

Evaluación de la actividad mutagénica del extracto acuoso de *Baccharis trimera* (Less) (Jaguarete ka`a) en *Drosophila melanogaster* mediante el test SMART

Escobar Ibarrola, L.^{1*}, Torres, E.², Gayozo, E.², Marín Insfrán, L.²

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas, Carrera de Bioquímica, 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.

*E-mail del autor: leslicale94@gmail.com

Evaluación de la actividad mutagénica del extracto acuoso de *Baccharis trimera* (Less) (Jaguarete ka`a) en *Drosophila melanogaster* mediante el test SMART. *Baccharis trimera* es una hierba medicinal perteneciente a la familia Asteraceae con alto contenido de flavonoides, a las que se les atribuye sus capacidades antiinflamatorias y antioxidantes principalmente. Por otra parte, se ha visto que algunas especies de *Baccharis* son potencialmente genotóxicas, y esto podría deberse a ciertos metabolitos con capacidad pro-oxidantes presentes en la planta. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad genotóxica a diferentes concentraciones del extracto acuoso de la parte aérea de *B. trimera* empleando como organismo modelo *Drosophila melanogaster*, para ello, se determinó primeramente la dosis letal 50 (DL₅₀) del extracto realizando tratamientos a individuos de la cepa silvestre Samarkand, siendo esta la concentración de 35,91 mg.mL⁻¹ ($P < 0,05$; r: 0,694). Posteriormente se seleccionaron las concentraciones de 30, 15, 7,5, 3,75 y 1,87 mg.mL⁻¹ para realizar tratamientos crónicos (72 horas) a individuos trans-heterocigotas *mwh+/+flr³*, empleando como control agua destilada y como agente mutágeno Uretano 0,178 mg.mL⁻¹. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el test estadístico de Kastenbaum-Bowman $\alpha = \beta = 0,05$ (binomial condicional), estos resultados evidenciaron que las concentraciones de 1,87 y 7,5 mg.mL⁻¹ presentaron un aumento significativo en la frecuencia de aparición de clones mutantes MSG (manchas simples grandes) y en el número total de clones, lo cual sugiere que el extracto de *B. trimera* a estas concentraciones presentan una actividad potencialmente genotóxica en *D. melanogaster*.

Palabras clave: *Baccharis*, *Drosophila melanogaster*, mutaciones, jaguarete ka`a

Mutagenic activity evaluation of *Baccharis trimera* (Less) (Jaguarete ka`a) aqueous extract in *Drosophila melanogaster* using the SMART test. *Baccharis trimera* is a medicinal herb belonging to Asteraceae family with a high content of flavonoids, to which anti-inflammatory and antioxidant capacities are mainly attributed. On the other hand, it has been seen that some species of *Baccharis* are potentially genotoxic, and this could be due to certain metabolites with pro-oxidant capacity present in the plant. The objective of this study was to evaluate the genotoxic activity at different concentrations of aqueous extract from aerial part of *B. trimera* using *Drosophila melanogaster* as model organism, for this, the lethal dose 50 (LD₅₀) of the extract was first determined in individuals of wild type strain Samarkand, LD₅₀ concentration was 35.91 mg.mL⁻¹ ($P < 0.05$; r: 0.694). Subsequently, concentrations of 30, 15, 7.5, 3.75 and 1.87 mg.mL⁻¹ were selected to perform chronic treatments (72 hours) to trans-heterozygous individuals *mwh+/+flr³*, using distilled water as control and Urethane 0.178 mg.mL⁻¹ as mutagenic agent. Data obtained were analyzed using Kastenbaum-Bowman test $\alpha = \beta = 0.05$, these results showed that the concentrations of 1.87 and 7.5 mg.mL⁻¹ presented a significant increase in the frequency of appearance of LSS (large single spots) mutant clones and in the total number (TM) of clones, which

suggests that *B. trimera* extract at these concentrations has a potentially genotoxic activity in *D. melanogaster*.

Keywords: *Baccharis*, *Drosophila melanogaster*, mutations, jaguarete ka'a

INTRODUCCIÓN

B. trimera es una hierba nativa de la familia Asteraceae, conocida comúnmente como Jaguarete ka'a o carqueja, se distribuye ampliamente en la región oriental del país, como también en otros países de la región. Generalmente se ingiere la parte aérea de la planta como remedio caliente en infusiones o decocción para tratar afecciones digestivas por sus propiedades como diurético, tónico amargo, y también como preventivo de embarazo y abortivo (Soria & Ramos, 2015).

La composición fitoquímica de la planta consta de flavonoides, diterpenos, saponinas y aceite esencial, predominando el contenido de flavonoides a las que se les atribuye las propiedades farmacológicas de dicha hierba (De Andrade *et al.*, 2004; Reiter *et al.*, 2001). Existe evidencia de que algunas especies del género *Baccharis* presentan potencial genotóxico en estudios realizados en roedores; además en su composición de flavonoides se encuentran la apigenina y la quercetina, identificadas con actividad prooxidante según estudios *in vitro*, los cuales sugieren un potencial genotóxico de dichos flavonoides (Aguilar *et al.*, 2010; Pérez Trueba, 2003; Rodríguez *et al.*, 2009; Soicke & Leng-Peschlow, 1987).

El consumo de hierbas medicinales nativas en forma de té, mate o terere forma parte de la cultura paraguaya, con la finalidad de prevenir o tratar ciertas afecciones. En el país, la demanda de hierbas medicinales ha ido en aumento, y según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80% de la población mun-

dial utiliza la medicina tradicional herbolaria para la atención primaria de la salud (APS); por ello fue creado el programa de Medicina Tradicional de la OMS, donde instan a los países en general a la práctica de la medicina natural y tradicional, apoyando las investigaciones, de modo a que las hierbas medicinales formen parte de programas de APS (Chifa, 2010; Fogel *et al.*, 2016; Marinoff, *et al.*, 2009; Soria & Ramos, 2015).

El consumo de forma crónica o en grandes cantidades de hierbas puede producir intoxicaciones hasta el grado de letalidad; dicha situación se da principalmente por el desconocimiento debido a escasos estudios científicos que avalen sus propiedades curativas, que revelen su toxicidad o efectos colaterales (De Pardo Ghetti *et al.*, 2009; Enríquez *et al.*, 2018). Las sustancias comercializadas con fines terapéuticos deben atravesar rigurosos controles, para garantizar su seguridad; los estudios de genotoxicidad forman parte del perfil toxicológico a los que deben ser sometidos, a modo de evaluar el riesgo sobre el beneficio obtenido ante el consumo de hierbas utilizadas en la medicina tradicional (Carballo *et al.*, 2005; Dearfield, 1995).

La importancia del estudio de las hierbas utilizadas en medicina tradicional y su efecto sobre el material genético (ADN), es debido al contenido de sustancias potencialmente genotóxicas, entre las cuales se encuentra la *B. trimera* tradicionalmente utilizada. En este estudio, partiendo de los antecedentes mencionados, se propuso evaluar el potencial mutagénico del extracto de *B. trimera* empleando para ello

Escobar Ibarrola, L. et al. Actividad mutagénica del extracto acuoso de Baccharis trimera (Less) (Jaguarete ka`a) en Drosophila melanogaster mediante el test SMART

como organismo modelo la mosca de fruta (*D. melanogaster*) aplicando el ensayo de Mutación y Recombinación Somática (SMART).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material estudiado

Baccharis trimera (Less.): Paraguay. Vivero de plantas medicinales del Jardín Botánico y Zoológico de Asunción (JBZA), Depto. Central; 25°14'56"S - 57°34'23" W. Material de herbario medicinal testigo: G. González 319 (JBZA), referencia de colección viva: JBZA 113.

Preparación del extracto acuoso de la parte aérea de *B. trimera*

El proceso de secado de la hierba colectada fue de 15 días, en ausencia de corriente de aire a temperatura ambiente (25±2° C), evitando el contacto directo con el sol (Hostettmann *et al.*, 2008). Una vez seca se procedió a la molienda con la utilización de un molino manual, hasta la obtención de partículas pulverizadas uniformes.

Se preparó la infusión para la obtención del extracto acuoso liofilizado, agregando 50 gramos del triturado de *B. trimera*, en 500 mL de agua destilada en su punto de ebullición, el hervor de la mezcla se realizó durante cinco minutos y posteriormente la infusión fue filtrada con el uso de un equipo filtrador; por último, el producto fue congelado a -120°C en un ultracongelador, para el proceso de liofilización. Se obtuvo 2,44 gramos del extracto liofilizado, con un rendimiento del 4,88 % (p/p).

Determinación de la DL₅₀ en *Drosophila melanogaster*

Se evaluaron cinco concentraciones 60 mg.mL⁻¹, 30 mg.mL⁻¹, 15 mg.mL⁻¹, 7,5

mg.mL⁻¹ y 3,7 mg.mL⁻¹ y se utilizaron 100 larvas de tercer estadio de la cepa pura silvestre Samarkand por concentración; las mismas fueron depositadas en frascos de vidrio conteniendo el medio de cultivo elaborado con puré de papa instantáneo Knorr® rehidratado con 5 mL del extracto acuoso a las concentraciones de estudio. Las larvas fueron sometidas a exposición crónica por 72 horas de exposición, hasta la eclosión y conteo de imagos (Miyazawa *et al.*, 2003).

Bioensayo SMART para evaluación de actividad genotóxica

La obtención de las larvas de interés para el estudio se realizó mediante la cruce estándar de hembras vírgenes de la cepa *flr3/In (3LR)TM3, ri ppsep I(3)89Aa bx34e* y *BdS* con machos homocigotas de la cepa *mwh/mwh*, para la evaluación de la actividad de probables genotoxinas de acción directa que pudieran encontrarse en la muestra vegetal evaluada. La obtención de las hembras vírgenes se realizó en cultivo convencional (42 gramos de harina de maíz, 6 gramos agar-agar, 28 gramos de sacarosa, 25,6 gramos de levadura, 500 mL de agua destilada, 2 mL de ácido propiónico-ácido ortofosfórico (1:1) y 2 mL de solución de nipagín al 10%). La cruce se llevó a cabo en medio ovopositor (Graf *et al.*, 1984), en una proporción 2:1 (hembras: machos), obteniéndose larvas trans-heterocigotas *mwh+/+flr³* las cuales poseen los genes recesivos *mwh* y *flr³* (Graf *et al.*, 1984).

El ensayo se realizó empleando cinco concentraciones del extracto *B. trimera* (30, 15, 7,5, 3,7 y 1,9 mg.mL⁻¹), se extrajeron 700 larvas de tercer estadio obtenidas a las 72 horas luego de la puesta; se usaron 100 larvas para cada tratamiento con las concentraciones mencionadas, para

ello se empleó medio de puré de papa Knorr® rehidratado con 5 mL de cada concentración (Marín *et al.*, 2019). Como control del ensayo se realizaron en las mismas condiciones empleando agua destilada y como agente mutágeno Uretano 0,178 mg.mL⁻¹.

Posteriormente, se realizó la identificación de clones mutantes, diferenciando los fenotipos pilosos de las alas. Los clones del tipo mancha simple pequeña (MSP) *flr*³ o *mwh* presentan una o dos células alteradas con tricomas pilosos anormales, los clones del tipo mancha simple grande (MSG) *flr*³ o *mwh* presentan más de 2 células alteradas pudiendo alcanzar grandes regiones dentro de las alas y los clones del tipo mancha gemela (MG) *flr*³-*mwh* presentan regiones en donde ambos fenotipos mutantes se encuentran cercanas entre sí (Graf *et al.*, 1984; Romero Jiménez, 2013).

Análisis estadístico de datos

Los datos obtenidos en el ensayo de determinación de la DL₅₀ fueron analizados mediante test Probit, test de Chi-cuadrado y un análisis de regresión a modo de determinar la ecuación de la recta de los resultados obtenidos, todo esto para determinar la concentración letal 50 (Finney, 1952).

Los datos obtenidos en el ensayo SMART fueron analizadas mediante tablas estadísticas de acuerdo con Frei y Würigler (1988) que corresponde a un modelo estadístico Binomial Condicional (Test de Kastenbaum-Bowman) $\alpha=\beta=0,05$ (Frei & Würigler, 1988; Kastenbaum & Bowman, 1970). Los gráficos fueron realizados empleando el software GraphPad Prism 6.00, La Jolla California USA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el ensayo de determinación de la DL₅₀ con las concentraciones de 60 mg.mL⁻¹, 30 mg.mL⁻¹, 15 mg.mL⁻¹, 7,5 mg.mL⁻¹, 3,85 mg.mL⁻¹ y 1,87 mg.mL⁻¹ del extracto acuoso de *B. trimera* evidenciaron que la dosis sugerida por el análisis probit en la que se induce al 50% de mortandad del total de los individuos de *D. melanogaster* tratados, es de 35,91 mg.mL⁻¹ ($P<0,05$; R²: 0,481, r: 0,694), por lo que los ensayos posteriores fueron con concentraciones por debajo a esta – Fig. 1.

En cuanto al ensayo SMART, se pudo registrar la frecuencia de los diferentes tipos de clones mutantes encontrados en las alas de los individuos de *D. melanogaster* tratados con las diferentes concentraciones del extracto de *B. trimera*. Los individuos expuestos al extracto a la concentración de 1,87 mg.mL⁻¹, presentaron 6 MSP y 3 MSG con frecuencias de aparición de mutaciones de 0,15 y 0,30 respectivamente. Los individuos tratados con la concentración de 3,75 mg.mL⁻¹ del extracto evidenciaron 2 MSP y 2 MSG, ambas con frecuencias de 0,10 respectivamente. Así también los individuos expuestos al extracto a la concentración de 7,5 mg.mL⁻¹ registraron 2 MSP, 8 MSG y 1 MG, con frecuencias de aparición de mutaciones de 0,10, 0,50 y 0,005 respectivamente -Tabla 1, Fig. 2, Fig. 3.

Los individuos expuestos al extracto acuoso a la concentración de 15 mg.mL⁻¹ evidenciaron un total de 2 MSG, con una frecuencia de 0,10. Por último, en los individuos tratados con la concentración del extracto acuoso a 30 mg.mL⁻¹ se observó solamente la presencia de 1 MSP con una frecuencia de 0,05. En el caso del agente mutágeno Uretano 0,728 mg.mL⁻¹ se obtuvo una mayor cantidad de clones en un to-

Escobar Ibarrola, L. et al. Actividad mutagénica del extracto acuoso de *Baccharis trimera* (Less) (Jaguarete ka`a) en *Drosophila melanogaster* mediante el test SMART

tal de 20, donde se encontraron 16 MSP y 4 MSG, con frecuencias de 0,80 y 0,20 respectivamente. El tratamiento realizado con el agua destilada no evidenció la presencia de clones mutantes en las alas de los individuos tratados -Tabla 1, Fig. 2, Fig. 3.

También se pudo observar claramente que los individuos tratados con el extracto acuoso a las concentraciones de 1,87 mg.mL⁻¹ y 7,5 mg.mL⁻¹ presentaban un total de 9 y 11 clones mutantes respectivamente, los cuales aumentaron significativamente ($P < 0,05$) la frecuencia de aparición de mutaciones con respecto a las halladas en el tratamiento con el control (agua destilada), siendo positivo para los marcadores del tipo MSG en ambos casos; mientras que las concentraciones del extracto acuoso de 3,7 mg.mL⁻¹, 15 mg.mL⁻¹ y 30 mg.mL⁻¹ no presentaron un aumento significativo ($P < 0,05$) en el número total de clones mutantes en comparación con el tratamiento control.

Según los resultados obtenidos la frecuencia relativa de clones encontrados en las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *B. trimera* demostraron que a mayor concentración del extracto acuoso, menor es la cantidad de clones mutantes hallados en alas de los individuos tratados, considerando que las plantas son una mezcla compleja de fitoconstituyentes, este efecto se puede explicar por el elevado contenido de flavonoides que podrían estar presentes en los extractos a mayores concentraciones, permitiendo de ese modo aumentar la capacidad antioxidante, protegiendo al ADN de los daños que pudieran ser causados por metabolitos con actividad genotóxica y que podrían estar presentes también en el extracto, según lo descrito en un estudio donde se confirmó la presencia

de flavonoides y saponinas en extracto acuoso de *B. trimera* (Rodrigues *et al.*, 2009).

En la evaluación de la actividad como inhibidores de la peroxidación lipídica y captadores de radicales libres de tres especies de *Baccharis*, la *B. trimera*, *B. spicata* y *B. usterii*, en diferentes fracciones y concentraciones de los extractos de las partes aéreas de las especies citadas, se observó que a mayor concentración y polaridad de los extractos, mayor fue la actividad antioxidante, siendo las fracciones con mayor actividad el extracto acuoso y *n*-butanol a 25 µg.mL⁻¹, por otra parte las fracciones estudiadas mediante el ensayo de TBA, disminuyeron la producción de malondialdehído mediante la inhibición de la peroxidación lipídica e inhibieron la mortalidad celular inducida por peróxido de hidrogeno; finalmente se pudo determinar mediante cromatografía en capa fina la presencia de derivados fenólicos y terpenoides que podrían estar relacionados a su actividad antioxidante (De Oliveira *et al.*, 2004). En la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de seis plantas peruanas y de su composición de fenoles, mediante ensayos de inhibición de radicales DPPH●, superóxido e hidroxilo, de su poder reductor y actividad antioxidante total, se observó que *Uncaria tomentosa* y *Krameria triandra* presentaron mayor poder antioxidante, el cual podría deberse al elevado contenido de sustancias antioxidantes debido al contenido de flavonoides, ácido ascórbico y compuestos fenólicos (Doroteo *et al.*, 2013).

El contenido de flavonoides presentes en los extractos estudiados podrían jugar un papel fundamental en la actividad antioxidante, tal como se demostró mediante un estudio *in vitro*, donde se determinó la

capacidad antioxidante de once flavonoides mediante el test de captación de radicales DPPH● y el poder antioxidante reductor férrico (FRAP), comparando el poder antioxidante de los flavonoides de manera individual y de la mezcla entre flavonoides, se evidenció en los mismos un efecto sinérgico de la capacidad antioxidante en combinaciones de ciertos flavonoides, comparándolos con sus actividades individuales, lo que puede explicar los resultados obtenidos al realizar la medición del efecto antioxidante de alimentos íntegros (Hidalgo *et al.*, 2010). Este efecto sinérgico pudo observarse en el estudio realizado por (Soicke & Leng-Peschlow, 1987), donde evaluaron el efecto de la fracción rica en flavonoides de *B. trimeria* y de los flavonoides individuales purificados, sobre la tasa de supervivencia de ratones luego de la administración de faloidina (hepatotóxico), observándose que la fracción rica en flavonoides aumento al 100 % la tasa de supervivencia de los ratones tratados, frente al 25 % de supervivencia de los ratones no tratados con la fracción, al mismo tiempo se pudo observar que el mayor aumento de supervivencia se dio con la administración de la fracción rica en flavonoides en comparación con la administración de los flavonoides individuales purificados, concluyéndose que existe una probable interacción entre flavonoides que genere un efecto sinérgico para el efecto antihepatotóxico involucrado en la actividad hepatoprotectora.

Existen otros estudios realizados en donde no se detectaron actividad genotóxica, como en la evaluación del extracto acuoso de *B. trimeria* a 6,84 mg.mL⁻¹ y 68,40 mg.mL⁻¹ empleando células de médula ósea de ratas (Peron *et al.*, 2008); y otro mediante el test de *Allium cepa* de dos

extractos acuosos de diferentes especies de *Baccharis* (*B. genistelloides* y *B. buxifolia*), que tampoco evidenciaron actividad genotóxica (Lipa Quispe & Paúcar Quispe, 2015), ajustándose así a los resultados obtenidos a las concentraciones del extracto acuoso de 3,75 mg.mL⁻¹, 15 mg.mL⁻¹ y 30 mg.mL⁻¹ utilizados en el presente trabajo.

A diferencia de los estudios mencionados donde se no se demostraron algún potencial genotóxico de especies del género *Baccharis*, también se encontraron estudios que concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo a las concentraciones de 1,87 mg.mL⁻¹ y 7,5 mg.mL⁻¹ que presentaron actividad genotóxica, donde mediante el test de cometa y el test de micronúcleo en ratones se evaluaron actividades genotóxica y antigenotóxica del extracto acuoso de *B. trimeria*, a las concentraciones de 500, 1000 y 2000 mg.kg⁻¹ en dosis aguda, sin evidenciarse actividad genotóxica en ninguna de las concentraciones empleadas, sin embargo cuando el extracto fue administrado a los ratones durante tres días consecutivos, se observó un aumento significativo de la frecuencia de micronúcleos en la médula ósea de los ratones a las concentraciones de 1000 y 2000 mg.kg⁻¹, lo que sugiere un potencial mutagénico del extracto a dosis crónica (Rodrigues *et al.*, 2009); por otro lado en la evaluación de la actividad genotóxica del extracto de otra especie del mismo género, *Baccharis dracunculifolia*, empleando como solvente acetato de etilo con el test de cometa en células V79 de hámster chino, se observó que a las concentraciones de 50 µg.mL⁻¹ y 100 µg.mL⁻¹ indujeron a daño significativo en el material genético (Aguilar *et al.*, 2010). Los metabolitos responsables de la actividad genotóxica podrían ser

Escobar Ibarrola, L. et al. Actividad mutagénica del extracto acuoso de *Baccharis trimera* (Less) (Jaguarete ka`a) en *Drosophila melanogaster* mediante el test SMART

propias de la hierba o de algún factor externo, como fue demostrado en un estudio, donde se evaluó el potencial genotóxico del extracto acuoso de *B. trimera*, proveniente de una región afectada por la quema de carbón mediante el ensayo de cometa, dando como resultado que el extracto preparado a partir de la hierba sin exposición al carbón no presentó actividad genotóxica, mientras que el extracto preparado a partir de la hierba expuesta al carbón indujo a un aumento significativo de daño al ADN en las células tratadas a elevadas concentraciones, sugiriendo que la *B. trimera* es sensible al impacto causado por la quema de carbón (Cruz *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en esta investigación evidenciaron que la DL_{50} del extracto acuoso de *B. trimera* en *D. melanogaster*, bajo tratamiento crónico, es de 35,91 mg.mL⁻¹. La evaluación a las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *B. trimera* en *D. melanogaster* reveló que las concentraciones con un potencial genotóxico de acción directa fueron las concentraciones de 1,87 mg.mL⁻¹ y 7,5 mg.mL⁻¹. Se recomienda realizar la determinación de la actividad de genotoxinas de acción indirecta, y continuar con otros ensayos empleados en bioensayos con fraccionamiento bioguiados y un perfil fitoquímico de las fracciones con actividad, a modo de identificar la probable genotoxina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, C.; Alves, J.; Bastos, J.; & Tavares, D. (2010). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 30(1), 22-28.
- Carballo, M. A.; Cortada, C. M. & Gadano, A. B. (2005). *Riesgo y beneficio en el consumo de plantas medicinales*. 14(2), 15.
- Chifa, C. (2010). La perspectiva social de la medicina tradicional. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(4), 242-245.
- Cruz, C.; Silva, F.; Decker, N.; Menezes, A.; Ferraz, A.D & Silva J.D. (2013). Avaliação do potencial genotóxico de *Baccharis trimera* proveniente de região impactada pelo efeito da queima do carvão através do Ensaio Cometa *in vitro*. XIX Salão de Iniciação Científica e Tecnológica. <http://www.conferencias.ulbra.br/index.php/sic/xix/paper/view/1579>
- De Andrade, H. H. R.; Reguly, M. L. & Lehmann, M. (2004). Wing somatic mutation and recombination test. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 247, 389-412. <https://doi.org/10.1385/1-59259-665-7:389>
- De Oliveira, S. Q.; Dal-Pizzol, F.; Moreira, J. C. F.; Schenkel, E. P. & Gosmann, G. (2004). Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*. 23(3), 365-368.
- De Pardo Ghatti, E.; Monroy Delgadillo, M & Copali. D. (2009). Sustancias folclóricas como causa de Intoxicación por sustancia Desconocida en Terapia Intensiva del "Hospital Pediátrico Manuel Asencio Villarroel " (2003—2008). *Gaceta Médica Boliviana*, 32(2), 17-22.
- Dearfield, K. L. (1995). Information requirements and regulatory approaches for

- heritable genetic risk assessment and risk communication. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 330(1), 35-40.
- 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.
- Enríquez, S.; Quispe, R. E.; Amurrio, P.; Peñaranda, J. C.; Calle, A.; Orsag, V. & Almanza, G. R. (2018). Contenidos flavonocidos en las hojas de *Baccharis latifolia*, según el tipo de hoja, y su dependencia de las propiedades fisicoquímicas de los suelos. *Revista Boliviana de Química*, 35(5), 146-154.
- Finney, M. A. (1952). *Probit Analysis*. 78(3), 388-390.
- Fogel, R.; Céspedes, C.; López, L. & Valdez, S. (2016). *Propiedades medicinales de plantas: Conocimiento tradicional y patentes* (1a Edición). CERI.
- Frei, H. & Würigler, F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research*, 203(4), 297-308.
- Graf, U.; Würigler, 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.
- Hidalgo, M.; Sánchez-Moreno, C. & de Pascual-Teresa, S. (2010). Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 121(3), 691-696.
- Hostettmann, K.; Gupta, M.; Marston, A. & Ferreira-Quiroz, E. (2008). *Manual de Estrategias para Aislamiento de Productos Naturales Bioactivos*.
- 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.
- Lipa Quispe, F. & Paúcar Quispe, W. (2015). Caracterización farmacobotánica y evaluación genotóxica del extracto acuoso de dos especies de *Baccharis* (asteraceae). *Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco*.
- Marín, L.; Gayozo, E. & Zamorano, 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.
- Marinoff, A.M.; Martinez, J.L. & Urbina, M.A. (2009). Precauciones en el empleo de plantas medicinales. *Boletín Latino-americano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 8(3), 184-187.
- Miyazawa, M.; Anzai, J.; Fujioka, J. & Isikawa, Y. (2003). Insecticidal compounds against *Drosophila melanogaster* from *Cornus officinalis* Sieb. Et Zucc. *Natural Product Research*, 17(5), 337-339.
- Perez Trueba, J. (2003). *Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes* (N.º 1). 22(1), Article 1.
- Peron, A.; Felipes, J.; Mattge, G.; Cantagalli, L.; Mariucci, R. & Vicentini, V. (2008). Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera*

Escobar Ibarrola, L. et al. Actividad mutagénica del extracto acuoso de *Baccharis trimera* (Less) (Jaguarete ka`a) en *Drosophila melanogaster* mediante el test SMART

- Less, E. Solanum melongena L., em células de medula óssea de ratos Wistar. *Revista Brasileira de Biociências*, 6(2), Article 2.
- Reiter, L.; Potocki, L.; Chien, S.; Gribskov, M. & Bier, E. (2001). A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melano-gaster*. *Genome Research*, 11(6), 1114-1125.
- Rodrigues, C.; Dias, J.; de Mello, R.; Richter, M.; Picada, J.; & Ferraz, A. (2009). Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(1), 97-101.
- Romero Jiménez, M. (2013). Estudio anti-genotoxicológico y de citotoxicidad de plantas medicinales de uso cotidiano y de sus fenoles más característicos [Tesis doctoral]. Universidad de Córdoba. Departamento de Genética.
- Soicke, H. & Leng-Peschlow, E. (1987). Characterization of Flavonoids from *Baccharis trimera* and their Antihepatotoxic Properties. *Planta Medica*, 53(1), 37-39. <https://doi.org/10.1055/s-2006-962613>
- Soria, N. & Ramos, P. (2015). Uso de plantas medicinales en la atención primaria de salud en Paraguay: Algunas consideraciones para su uso seguro y eficaz. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 13(2), 8-17.

ANEXOS

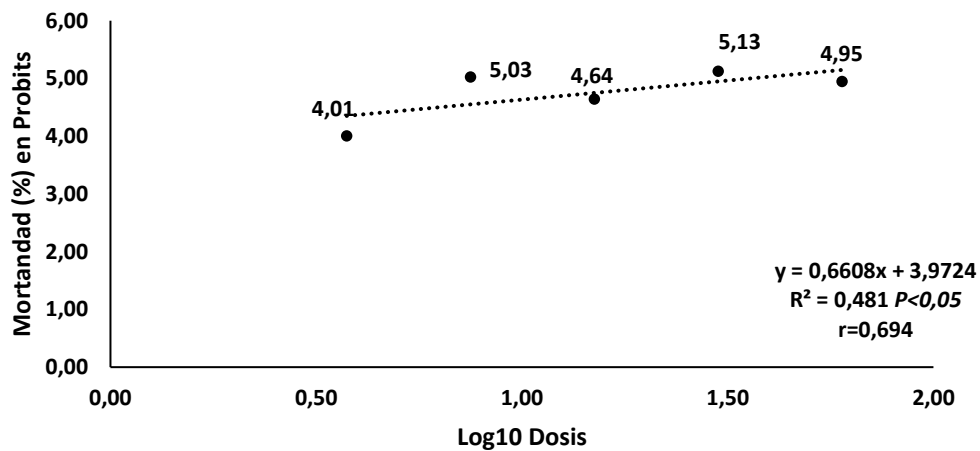


Figura 1. Análisis *probit* para la determinación de la DL_{50} del extracto acuoso de *B. trimera* en *D. melanogaster*.

Escobar Ibarrola, L. et al. Actividad mutagénica del extracto acuoso de Baccharis trimera (Less) (Jaguarate ka`a) en Drosophila melanogaster mediante el test SMART

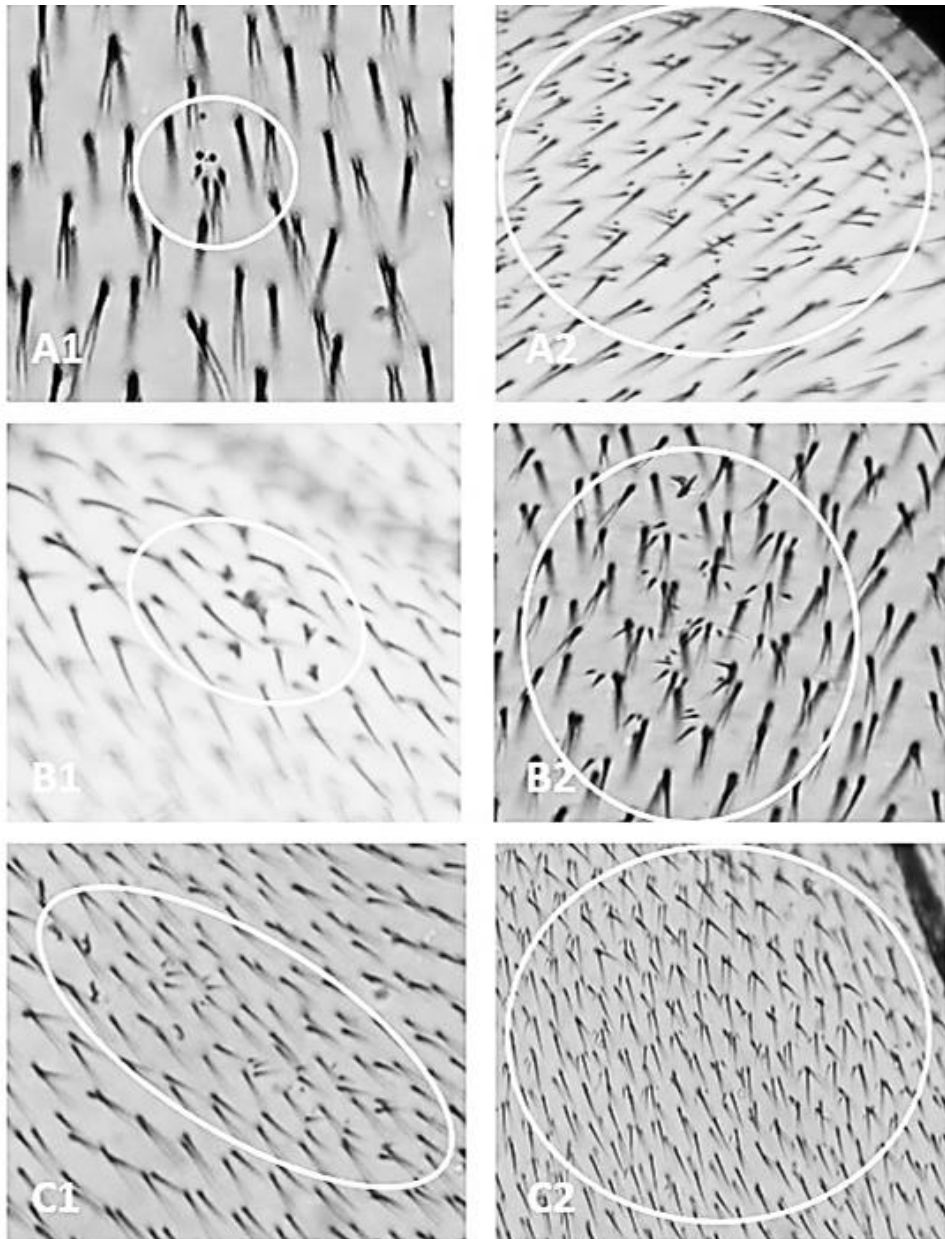


Figura 2. Clones mutantes identificados en alas de los individuos tratados con el extracto acuoso de *B. trimera* con microscopio óptico a 400X. (A). Individuos tratados con el extracto a $1,87 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, A1. MSP de tipo *mwh* A2. MSG de tipo *mwh* (B). Individuos tratados con el extracto a $3,75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ B1. MSG de tipo *flr³* B2. MSG de tipo *mwh* (C). Individuos tratados con el extracto a $7,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ C1. MG C2. MSG de tipo *mwh*.

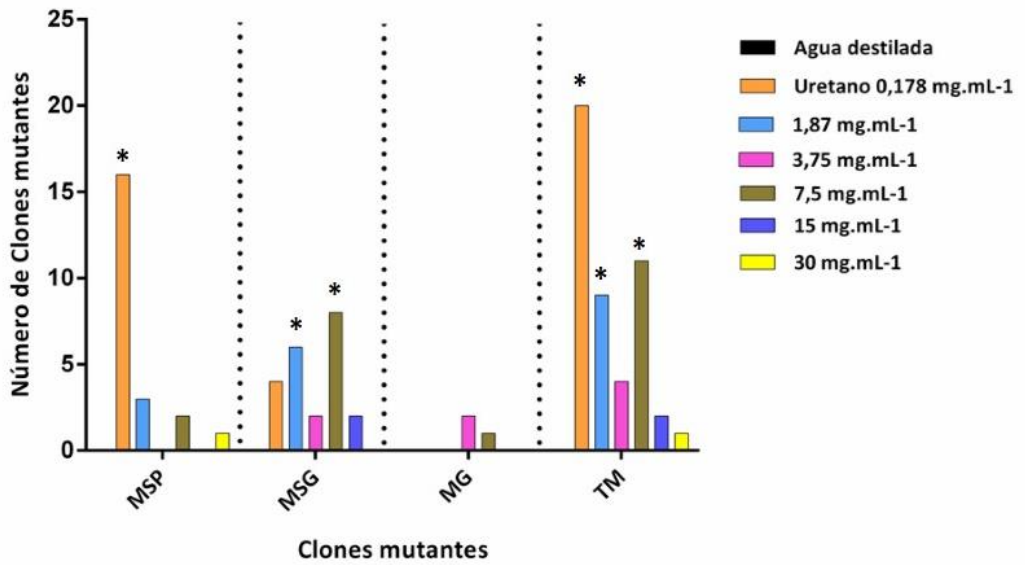


Figura 3. Cantidad de clones mutantes contabilizados en alas de *D. melanogaster* del ensayo realizado. (*) Aumento significativo en el número de clones mutantes ($P < 0,05$).

Escobar Ibarrola, L. et al. Actividad mutagénica del extracto acuoso de *Baccharis trimera* (Less) (Jaguarete ka`a) en *Drosophila melanogaster* mediante el test SMART

Tabla 1: Análisis *in vivo* del potencial mutagénico del extracto acuoso de *B. trimera* en *D. melanogaster* empleando el Test de Mutación Somática y de Recombinación (SMART)

Tratamientos	Número de alas	MSP (1-2 céls) ^a <i>m</i> = 2		MSG (>2 céls) ^a <i>m</i> = 5		MG <i>m</i> = 5		TM <i>m</i> = 2	
Agua destilada	40	0,00	(00)	0,00	(00)	0,00	(00)	0,00	(00)
Uretano 0,178 mg.mL⁻¹	40	0,80	(16) +	0,20	(04) i	0,00	(00) i	1,00	(20) +
1,87 mg.mL⁻¹	40	0,15	(03) i	0,30	(06) +	0,00	(00) i	0,45	(09) +
3,75 mg.mL⁻¹	40	0,00	(00) i	0,10	(02) i	0,10	(02) i	0,20	(04) i
7,5 mg.mL⁻¹	40	0,10	(02) i	0,40	(08) +	0,05	(01) i	0,55	(11) +
15 mg.mL⁻¹	40	0,00	(00) i	0,10	(02) i	0,00	(00) i	0,10	(02) I
30 mg.mL⁻¹	40	0,05	(01) i	0,00	(00) i	0,00	(00) i	0,05	(01) I

Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, factor de multiplicación. Niveles de significancia $\alpha=\beta=0,05$. ^aIncluso las manchas simples *flr*³ raras. TM: Total de Manchas.