Jiménez (2013), a que la sustancia probada detiene las lesiones fijadas o inducidas por la genotoxina, lo cual también fue registrado por Düsman *et al.* (2013) mediante la utilización de un post-tratamiento con extracto acuoso de hojas frescas de *B. forficata*, a una concentración de 4,65 g.L⁻¹ en ratas Wistar, quienes evidenciaron una reducción del 94,6% en las alteraciones cromosómicas inducidas por la Ciclofosfamida.

El pretratamiento con el extracto etanólico de *B. forficata* 52,01 mg.mL⁻¹ (72 horas) junto con un tratamiento con H₂O₂ a 0,96 M (48 horas) (G) se contaron 3 clones para manchas simples y pequeñas, con frecuencia igual a 0,15, 1 clon para mancha simple y grande, con frecuencia de

0,05, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 4 manchas, con frecuencias igual a 0,20 (Tabla 2, Fig. 1).

El pretratamiento con el extracto etanólico de *B. forficata* a 52,01 mg.mL⁻¹ demuestra que hay una disminución en la cantidad de clones mutados, 4 clones con frecuencia de 0,20, siendo negativo para su acción genotóxica ($P=0,0088$) comparado con los 19 clones con frecuencia de 0,95 que sí evidenció actividad mutagénica ($P=0,6228$) en el H₂O₂ a 0,96 M, evidenciando una reducción de 78,94% en la acción del H₂O₂ (Tabla 2)

Con este resultado queda demostrado que el extracto etanólico de *B. forficata* podría ser un buen agente protector, ya que fue capaz de prevenir la formación de clones mutados, según Graf *et al.* (1984) y

Jiménez (2013) el extracto podría actuar antes que las lesiones sean inducidas por la genotoxina, esto por su alto contenido de antioxidantes naturales, encontrados en los extractos ensayados por Salgueiro, *et al.* (2016) y Khalil *et al.* (2008). Düsman *et al.* (2013), empleando ratas Wistar, encontraron una reducción del 71,1% de mutaciones inducidas por Ciclofosfamida, utilizando extracto acuoso de hojas frescas de *B. forficata* a concentración 4,65 g.L⁻¹.

Al realizar una comparación entre todos los tratamientos realizados, se observa que se obtiene un mejor resultado en el pretratamiento con el extracto (Tabla 2, Fig. 2).

Las disminuciones de las alteraciones, podría ser causada por sustancias antimutagénicas que impiden la formación de la mutación o induce a la reparación del ADN, la cual fue comprobada también por Kada *et al.* (1978) mediante el ensayo de mutagenicidad con la cepa de Salmonella TA98 de Ames, Kojima *et al.* (1992) usando células V79 de hámster chino y Kuroda *et al.* (1992) usando cultivos celulares de mamíferos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que el extracto etanólico de *B. forficata* a la concentración de 52,01 mg.mL⁻¹ no presenta efecto mutagénico, sino que evidencian una acción antimutagénica, inhibiendo la acción genotóxica del Peróxido de Hidrógeno, con reducciones alentadoras de entre 57,89-78,94%.

Se recomienda seguir realizando estudios con metabolitos secundarios separados según la afinidad química de las mismas empleando otros ensayos como el test

cometa para estudiar la capacidad de reparación del ADN en *D. melanogaster*, el ensayo in vitro de micronúcleos, ensayo de mutación del receptor de células T para controlar la exposición genotóxica humana y el test genotoxicológico con marcadores moleculares (RAPD) para observar daños genéticos mediante cambios en perfiles electroforéticos.

REFERENCIAS

- Camacho, G.; Morán, J.; Betancourt, N.; Monreal K. & Benítez, M. (2010). Evaluación por ensayo cometa de daño celular inducido con Peróxido de Hidrógeno a linfocitos de sangre periférica *In vitro*. Departamento de Biología Celular. Universidad Autónoma de Aguas Calientes, México.
- Camparoto, M. L.; Teixeira de Oliveira, R.; Mantovani, M. S. & Vicentini, V. E. P. (2002). Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. *Genetics and Molecular Biology*, 25(1), 85-89.
- Conde Pérez-Prina, J.C. (2004). Daño al ADN en sangre periférica de ratones mutantes de catalasa.
- De Sousa Lino, C.; Diógenes, J. P. L.; Pereira, B. A.; Faria, R. A. P. G.; Neto, M. A.; Alves, R. S.; De Queiroz, M. G.; De Sousa, F. C. & Viana, G. S. B. (2004). Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(1), 125-127.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
- Düsman, E., Almeida, I. V. D.; Coelho, A. C.; Balbi, T. J.; Düsman Tonin, L. T., &

- Vicentini, V. E. P. (2013). Antimutagenic effect of medicinal plants *Achillea millefolium* and *Bauhinia forficata* in vivo. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013.
- Frei, H.; Würgler, F.E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects 203(4): 297-308. doi:10.1016/0165-1161(88)90019-2.
- Fortunato, R. H. (1986). Revisión del género *Bauhinia* (Cercideae, Caesalpinioidea, Fabaceae) para la Argentina. Darwiniana, 527-557.
- Graf, U.; Würgler F. E.; Katz, A.J.; Frei, H.; Juon, H.; Hall, C. B. & Kale, P. G. (1984). Somatic Mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environmental mutagenesis, 6(2), 153-188.
- Jiménez, M. R. 2013. Estudio antigenotóxico y de citotoxicidad de plantas medicinales de uso cotidiano y de sus fenoles más característicos (Doctoral dissertation, Universidad de Córdoba).
- Kada, T.; Morita, K., & Inoue, T. (1978). Anti-mutagenic action of vegetable factor (s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, 53(3), 351-353.
- Kastenbaum, M.A.; Bowman, K.O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 9(5): 527-549. doi:10.1016/0027-5107(70)90038-2.
- Khalil, N. M.; Pepato, M. T. & Brunetti, I. L. (2008). Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. Biological research, 41(2), 165-171.
- Kojima, H.; Konishi, H. & Kuroda, Y. (1992). Combined mutagenicity of methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate in Chinese hamster V79 cells. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 266(2), 171-180.
- Kuroda, Y.; Jain, A. K.; Tezuka, H. & Kada, T. (1992). Antimutagenicity in cultured mammalian cells. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 267(2), 201-209.
- Lim, H.; Lim, Y.; Cho, Y. H. & Lee, C. H. (2006). Induction of apoptosis in the HepHepG2 cells by HY53, a novel natural compound isolated from *Bauhinia forficata*. Journal of microbiology and biotechnology, 16(8), 1262-1268.
- Melgarejo, A. O. (2014). Contribución a la medicina natural: Pohã Ñana, un Manuscrito inédito en Guaraní (Paraguay, S. XVIII). *Corpus. Archivos virtuales de la alteridad americana*, 4(2). doi: 10.4000/corpusarchivos.1301.
- Menezes, F.D.S.; Minto, A.B.M.; Ruela, H.S.; Kuster, R.M.; Sheridan, H. & Frankish, N. (2007). Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. Rev. Bras. Farmacogn. 17: 8-13.
- Oliveira, C. Z.; Maiorano, V. A.; Marcussi, S.; Santana, C. D.; Januario, A. H.; Lourenco, M. V.; Sampaio Suely, V.; Fanca Suzelei, C.; Pereira, P. S. & Soares, A. M. (2005). Anticoagulant

- and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. *J. Ethnopharmacol.* 98: 213-216
- Pepato, M. T.; Baviera, A. M.; Vendramini, R. C. & Brunetti, I. L. (2004). Evaluation of toxicity after one-months treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 4(1), 7.
- Pereira, A. C. S.; Ribeiro, G. E.; Souza, L. C. R.; Rufino, L. R. A.; Cabral, I. S. R.; Boriollo, M. F. G. & Fiorini, J. E. (2014). Biologic activity of the hydroalcoholic extract of *Bauhinia forficata* Link on *Herpetomonas samuelpessoai* (Galvão.) Roitman. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16(3), 585-592
- Pin, A.; González, G.; Marín, G.; Céspedes, G.; Cretton, S.; Christen Thnopharmacol, P. & Roguet, D. (2009). Plantas Medicinales del Jardín Botánico de Asunción. AGR Servicios Gráficos. Paraguay. p 229.
- Ratnam, D. V.; Ankola, D. D.; Bhardwaj, V.; Sahana, D. K. & Kumar, M. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of controlled release*, 113(3), 189-207.
- Ribeiro, D. L.; Cilliao, H. L. & Specian, A. F. (2013). Protective effect and absence of apoptotic, cytotoxic and mutagenic effects of the extract of *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud in HePG2 cells. In *Proceedings of the 11th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM'13)* (p. 163).
- Rodrigues de Andrade, H.H.; Reguly, M.L. & Lehmann, M. (2004). Wing somatic mutation and recombination test. In *Drosophila Cytogenetics Protocols*, Ed. D. S. Henderson, 389- 412. Humana Press. Totowa. New Jersey.
- Salgueiro, A. C. F.; Folmer, V.; Da Silva, M. P.; Mendez, A. S. L.; Zemolin, A. P. P.; Posser, T.; Franco, J.L. & Puntel, G. O. (2016). Effects of *Bauhinia forficata* tea on oxidative stress and liver damage in diabetic mice. *Oxidative medicine and*
- Sartorelli, P. & Correa. D.S. (2007). Constituents of essential oil from *Bauhinia forficata* Link. *J. Essent. Oil Res.* 19: 468-469.
- Tolozza-Zambrano, P.; Avello, M. & Fernández, P. (2015). Determinación de rutina y trigonelina en extractos de hojas de *Bauhinia forficata* subsp. Pruinosa y evaluación del efecto hipoglucemiante en humanos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(1). pp.21-32.
- Version, G. P. (2014). 6.00 for Windows [computer program]. *Version. San Diego CA. GraphPadSoftware.*
- Volpato, G.T.; Damasceno, D.C.; Rudge, M.V.C.; Padonavi, C.R. & Calderon, I.M.P. (2008). Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 116:131-137.