

Actividad antioxidante y antimutagénica del extracto etanólico de rizomas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. (Taropé) en *Drosophila melanogaster* mediante el Test de Mutación Somática y Recombinación

de Oliveira, R.^{1*}, Gayozo, E.²; Martínez, M.³; Pereira Sihsner, C.⁴; Marín, L.²; Torres, E.²; Ferreira, F.⁵

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Odontología, Carrera de Odontología, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, San Lorenzo, Paraguay.

³Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Laboratorio de Recursos Vegetales-Área de Química Orgánica de los Productos Naturales, San Lorenzo, Paraguay.

⁴Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Laboratorio de Recursos Vegetales-Área de Botánica, San Lorenzo, Paraguay.

⁵Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química, Laboratorio de Instrumental, San Lorenzo, Paraguay.

*E-mail del autor: racdeoliveira@gmail.com

Actividad antioxidante y antimutagénica del extracto etanólico de rizomas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. (Taropé) en *Drosophila melanogaster* mediante el Test de Mutación Somática y Recombinación. *Dorstenia brasiliensis* es empleada popularmente en infusiones y maceraciones con el fin de curar afecciones orales, sin embargo, sus acciones ante la presencia de radicales libres y sustancias mutágenas son poco conocidas. Los objetivos de esta investigación fueron determinar las actividades antioxidantes y antimutagénicas del extracto crudo etanólico de rizomas de *D. brasiliensis*. La capacidad antioxidante del extracto crudo se cuantificó exponiendo cantidades de 400-1000 µg y 8-24 µg de ácido ascórbico (referencia) al radical •DPPH 3,9 mg% valorando absorbancia a 517 nm. La actividad antimutagénica se evaluó en cepas *Drosophila melanogaster* con marcadores mutantes recesivos *flr*³ y *mwh*, los cuales fueron sometidos a un pretratamiento con el extracto a 0,1; 1 y 10 mg.mL⁻¹, luego Uretano 1 mg.mL⁻¹, cotratamiento simultáneo Uretano 1 mg.mL⁻¹, junto con el extracto 0,1; 1 y 10 mg.mL⁻¹ y un postratamiento con el extracto 0,1; 1 y 10 mg.mL⁻¹, luego de un primer tratamiento con Uretano 1 mg.mL⁻¹; como controles se utilizaron agua destilada y Uretano 1 mg.mL⁻¹. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el test de Kastenbaum-Bowman $\alpha=\beta=0,05$. La IC₅₀ del extracto fue de 1355±0,5 µg y la del Ácido ascórbico 22,1±0,03 µg. También se registró una reducción en mutaciones del 64, 53 y 51%, en el pretratamiento, 40, 45 y 80% con el cotratamiento y 92, 68, 82% en el postratamiento con las concentraciones evaluadas. Los resultados indican baja actividad antioxidante ante la presencia del radical •DPPH y una elevada acción antimutagénica ante el mutágeno empleado.

Palabras clave: Carapiá, DPPH, radicales libres, SMART, Taropé

Antioxidant and antimutagenic activity of the ethanolic extract of rhizomes of *Dorstenia brasiliensis* Lam. (Taropé) in *Drosophila melanogaster* by Somatic Mutation and Recombination Test. *Dorstenia brasiliensis* is popularly used in infusions and macerations to treat oral affections, however, its actions in the presence of free radicals and mutagenic substances are poorly known. The objectives of this research were to determine the antioxidant and antimutagenic activities of the crude ethanolic extract of *D. brasiliensis* rhizomes. The antioxidant capacity of crude

Steviana, Vol. 12(1), 2020 pp. 15 – 28

Original recibido el 17 de junio de 2020

Acceptado el 13 de octubre de 2020

extract was quantified by exposing amounts of 400-1000 μg and 8-24 μg of Ascorbic acid (antioxidant reference) to the radical $\bullet\text{DPPH}$ 3.9 $\text{mg}\%$ evaluating absorbance at 517 nm wavelength. Antimutagenic activity was evaluated in *Drosophila melanogaster* strains with recessive mutant markers *flr*³ and *mwh*, which were pretreated with the extract at 0.1, 1 and 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ following by Urethane 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ treatment, simultaneous cotreatment with Urethane 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and extracts at 0.1, 1 and 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and finally a posttreatment with extracts at 0.1, 1 and 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, after a first treatment with Urethane 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; distilled water and Urethane 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ were used as controls. Data obtained was analyzed using Kastenbaum-Bowman test $\alpha\beta=0.05$. *D. brasiliensis* extract IC_{50} was $1355\pm 0.5\ \mu\text{g}$ and Ascorbic acid $22.1\pm 0.03\ \mu\text{g}$. There was also a reduction in mutations presence of 64, 53 and 51% in pre-treatment, reduction of 40, 45 and 80% with co-treatment and 92, 68, 82% in post-treatment at evaluated concentrations. The results indicate low antioxidant activity in the presence of the radical $\bullet\text{DPPH}$ and a high antimutagenic action against the mutagen used.

Keywords: Carapiá, DPPH, free radicals, SMART, Taropé

INTRODUCCIÓN

Los radicales libres son especies químicas, ya sean átomos, moléculas, iones, que poseen al menos un electrón desapareado en su órbita más externa, lo que las hace muy reactivas e inestables; capaces de generar reacción en cadena. Esas especies en número controlado se forman en el cuerpo y juegan un papel relevante en el metabolismo; las fuentes más importantes en el organismo son las mitocondrias y las células fagocíticas activadas como los monocitos, macrófagos y neutrófilos. Algunas situaciones externas como exposición a sustancias tóxicas, radiación ionizante, altas temperaturas, dietas hipercalóricas y ejercicio físico intenso favorecen su generación excesiva, lo que posibilita la mayor afectación de biomoléculas presentes en lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, azúcares y membranas celulares ocasionando la muerte celular, y alterando el funcionamiento del organismo (Roosevelt *et al.*, 2016).

Los antioxidantes son compuestos que contrarrestan a los radicales libres, lo que les permite actuar en la prevención. El desequilibrio ocasionado por la producción excesiva de radicales libres o la presencia insuficiente de antioxidantes, conocido co-

mo estrés oxidativo, se relaciona con el desarrollo de numerosas patologías, tales como algunos tipos de cáncer, el bloqueo de arterias y la degradación del sistema nervioso. Los antioxidantes biológicos son aquellas sustancias que al estar presentes en bajas concentraciones respecto a las biomoléculas pueden reducir o prevenir la destrucción oxidativa de ellas (Durán *et al.*, 2019).

Los antioxidantes son muy numerosos, su consumo se da mayormente a través de la dieta o como suplementos, en ese sentido muchos estudios actualmente evalúan su presencia en alimentos y plantas medicinales con el fin de tratar diversas enfermedades (Berdonces, 2019). Los podemos encontrar en alimentos de origen vegetal como hortalizas, legumbres, frutas, frutos secos y cereales. Los antioxidantes polifenoles y flavonoides pueden consumirse a través de té e infusiones (Ayuso *et al.*, 2018). Algunos ejemplos de infusiones con poder antioxidante son las elaboradas con el mate, la manzanilla, anís verde, el jengibre, la melisa, entre otras (Buitrago, 2018).

Entre las especies a las que se le atribuye valor medicinal se encuentra la *Dorstenia brasiliensis*, conocida comúnmente como Taropé, Contrayerba o Carapiá, es una especie perteneciente a la familia

de Oliveira, R. et al. Actividad antioxidante y antimutagénica del extracto etanólico de rizomas de Dorstenia brasiliensis en Drosophila melanogaster

Moraceae, se la puede encontrar en Paraguay, Brasil, Argentina y Uruguay; es una planta pequeña, perenne, con raíces de hasta 12 centímetros de largo, se caracteriza por tener raíz tuberosa rodeada de raicillas secundarias (Ballvé *et al.*, 2004). Toda la planta es empleada por la población, atribuyéndole propiedades antirreumáticas, antipiréticas, antiofídicas, antileucorreicas, diuréticas, purgativas, tónicas y diaforéticas (Ballvé *et al.*, 2004; Welter, 2012). Se menciona también que en Uruguay los indígenas creían que el vegetal era útil para contrarrestar los efectos de otras especies venenosas, de ahí su nombre vernáculo, “contrayerba” (Barreiro, 1984). También se menciona su uso para paliar las posibles consecuencias de picaduras de insectos y se le atribuye propiedades eméticas a la corteza de la planta (Martínez, 1978). Ha sido utilizada por los aborígenes para neutralizar los efectos producidos por venenos de víbora, para lavar heridas contaminadas, también como sudorífico, diurético y estimulante digestivo, contra afecciones eruptivas, dispepsias y enfermedades de las vías urinarias.

En cuanto a su composición química se encuentra escasa información, González *et al.* (2019) en estudios de caracterización morfoanatómica de la planta, al igual que Hoehne (1939) reportaron la presencia de furanocumarinas, (psolareno y bergapteno) esteroides (sistosterol y estigmasterol), 3-O- β -glucosilsistoterol y sucrosa (Kuster *et al.*, 1994). Atawodi (2005) describe la presencia de las Umbelíferonas en especies del mismo género. Estudios realizados con fitoconstituyentes (Ácido dorsténico A y B) han demostrado actividad citotóxica moderada en líneas celulares leucémicas (L-1210 y HL-60) (Uchiyama *et al.*, 2002). Otra investigación realizada con el extracto

de la misma especie evidenció que este ante la presencia de rayos UVA presenta actividades genotóxicas en el organismo modelo la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), el estudio también evidenció actividad melanogénica (Quevedo & Pires, 2011). También Patiño Cabral *et al.* (2019) describen que la exposición del extracto etanólico de rizomas de *D. brasiliensis* a células meristemáticas de *A. cepa* evidencia actividades citotóxicas en las mismas, sin registrarse daños genotóxicos. A pesar de la escasa información acerca de las actividades biológicas de *D. brasiliensis*, es importante destacar que no existe suficiente información referente a las actividades antimutagénicas y antioxidantes de los rizomas de la especie. La posible presencia de estos fitoconstituyentes en los rizomas de la especie nos permite plantear la idea de que el extracto etanólico de los rizomas podría poseer una alta capacidad de presentar actividades antioxidantes y consecuentemente ejercer efectos anti-mutagénicos. Es por esto que se propuso como objetivo principal de esta investigación determinar la antimutagenicidad y la actividad antioxidante del extracto etanólico de los rizomas de *D. brasiliensis* a diferentes concentraciones, empleando para ello la técnica SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) en *Drosophila melanogaster* y la técnica *in vitro* de captura de radicales libres.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal estudiado

Dorstenia brasiliensis Lam.; Departamento Central, San Lorenzo, Barrio Bella Vista, Calle Hermegildo Fernández; 25°22'40.91" – 57°30'55.25", 13-IV-2018; de Oliveira 01. Herbario FACEN.

Preparación del extracto etanólico de rizomas de *D. brasiliensis*

Los rizomas fueron secados a temperatura ambiente y colocados en un lugar cerrado con el fin de evitar la degradación de los compuestos presentes a causa de la abundante oxigenación y radiación solar (Hostettmann *et al.*, 2008). Luego se realizó la molienda con ayuda de un triturador manual, el pulverizado obtenido fue tamizado en una malla de 0,05 mm de modo a homogeneizarlo (Martínez *et al.*, 2012).

Se pesaron 217,66 g del triturado y se mezcló con el solvente (Etanol 98°) en una proporción de 3:50. La solución se dejó reposar durante 20 días con agitación diaria, transcurrido este periodo, la solución se filtró de modo a separar residuos del sobrenadante (Singh *et al.*, 2011). El filtrado fue sometido a calentamiento en un rotavapor a temperatura constante de 80° C con el fin de evaporar el solvente y obtener el extracto crudo. El extracto crudo pesó 12,67 g con un rendimiento de 5,83 % del mismo.

Ensayo *in vitro* de captura de radicales libres •DPPH

Del extracto crudo se pesó 0,1 g y se disolvió en 100 mL de Etanol seco 100° obteniéndose una solución stock de 1000 µg.mL⁻¹, de esta solución stock se obtuvieron cantidades de 400, 600, 800 y 1000 µg en un volumen de 2 mL respectivamente en tubos de ensayos independientes. A estas fueron añadidas 5 mL de solución del radical libre •DPPH, 3,9 mg⁰% en cada tubo de ensayo (el •DPPH es un radical libre estable, presenta un color púrpura, al recibir un electrón o protón de una sustancia antioxidante la tonalidad se torna amarillo).

Se procedió a mezclar las soluciones de manera homogénea con ayuda de un equipo vórtex durante 1 min., se dejó reposar en ausencia de luz a temperatura ambiente por 15 min. Los ensayos fueron realizados por triplicado, los valores medios obtenidos sirvieron para representar los puntos en la curva de calibración.

Transcurrido los 15 min. se procedió a realizar las lecturas de absorbancia de los ensayos a 517 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro QUIMIS® (Kuskoski *et al.*, 2005).

Ensayo *in vivo* de mutación somática y de recombinación en *Drosophila melanogaster*

Se realizó el cruce estándar entre hembras vírgenes de la cepa *flr³/In (3LR) TM3, ri p^p sep I (3)89Aa bx^{34e} & Bd^S* con machos de la cepa *mwh/mwh* en una proporción sexual 2:1 respectivamente, en medio de cultivo ovopositor a temperatura ambiente de 25° C (Graf *et al.*, 1984).

Transcurridas el tiempo entre 48 y 72 horas se extrajeron larvas de segundo y tercer estadio, las cuales fueron sometidas a tratamientos según lo expuesto a continuación en una cantidad de 100 larvas por tratamiento.

Pretratamiento de larvas con extracto

Las larvas de segundo estadio fueron expuestas durante 24 horas en medios instantáneos de puré de papa rehidratados con 5 mL de cada concentración del extracto (0,1, 1 y 10 mg.mL⁻¹). Transcurrido dicho periodo, las larvas pretratadas fueron transferidas a medios instantáneos de puré de papa rehidratados con 5 mL de Uretano 1 mg.mL⁻¹, como control se utilizó agua destilada y como agente mutágeno Uretano

1 mg.mL⁻¹. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Cotratamiento de larvas con extracto y agente mutágeno

Las larvas de tercer estadio fueron expuestas durante 72 horas en medios instantáneos de puré de papa rehidratados con 2,5 mL de cada concentración (0,1; 1 y 10 mg.mL⁻¹) junto con 2,5 mL de Uretano 1 mg.mL⁻¹, como control se empleó agua destilada y como agente mutágeno para inducción de mutaciones Uretano a una concentración de 1 mg.mL⁻¹. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Postratamiento de larvas con extracto

Las larvas de tercer estadio fueron sometidas a tratamiento agudo durante 6 horas con el agente mutágeno (5 mL, Uretano 1 mg.mL⁻¹). Transcurridas las 6 horas de tratamiento, las larvas fueron transferidas a otro medio rehidratadas con las diferentes concentraciones del extracto (0,1, 1 y 10 mg.mL⁻¹) por 46 horas hasta la eclosión de las mismas. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Una vez eclosionados los adultos, se seleccionaron al azar 20 individuos transheterocigotas *mwh+/+flr³* de cada uno de los tratamientos realizados, de los cuales se extrajeron las alas y fueron montadas en láminas en solución de Faüre (Goma arábica 300 g, Glicerol 20 mL, Hidrato de Cloral 50 g, y Agua destilada 50 mL). Las observaciones de las alas se realizaron a un aumento de 400X en microscopio óptico compuesto. Se observaron solo las

regiones A, B, C', C, D, D' y E, incluyendo los márgenes de separación según lo sugerido por Rodrigues de Andrade *et al.* (2004).

Análisis de datos obtenidos

Los datos obtenidos en la evaluación de la actividad antioxidante: se determinó el porcentaje de inhibición (I%) mediante la siguiente fórmula, se obtuvo la concentración inhibitoria, 50 (EC₅₀) mediante la función de regresión lineal.

$$I\% = \frac{(AC - AM - AB)}{AC} \times 100$$

Donde:

AM es la absorbancia de la muestra + ●DPPH

AB es la absorbancia del blanco (muestra + Etanol)

AC es la absorbancia del blanco del reactivo (●DPPH + Etanol)

En cuanto a los resultados obtenidos en el ensayo realizado con individuos de *D. melanogaster*, fueron comparados según el estadístico propuesto por Frei y Würzler (1988), que corresponde a un modelo estadístico Binomial Condicional (Test de Kastenbaum-Bowman), con niveles de significancia $\alpha=\beta=0,05$ (Kastenbaum & Bowman, 1970). Se determinó el porcentaje de inhibición ejercida por el extracto etanólico frente a la acción del agente mutágeno, empleando la siguiente ecuación:

$$I = \left\{ \frac{TM \text{ agente mutágeno} - (TM \text{ extracto} + \text{agente mutágeno})}{TM \text{ agente mutágeno}} \right\} \times 100$$

Donde:

I: Porcentaje de inhibición

TM: Total de mutaciones

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo *in vitro* de captura de radicales libres •DPPH

Los ensayos para la determinación de la actividad antioxidante demostraron según la ecuación de regresión lineal calculada para la curva patrón de referencia de ácido ascórbico (AA) graficada teniendo en cuenta los porcentajes de inhibición (I%) de cada cantidad del ácido ascórbico empleado en μg (Figura 1), valores de $I\% = 2,66[\text{AA}] - 8,83$ y un valor de coeficiente de correlación lineal (r) igual a 0,999, lo cual indica una alta correlación positiva de los datos obtenidos en contraste con la curva obtenida, siendo que el valor de la IC_{50} determinada para el mismo fue de $22,1 \pm 0,03 \mu\text{g}$, lo cual indica que a dicha cantidad se registra un 50% de inhibición del radical libre empleado. En cuanto al extracto crudo de los rizomas de *D. brasiliensis* (EC), se registró según la ecuación de regresión lineal determinada mediante los porcentajes de inhibición, valores de $I\% = 0,0355[\text{EC}] - 1,8906$ con un valor de correlación lineal (r) de 0,997.

En cuanto a la IC_{50} del extracto fue de $1355,19 \pm 0,5 \mu\text{g}$, lo cual comparado con la IC_{50} del ácido ascórbico fue mucho mayor, demostrando de esta manera que el poder antioxidante del extracto fue unas 61 veces menor en comparación al patrón de referencia (Figura 1).

A pesar de evidenciarse actividad antioxidante moderada a baja con el extracto de *D. brasiliensis*; mucho menor (61 veces) en comparación con el patrón de referencia (ácido ascórbico), las IC_{50} se ajustan con las que fueron descritas por Omisore *et al.* (2005), quienes trabajaron con muestras de compuestos provenientes de *Dorstenia barteri* y *Dorstenia convexa*, a las concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6,

0.8, 1, 5, 10, 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y hallaron también actividades antioxidantes. También Dufall *et al.* (2003) describe buena acción antioxidante de la especie *Dorstenia mannii* en hojas y ramas (Rodríguez *et al.*, 2004). Atawodi (2005) y Doroteo *et al.* (2013) describen la buena acción antioxidante de especies emparentadas como *Dorstenia psilurus* y *Dorstenia ciliata*. Es importante destacar que este es el primer registro científico de la actividad antioxidante de los rizomas de la especie *D. brasiliensis*, lo cual se ajusta a lo descrito en otros estudios con especies taxonómicamente emparentadas. Esta actividad antioxidante evidenciada en este estudio, podría deberse a la presencia de un grupo de moléculas denominadas Umbeliferonas, las cuales son capaces de absorber fuertes radiaciones UV, así como unirse a especies reactivas como los radicales libres (Omisore *et al.*, 2005).

Ensayo *in vivo* de mutación somática y de recombinación (SMART)

Los datos obtenidos en el ensayo realizado a las larvas evidenció en el pretratamiento realizado con la concentración de $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ solo 16 (1,60) clones mutantes del tipo MSP y ningún otro tipo de clon mutante, siendo este significativamente mayor ($P < 0,05$) en comparación al control (agua destilada). El pretratamiento con la concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ registró un aumento significativo ($P < 0,05$) en la cantidad de clones del tipo MSP siendo este de 20 (2,00) y 1 (0,10) clon del tipo MSG el cual no evidenció ninguna diferencia ($P > 0,05$) en comparación al tratamiento control. En el pretratamiento con $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ del extracto se encontró un valor significativamente mayor ($P < 0,05$) de clones del tipo MSP siendo este de

de Oliveira, R. et al. Actividad antioxidante y antimutagénica del extracto etanólico de rizomas de *Dorstenia brasiliensis* en *Drosophila melanogaster*

17(1,70), 1(0,10) clones del tipo MSG y 4(0,40) clones del tipo MG los cuales no evidenciaron diferencias ($P>0,05$). El tratamiento con el agente mutágeno Ureano 1 mg.mL⁻¹ demostró un total de 43(4,30) clones del tipo MSP y 2(0,20) clones MSG, a su vez el tratamiento realizado con el agua destilada (control) registró solo 3 clones MSP. Es importante destacar que en los tratamientos realizados con el extracto se evidenció una disminución en las frecuencias de aparición de mutaciones en los individuos siendo estos del 64%, 53% y 51% respectivamente (Tabla 1, Figura 2).

En el grupo de individuos de *D. melanogaster* a los cuales se les realizó un cotratamiento entre el agente mutágeno y el extracto, evidenció con el extracto a 0,1 mg.mL⁻¹ 8(0,80) clones MSP y 3(0,30) clones MSG y 1(0,10) clones del tipo MG, sin registrar diferencias ($P>0,05$) en comparación al control. En el cotratamiento con el 1 mg.mL⁻¹ del extracto se registró un aumento significativo ($P<0,05$) de clones mutantes del tipo MSP siendo este de 10(1,00) y 1(0,10) clones del tipo MSG sin diferencias ($P>0,05$). En el cotratamiento realizado con la concentración de 10 mg.mL⁻¹ del extracto se observaron solo 3(0,30) clones MSP y 1(0,10) clones MSG, los cuales no resultaron ser diferentes ($P>0,05$) en comparación a las registradas en el tratamiento control. En el caso del tratamiento con el mutágeno (Ureano 1mg .mL⁻¹) se encontraron 16(1,60) clones MSP y 4(0,40) clones MSG, el tratamiento con el agua destilada (control) se observó solo 3(0,30) clones del tipo MSP. Los tratamientos con el extracto a las concentraciones mencionadas demostraron 40%, 45% y 80% de disminución en la aparición de mutaciones respectivamente (Tabla 1,

Figura 2).

El grupo de individuos que recibieron un postratamiento con el extracto evidenciaron con el extracto a la concentración de 0,1 mg.mL⁻¹ solo 5(0,50) clones mutantes del tipo MSP y 1(0,10) clones del tipo MG, sin diferencias significativas ($P>0,05$) en comparación a las registradas en el control. El postratamiento con la concentración de 1 mg.mL⁻¹ se registró un aumento significativo ($P<0,05$) de 24(2,40) clones MSP y 1(0,10) clones MG, sin ser este último diferente ($P>0,05$) a las encontradas en el control. De igual manera en el caso del postratamiento con el extracto a 10 mg.mL⁻¹ se observó un aumento significativo ($P<0,05$) de 12(1,20) clones MSP, 1(0,10) clones del tipo MSG y 1(0,10) clones MG, los cuales no registraron diferencias ($P>0,05$) en comparación al control. A su vez, el tratamiento realizado con el agente mutágeno evidenció 65(6,50) clones MSP, 8(0,80) clones MSG y 6(0,60) clones mutantes del tipo MG; en el tratamiento realizado con el agua destilada (control) se encontró solo 3(0,30) clones del tipo MSP. La reducción de mutaciones en los postratamientos realizado con el extracto a las concentraciones descritas fue de 92%, 68% y 82% (Tabla 1, Figura 2).

Es importante destacar que los diferentes tipos de marcadores mutantes observados son consecuencia de la pérdida de heterosis, en el caso de los clones mutantes del tipo MSP (manchas simples pequeñas) se originan a consecuencia de eventos mutagénicos como deleciones, mutaciones puntuales, o no disyunciones; el siguiente tipo de clon mutante MSG (manchas simples grandes) son originados por eventos mutagénicos igual a la anterior, como no disyunciones, mutaciones puntuales y deleciones; los clones del tipo MG (manchas

gemelas) es un indicador de eventos de recombinaciones mitóticas los cuales son muy casuales de observar, este último tipo de mutaciones poseen una gran importancia ya que según estudios señalan que la activación de protooncogenes o la supresión de genes tumorales se originan por este proceso dando como resultado final la proliferación de células tumorales cancerígenas (Young *et al.*, 2006; Imreh *et al.*, 2003; Rodrigo, 2007; Jiménez *et al.*, 2013) (Figura 2).

La reducción de mutaciones observadas en los diferentes grupos de tratamientos realizados (pretratamiento, cotratamiento y postratamiento) con el extracto de *D. brasiliensis* fueron altos con valores en un rango de 40-92%, siendo estos inclusive mayor a los porcentajes de disminución de mutaciones encontrados en otros estudios con extractos vegetales de *S. rebaudiana* (50-58%), *S. hispanica* (13-36%) y *B. forficata* (57-79%), demostrando de esta manera la eficacia del extracto de *D. brasiliensis* como posible antimutágeno o antígenotoxina, pudiendo los metabolitos secundarios presentes en el extracto actuar interfiriendo la acción del agente mutágeno directamente o reduciendo los daños genéticos ocasionados por el mismo (Gayozo *et al.*, 2016a; Gayozo *et al.*, 2016b, Marín Insfrán *et al.*, 2019). El grupo experimental con mayor porcentaje de reducción fue en el postratamiento realizado con el extracto con valores de 68-92%, por lo que el extracto presenta una mayor acción de detención de las lesiones genéticas fijadas o inducidas por el Uretano (Jiménez, 2013; Marín Insfrán *et al.*, 2019). Esta actividad antimutagénica podría deberse, al igual que en el caso de la actividad antioxidante, a la presencia del metabolito secundario Umbeliferonas en los rizomas de esta especie,

ya que esta molécula es capaz de actuar como antioxidante y por ende unirse a moléculas disminuyendo las actividades mutagénicas o citotóxica de las mismas (Atawodi, 2005).

Estos resultados también representan el primer registro científico de la actividad antimutagénica del extracto de los rizomas de esta especie, otros estudios mencionan que la *D. brasiliensis* presenta en su composición furanocumarinas o psolarenos, estas sustancias son muy empleadas como fotosensibilizadores, en el tratamiento de vitiligo, demostrándose la actividad melanogénica de esta especie (García, 2007). A pesar de esto, también se describió en otro estudio una muy pequeña actividad genotóxica del vegetal, empleando la misma técnica utilizada en esta investigación (test SMART) (García, 2007). Otra investigación realizada utilizando bacterias en el test de AMES, demostraron bajo efecto genotóxico, del metabolito dorstenina, el cual un análogo del psoraleno recientemente aislado de rizomas de *D. bahiensis* (Lopes *et al.*, 2001).

CONCLUSIONES

Los resultados indican que el extracto etanólico de *D. brasiliensis* posee baja actividad antioxidante, unas 61 veces menor con relación al antioxidante de referencia (ácido ascórbico), sin embargo, los estudios en *D. melanogaster*, demuestran una eficaz actividad antimutagénica; se apreció inhibición del 40-92% de las mutaciones inducidas por el Uretano, agente conocido por su potencial mutagénico. El postratamiento reveló resultados superiores con relación a los demás, a pesar de que el pretratamiento y cotratamiento también hayan presentado resultados alentadores. Se recomienda continuar con la investigación rea-

de Oliveira, R. et al. Actividad antioxidante y antimutagénica del extracto etanólico de rizomas de Dorstenia brasiliensis en Drosophila melanogaster

lizando la separación de los metabolitos secundarios presentes en los rizomas según sus afinidades químicas empleando para ello solventes polares y apolares, también se recomienda emplear otros modelos animales como *Mus musculus* y *Danio rerio* en los ensayos *in vivo* para conocer el efecto del extracto sobre diferentes organismos animales.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, a la Prof. Lic. Elodia Concepción Torres, responsable del laboratorio y a los demás miembros del equipo de investigación, Univ. Lucía Dávalos, Leticia Gómez, Andrea Ucedo, Lic. Rossana Ocampos, Lic. José Oliver y a la familia Domínguez por permitir la colecta del material vegetal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atawodi, S. E. (2005). Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4(2), 128-133.
- Ayuso, D. M.; Tejedor, L. M.; Serrano, A. G. (2018). Enfermería Familiar y Comunitaria: Actividad Asistencial y Aspectos Ético-Jurídicos. Díaz de Santos, Segunda edición, 530 pp.
- Ballvé, A.; Saraiva, N.; Auler, L. A. & Frabes, K. (2004). Plantas Medicinaias de uso popular, atlas farmacognóstico. Editorial ULBRA. Brasil. 205 pp.
- Barreiro, P. (1984). El Cerro de Montevideo. Montevideo: Intendencia Municipal de Montevideo.
- Berdonces, J. L. (2019). Enciclopedia de Fitoterapia y Plantas Medicinales. Integral, 239 pp.
- Buitrago Gallego-Nicasio, V. M. M. (2018). Preparación y catas de aguas, cafés e infusiones. H0TR0209. Editorial IC. M06.
- Doroteo, V. H.; Díaz, C.; Terry, C. & Rojas, R. (2013). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 79(1): 13-20.
- Dufall, K. G.; Ngadjui, B. T.; Simeon, K. F.; Abegaz, B. M. & Croft, K. D. (2003). Antioxidant activity of prenylated flavonoids from the West African medicinal plant *Dorstenia mannii*. *Journal of ethnopharmacology* 87(1), 67-72.
- Durán, D. H.; Tzintzun, O. C.; Juárez, O. G.; González, D. M.; Ceceña, C. D.; Cervantes L. D.; Michel, C. Y. L. & Ruíz, C. A. (2019). Compendio Científico en Ciencias Agrícolas y Biotecnología. Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California. Ciudad de México. 2: 68.
- Frei, H. & Würzler, 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.
- García, C. (2007). Estudio fitoquímico e atividade biológica de *Pavonia distinguenda* A.ST.- HILL. et naudin e *Dorstenia brasiliensis* Lam. Manancial. Santa Maria: Repositorio digital da UFSM.
- Gayozo, E.; Rivarola, C.; Marín Insfrán, L. & Filizzola, N. (2016)a. Actividad antimutagénica de *Salvia hispanica* sobre mutaciones y recombinaciones somáticas en *Drosophila melanogaster*. *Steviana* 8(1):50-58.

- Gayozo, E.; Rivarola, C.; Núñez, C.; Marín Insfrán, L. (2016)b. Efecto antimutagénico del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre mutaciones y recombinaciones inducidas en *Drosophila melanogaster*. *Steviana* 8(2):92-101.
- González M. G. G.; González Y. P. V. & Degén, R. L. A. (2019). *Dorstenia brasiliensis* Lam. (Moraceae): caracterización morfoanatómica de una especie polimórfica, empleada con fines medicinales en Paraguay, *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research* 7 (2): 116-125.
- Graf, U.; Würzler, 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. doi: 10.1002/em.2860060206.
- Hoehne, F.C. (1939) Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. Departamento de Botânica do Estado, São Paulo.
- Hostettmann, K.; Gupta, M. P.; Marston, A. & Ferreira Quiroz. E. (2008). Manual de estrategias para aislamiento de productos naturales bioactivos. Secretaría Ejecutiva de la Organización del Convenio Andrés Bello. Colombia, 234 pp.
- Imreh, S.; Klein, G. & Zabarovsky, E. R. (2003). Search for unknown tumor antagonizing genes. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 38(4): 307-321.
- 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).
- 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.
- Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M.; Mancini-Filho, J. & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology* 25(4): 726-732.
- Kuster, R.; Robson, B.; Da Silva, A; Parente, J. & Mors, W. (1994). Furocoumarins from the rhizomes of *Dorstenia brasiliensis*. *Phytochemistry* 36(1): 221-223.
- Lopes, D.; Rodrigues, R.; Coelho, K.; Santos, C. & Leitao, C. (2001). Photosensitization and Mutation Induced in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Strains by Dorstenin, a Psoralen Analog Isolated from *Dorstenia bahiensis*. *Planta Med.* 67(9): 820-824.
- Marín Insfrán, L.; Gayozo, E. & Zamorano-Ponce, E. (2019). Efecto antimutagénico del extracto etanólico de *Bauhinia forficata* Link (Pata de buey) en *Drosophila melanogaster* mediante el Test de Mutación y Recombinación Somática. *Steviana* 11(1):15-25.
- Martínez, D. (1978). Semanario farmacéutico. Revista científica, profesional y económica de la respectiva facultad. Madrid; Oficina Tipográfica del Hospicio, p.75.
- Martínez, M.; Mancuello, M.; Brítez F.; Pereira, C.; Arrúa, J.; Franco, G.; Conteiro, M.; Iañez, V.; González, F.; Benítez, B.; López, T.; Pérez, S. & Ferreira, F. (2012). Caracterización química y actividades biológicas de Lapachol ais-

de Oliveira, R. et al. Actividad antioxidante y antimutagénica del extracto etanólico de rizomas de *Dorstenia brasiliensis* en *Drosophila melanogaster*

- lado de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos. *Steviana* 4: 47–64.
- Omisore, N. O. A.; Adewunmi, C. O.; Iwalewa, E. O.; Ngadjui, B. T.; Adenowo, T. K.; Abegaz, B. M.; Ojewole, J. A. & Watchueng, J. (2005). Antitrichomonal and antioxidant activities of *Dorstenia barteri* and *Dorstenia convexa*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(7):1087-1094.
- Patiño Cabral, L. M.; Domínguez, S.; Martínez, P.; Gayozo Melgarejo, E.; De Oliveira, R.; Torres, E.; Ocampos Jara, R. M. & Marín Insfrán, L. (2019). Evaluación mutagénica del extracto etanólico de rizomas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. en células meristemáticas de *Allium cepa* L. *Journal of Basic & Applied Genetics* (30) Suppl. 1: 330.
- Quevedo, A. & Pires, E. (2011). Atividades melanogénica, genotóxica e anti-proliferativa de extratos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e *Dorstenia brasiliensis* Lam induzidas por radiação UVA. Mato Grosso do Sul: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
- Rodrigo, G. (2007). Actividad genotóxica de *Opuntia soehrensii*, evaluada por el test de mutación y recombinación somática en *D. melanogaster*. *Biofarbo*, 15: 61-66.
- Rodrigues De Andrade, H.H.; Reguly, M. L. & Lehmann, M. (2004). Wing somatic mutation and recombination test. En *Drosophila Cytogenetics Protocols*, Ed. D. S. Henderson, 389-412. Humana Press. Totowa. New Jersey.
- Roosevelt, L. C. P.; Roosevelt, C. V. & Valdés O. F. F. (2016). Ozonoterapia. Libros en Red. Santa Fe, 38-39 pp.
- Singh, K.P.; Dwevedi, A.K. & G. Dhakre. (2011). Evaluation of antibacterial activities of *Chenopodium album* L. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 2(3): 398–401.
- Uchiyama, T., Hara, S.; Makino, M. & Fujimoto, Y. (2002). Seco-Adianane Type Triterpenoides from *Dorstenia brasiliensis* (Moraceae). *Elsevier*. 60(8): 761-764.
- Welter, S. (2012). Levantamento de plantas medicinais utilizadas como anti-oftílicas nas reducoes jesuítico-guaraní (Provincia Jesuítica do Paraguai, séculos XVII e XVIII). Rio Grande do Sul: UFRGS.
- Young, B. D.; Debernardi, S.; Lillington, D. M.; Skoulakis, S.; Chaplin, T.; Foot, N. J. & Raghavan, M. (2006). A role for mitotic recombination in leukemogenesis. *Advances in enzyme regulation* 46(1): 90-97.

ANEXOS

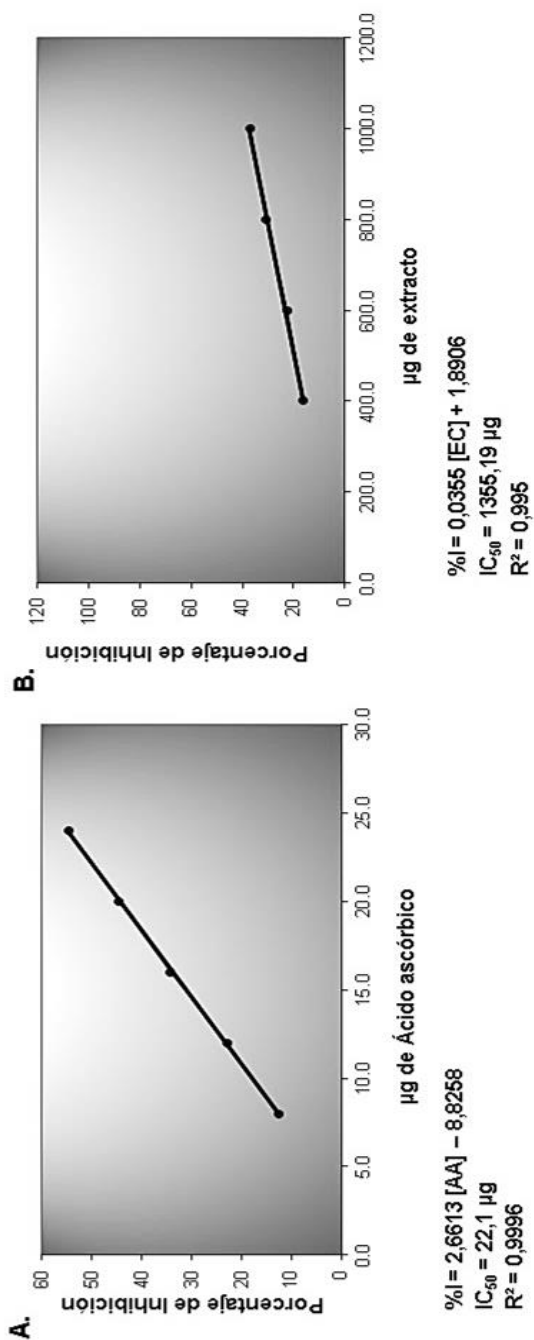


Figura 1. Curva de calibración de las actividades antioxidantes. **A.** Patrón de referencia, Ácido Ascórbico. **B.** Extracto crudo de *D. brasiliensis*.

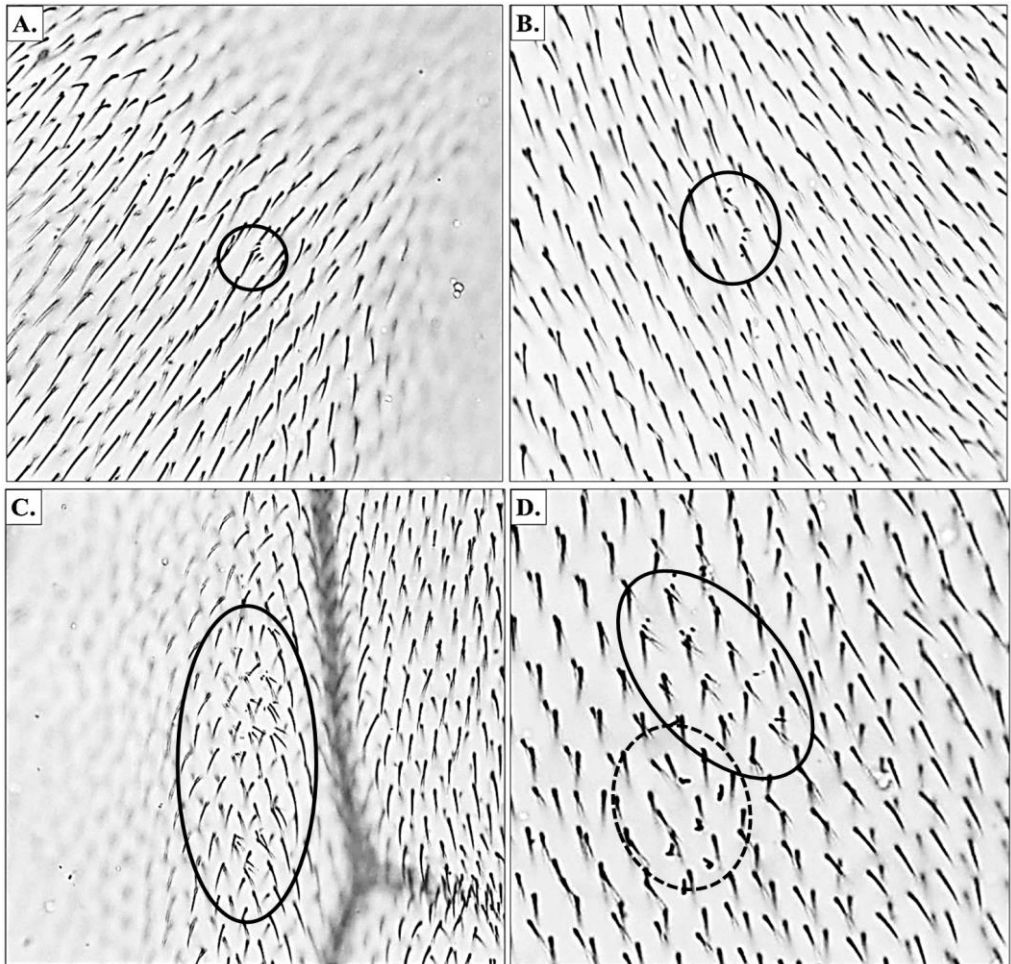


Figura 2. Clones mutantes encontrados en las alas de *D. melanogaster*. **A.** Mancha Simple Pequeña (MSP) tipo *mwh* (circulo) en tratamiento con Uretano 1 mg.mL⁻¹ y 0,1 mg.mL⁻¹ del extracto etanólico de *D. brasiliensis*. **B.** Mancha Simple Pequeña (MSP) tipo *mwh* (circulo) en tratamiento con Uretano 1 mg.mL⁻¹ y 10 mg.mL⁻¹ del extracto. **C.** Mancha Simple Grande (MSG) tipo *mwh* (elipse) en tratamiento con Uretano 1 mg.mL⁻¹ y 1 mg.mL⁻¹ del extracto. **D.** Mancha Gemela (MG) tipo *mwh* (elipse sólida) y *flr*³ (elipse punteada) en tratamiento con Uretano 1 mg.mL⁻¹ y 0,1 mg.mL⁻¹ del extracto.

Tabla 1. Análisis estadístico del potencial antimutagénico del extracto etanólico de la *D. brasiliensis*.

Tratamientos	Número de alas	MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5	MG m = 5	TM m = 2	Inhibición (%)
Pretratamiento						
Agua destilada	20	0,30 (03)	0,00 (00)	0,00 (00)	0,30 (03)	-
Uretano 1 mg.mL ⁻¹	20	4,30 (43)	+ 0,20 (02)	i 0,00 (00)	i 4,50 (45)	+ -
0,1 mg.mL ⁻¹ extracto + Uretano 1 mg.mL ⁻¹	20	1,60 (16)	+ 0,00 (00)	i 0,00 (00)	i 1,60 (16)	+ 64
1 mg.mL ⁻¹ extracto + Uretano 1 mg.mL ⁻¹	20	2,00 (20)	+ 0,10 (01)	i 0,00 (00)	i 2,10 (21)	+ 53
10 mg.mL ⁻¹ extracto + Uretano 1 mg.mL ⁻¹	20	1,70 (17)	+ 0,10 (01)	i 0,40 (04)	i 2,20 (22)	+ 51
Cotratamiento						
Agua destilada	20	0,30 (03)	0,00 (00)	0,00 (00)	0,30 (03)	-
Uretano 1 mg.mL ⁻¹	20	1,60 (16)	+ 0,40 (04)	i 0,00 (00)	i 2,00 (20)	+ -
Uretano 1 mg.mL ⁻¹ + 0,1 mg.mL ⁻¹ extracto	20	0,80 (08)	i 0,30 (03)	i 0,10 (01)	i 1,20 (12)	+ 40
Uretano 1 mg.mL ⁻¹ + 1 mg.mL ⁻¹ extracto	20	1,00 (10)	+ 0,10 (01)	i 0,00 (00)	i 1,10 (11)	+ 45
Uretano 1 mg.mL ⁻¹ + 10 mg.mL ⁻¹ extracto	20	0,30 (03)	i 0,10 (01)	i 0,00 (00)	i 0,40 (04)	i 80
Posttratamiento						
Agua destilada	20	0,30 (03)	0,00 (00)	0,00 (00)	0,30 (03)	-
Uretano 1 mg.mL ⁻¹	20	6,50 (65)	+ 0,80 (08)	+ 0,60 (06)	+ 7,90 (79)	+ -
Uretano 1 mg.mL ⁻¹ + 0,1 mg.mL ⁻¹ extracto	20	0,50 (05)	i 0,00 (00)	i 0,10 (01)	i 0,60 (06)	i 92
Uretano 1 mg.mL ⁻¹ + 1 mg.mL ⁻¹ extracto	20	2,40 (24)	+ 0,00 (00)	i 0,10 (01)	i 2,50 (25)	+ 68
Uretano 1 mg.mL ⁻¹ + 10 mg.mL ⁻¹ extracto	20	1,20 (12)	+ 0,10 (01)	i 0,10 (01)	i 1,40 (14)	+ 82

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 $\alpha = \beta = 0,05$ ^bIncluso las manchas simples f_{r^2} raras.