

Evaluación citotóxica de *Psidium guajava* L. utilizando como bioensayo el Allium test.

Virginia Fernández¹, Luciana Sales¹, Ana Gómez¹, Francisco Cabañas², Jorge Alfonso¹

¹ Laboratorio de Mutagénesis Ambiental. Departamento de Biología-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales- Universidad Nacional de Asunción. Campus Universitario, San Lorenzo, Paraguay.

² Departamento de Matemática. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales- Universidad Nacional de Asunción. Campus Universitario, San Lorenzo, Paraguay.

Evaluación citotóxica de *Psidium guajava* L. utilizando como bioensayo el Allium test.

La farmacopea paraguaya es rica en productos naturales y es urgente que se lleve a cabo una política de seguridad farmacológica, dado el incipiente desarrollo de las industrias fitoquímicas. En este estudio se ha tenido como objetivo evaluar la actividad citotóxica del extracto crudo de las hojas de *Psidium guajava* L., planta de regiones tropicales y subtropicales, utilizada en la medicina popular como antiinflamatorio, astringente, y como producto alimenticio en las poblaciones rurales y urbanas. Los resultados del análisis dieron datos significativos de efecto citotóxico con dosis de 7.5 mg., pudiendo considerarse como producto que a altas concentraciones induce C-Mitosis y otras aberraciones cromosómicas aisladas, en tratamientos de 12 y 36 hs., utilizando el Allium Test.

Palabras claves: *Psidium*-citotóxico-ciclo celular - Allium Test - productos naturales

Cytotoxic Evaluation of *Psidium guajava* L using as bioassay the Allium Test

Paraguayan traditional medicine is rich in natural products, and given the recent development of the phytochemical industry, a policy of security in pharmacology is required. The purpose of this study is to evaluate the cytotoxic activity of an extract of leaves from *Psidium guajava* (L), a plant from tropical and sub-tropical regions; and commonly used in traditional medicine because of its anti-inflammatory and astringent properties, and as a nutritional resource by the urban and countryside populations. The results of the analysis gave significant data in cytotoxicity which a 7.5 mg. dose, thus in high concentrations could be considered a product that induces C-Mitosis and other isolated chromosomal abnormalities, in treatments of 12 and 36 hours, applying the Allium Test.

Key words: *Psidium*-cytotoxic-cell cycle-Allium Test-natural products

INTRODUCCION

Paraguay, tiene una cultura bastante generalizada en cuanto al uso de plantas medicinales, muy rica por sus productos activos. En las poblaciones rurales e indígenas del país se utiliza mas de 50 especies como mínimo en el tratamiento alternativo de varias enfermedades.

Estas son empleadas en forma de infusiones, macerados, decoctos; siendo

estos conocimientos transmitidos de padres a hijos, formando parte de la tradición popular.

Actualmente en el país se están desarrollando Industrias Fitoquímicas y es necesario implementar una política de seguridad farmacológica y toxicológica para elaborar y formular un medicamento de origen natural. Los estudios Citotóxicos y Genotóxicos de los fitofármacos son esenciales para que

puedan ser registrados y recomendados como productos farmacéuticos para el consumo humano.

Las sustancias químicas presentes en las diferentes especies de plantas pueden presentar propiedades relacionadas con procesos de diferenciación celular, carcinogénicas y mutagenicas. Está plenamente demostrado que la alteración de la proliferación celular es la causa principal de varios tipos de enfermedades neoplásicas. (Machado Santelli, 2000)

En las regulaciones farmacéuticas internacionales se establecen los estudios cito y genotóxico de todos los medicamentos de origen sintético o naturales que puedan ser ingeridos y utilizados por el ser humano (Montero et al, 2.007). Por esa razón es de suma importancia poner a disposición de la industria paraguaya la gran batería de bioensayos que se pueda realizar para la determinación de toxicidad a nivel celular, perjudicial para la salud.

La presente investigación ha tenido como objetivo evaluar la actividad citotóxica del extracto crudo del *Psidium guajava* L. Ésta es una planta nativa de Brasil siendo actualmente un importante cultivo frutal en el huerto casero de las tierras bajas de los trópicos y subtrópicos del mundo. Pertenece a la familia de las Mirtáceas la cual incluye a más de 3.000 especies de árboles y arbustos del género *Psidium*. En Paraguay se lo utiliza en la medicina popular como antiinflamatorio y en la gastronomía para la preparación de postres y jugos.

Para determinar los efectos que pueda producir el *Psidium guajava* L. a nivel celular hemos ensayado el Allium Test. (Ovedare et.al, 2009) ya que con este

podemos observar que los meristemos de plantas superiores proliferan siguiendo una cinética en equilibrio dinámico, lo que puede evaluarse a través de una serie de indicadores tales como la velocidad de crecimiento, la población de células en división celular, el índice mitótico y la frecuencia de células en los diferentes estados morfológicos. (López-Sáez, 1965.)

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Se seleccionaron hojas de *Psidium guajava* L., cuyo material testigo (L. Sales, Nº 1), se encuentra depositado en el Herbario FACEN; luego se procedió a macerar las hojas y preparar infusiones a las siguientes concentraciones: 7,5% y 0,5%, colocados en frascos de vidrio de 50 ml de preparado por cada concentración.

Se seleccionó 6 bulbos de *Allium cepa* L., descartando la 1ra y 2da catáfila del bulbo y realizando un pequeño corte a nivel radical, para facilitar el crecimiento esperado. Luego se lavaron con abundante agua y se colocaron en un recipiente con agua oxigenando con burbujeo constante (aproximadamente 1 burbuja por segundo). Los bulbos se dispusieron de manera en que la parte radical quedó sumergida en el recipiente y en contacto con el agua.

Grupo tratado

Una vez crecidas las raíces, hasta 3 cm aproximadamente, bajo condiciones controladas de temperatura y oxigenación, se seleccionaron algunos bulbos y se sometieron a tratamiento con las infusiones preparadas con las hojas de *Psidium guajava* L. a las concentraciones citadas anteriormente. Luego de 12 hs. Se cortaron 10 raíces como mínimo por cada concentración, y se colocaron en una solución FARMER por periodo de una

hora en un frasco de plástico y luego se lavaron con agua destilada en una placa de Petri.

Los ápices fueron sometidos a hidrólisis con una solución de ácido clorhídrico 1N, por un periodo de 15 minutos. Se coloreó con orceína acética y se llevaron a una lámina, se realizó el aplastado con ayuda de laminillas. Este mismo proceso fue llevado a cabo para raíces crecidas en ambas concentraciones luego de transcurridas 36 hs. Se observaron los preparados en aumento de 40x, registrándose las fases y anomalías presentes en el ciclo celular en un total de 1000 células por cada lámina. Se calculó el índice mitótico, índice de fases y el ensayo de chi-cuadrado para determinar el grado de significancia.

Grupo control

Se tomó algunos bulbos del grupo control, tratados con oxigenador, y se cortó 10 raíces con 3 cm de longitud, se fijó con solución FARMER por 1 hora en un frasco de plástico. Seguido este proceso, se llevó a cabo el mismo procedimiento que con el grupo tratado con las infusiones.

DISCUSION

El análisis de los resultados de los bioensayos de las raíces del grupo de bulbos de *Allium cepa* L. que han sido considerados como controles, muestran una cinética en equilibrio durante las 12 y 36 horas, teniendo en cuenta una temperatura controlada de $19\pm 25^{\circ}\text{C}$.

En un panorama general de observación se registró un alto índice mitótico, con elevado porcentaje de fases de proliferación, como profase, metafase, anafase, y telofase siguiendo el patrón normal del ciclo celular del *Allium cepa* L.,

lo que se traduce en un porcentaje de 31,3 de división mitótica a las 12 horas y 36,6 % a las 36 horas. No se encontró anomalías citotóxicas durante las divisiones celulares (Véase tabla 1 y 2; Figuras E y F).

En el análisis de las raíces tratadas con una dosis de 0.5 mg de *Psidium guajava* L. a $19-25^{\circ}\text{C}$ de temperatura y a 12 horas de exposición se ha podido determinar una disminución del 9,1% del ciclo de división celular con relación al control correspondiente a la misma cantidad de horas. Se observó un débil aumento de profases y metafases y una leve disminución de anafases y telofases.

A las 36 horas y a la misma temperatura y concentración, el índice mitótico fue disminuyendo en un porcentaje del 15,1% con relación al control a la misma cantidad de horas; con aumento de profases y metafases, identificándose pocas anafases y telofases (Véase Tabla 1 y 2; Figuras A y B).

Las raíces tratadas con infusiones de *Psidium guajava* L. a concentración de 7,5 mg durante 12 horas presentaron una disminución en cuanto al índice mitótico del 12 % y a la misma concentración pero transcurridas 36 horas, se observó una disminución del índice del 24,1%.

Se observaron las fases de la división celular (Fig. 1-5) en varios campos cromosomas en anillos (Fig. 6) múltiples divisiones celulares, Bimiosis (Fig. 7) células binucleadas (Fig. 8) puentes (Fig. 9) y gran cantidad C- Mitosis (Fig. 10).

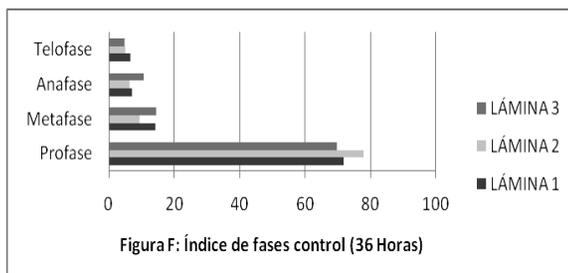
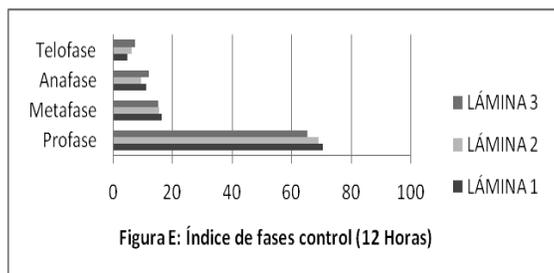
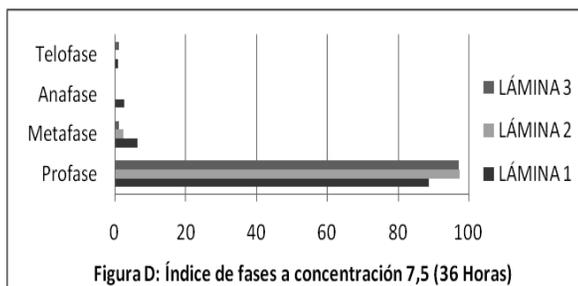
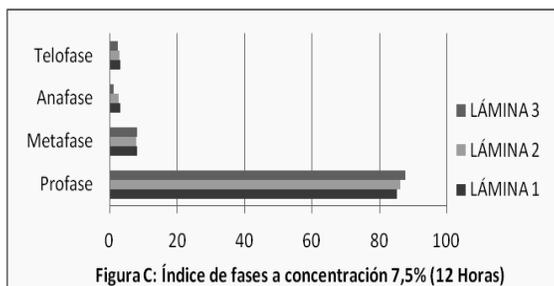
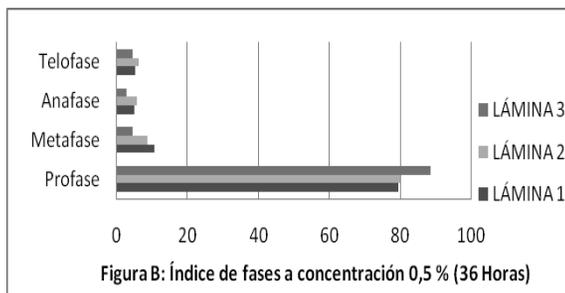
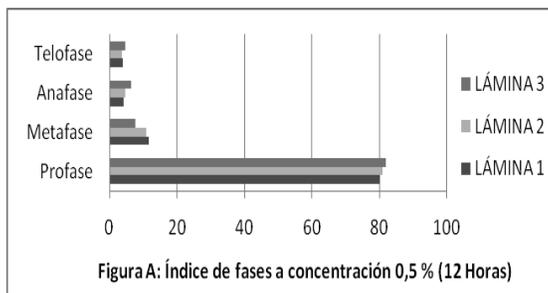
A mayor concentración de las infusiones se observó una disminución de la proliferación de células en división a nivel de metafases, observándose un alto índice de interfases.

Tabla 1. Número, índice de fases, índice mitótico en grupo control y tratamientos

Lámina	Fase	Grupo control 12 horas			Grupo control 36 horas			Raíces expuestas a infusión al 0,5 % durante 12 horas.		
		Número	Índice de Fases (%)	Índice mitótico	Número	Índice de Fases (%)	Índice mitótico	Número	Índice de Fases (%)	Índice mitótico
1	Interfase	668			613			785		
	Profase	234	70,4		278	71,83		185	80,08	
	Metafase	55	16,5	33,20%	55	14,21	38,70%	27	11,6	22,90%
	Anafase	37	11,1		28	7,23		10	4,3	
	Telofase	16	4,8		26	6,71		9	3,89	
2	Interfase	671			593			811		
	Profase	229	69,1		318	77,94		156	80,08	
	Metafase	52	15,6	33,10%	38	9,31	40,75%	21	10,8	19,20%
	Anafase	31	9,3		26	6,37		9	4,6	
	Telofase	21	6,3		21	5,14		7	3,6	
3	Interfase	719			695			754		
	Profase	178	65,4		214	69,7		202	81,8	
	Metafase	41	15,07	27,10%	45	14,6	30,60%	19	7,66	24,70%
	Anafase	33	12,1		33	10,7		15	6,4	
	Telofase	20	7,3		15	4,8		12	4,8	

Tabla 2. Número, índice de fases, índice mitótico en grupo control y tratamientos

Lámina	Fase	Raíces expuestas a infusión al 0,5 % durante 36 horas.			Raíces expuestas a infusión al 7,5 % durante 12 horas.			Raíces expuestas a infusión al 7,5 % durante 36 horas		
		Número	Índice de Fases (%)	Índice mitótico	Número	Índice de Fases (%)	Índice mitótico	Número	Índice de Fases (%)	Índice mitótico
1	Interfase	701			820			900		
	Profase	243	79,41		157	85,3		95	88,7	
	Metafase	32	10,45	30,38%	15	8,1	18,30%	7	6,5	10,60%
	Anafase	15	4,9		6	3,2		3	2,8	
	Telofase	16	5,22		6	3,2		1	0,93	
2	Interfase	769			839			881		
	Profase	185	79,74		139	86,3		123	97,61	
	Metafase	20	8,62	23,17%	13	8,07	16,10%	3	2,38	12,50%
	Anafase	13	5,6		4	2,8		0	0	
	Telofase	14	6,03		5	3,1		0	0	
3	Interfase	895			766			897		
	Profase	100	88,49		210	87,8		149	97,38	
	Metafase	5	4,42	11,20%	20	8,3	23,70%	2	1,3	14,57%
	Anafase	3	2,65		3	1,2		0	0	
	Telofase	5	4,42		6	2,5		2	1,3	



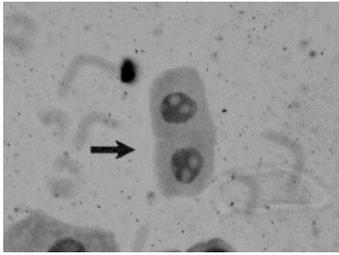


Fig. 1

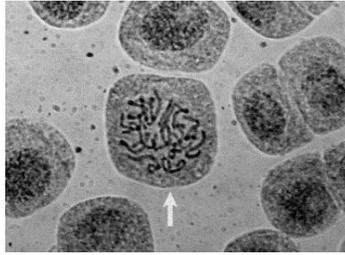


Fig. 2

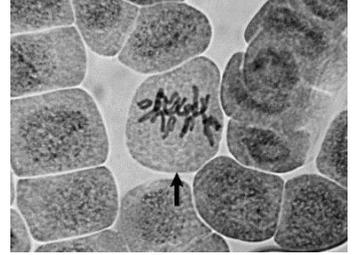


Fig. 3

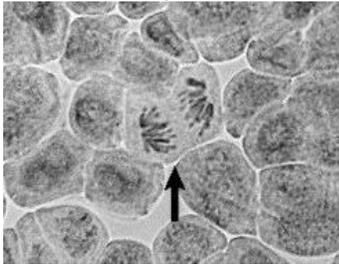


Fig. 4

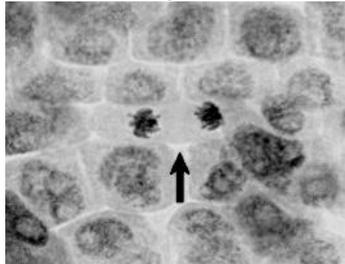


Fig. 5

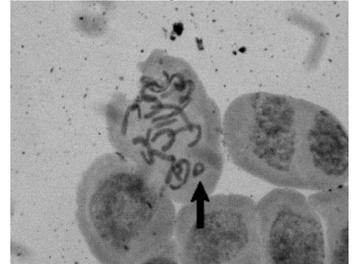


Fig. 6

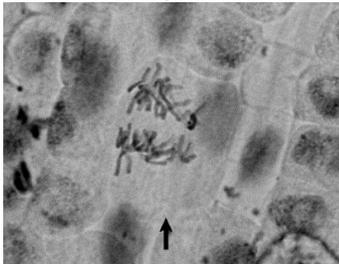


Fig. 7

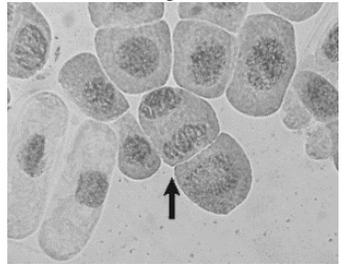


Fig. 8

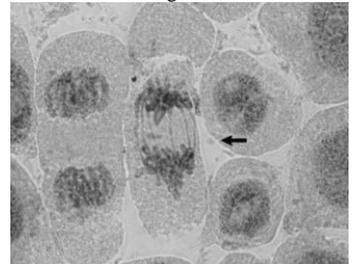


Fig. 9

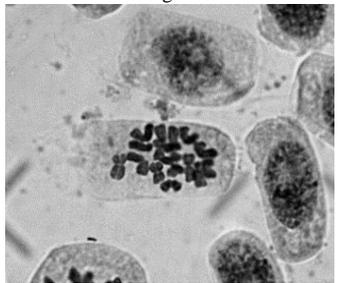


Fig. 10

Diferentes fases de la mitosis y anomalías del ciclo en células de *Allium cepa* L. observadas durante el ensayo: Fig. 1: Interfase; Fig. 2: Profase; Fig. 3: Metafase; Fig. 4: Anafase; Fig. 5: Telofase; Fig. 6: Anillo; Fig. 7: Bimitosis; Fig. 8: Binucleada; Fig. 9: Puentes múltiples; Fig. 10: C-Mitosis. (Fig. 1, 4, 5, 8 A: 40X; 2, 3, 6, 7, 9, 10 A: 100X, Olympus Microscope)

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos se ha determinado que las infusiones de hojas de *Psidium guajava* L. producen un retardo en la división celular con una diferencia significativa entre la muestra control y los tratados ($P \leq 0,001$) que aumenta de forma directamente proporcional a la concentración y al tiempo de tratamiento en raíces de *Allium cepa* L. Se determinó un efecto C-mitótico a partir de la concentración media utilizada (0,5 mg).

Morinda lucida and *Citrus medica* using the *Allium cepa* assay. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8 (2), 97 – 103.

AGRADECIMIENTOS

A los directivos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UNA.

BIBLIOGRAFÍA

- Cano., M. 2002, Alteraciones De Los Índices De Fases Y Mitótico En Meristemos De *Allium Cepa*, Inducidas Por Extractos De *Lepidium meyenii* Walp "Maca" Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Ricardo Palma.
- López-Sáez JF & Fernández E. 1965. Mitotic partial index and phase indices. *Experientia* 21: 591-592.
- Machado-Santelli GM. 2000. Cell cycle progression in normal and tumoral cell cultures. *BIOCELL*: 25 abst. S1
- Quires C, Epperson A., Hu J., Holle M.: Physiological studies and determination of chromosome number in Maca, *Lepidium meyenii*, *Economic Botany* 1996, 50: 216-223.
- Oyedare, B.M. Bakare, A. Akinboro, A. 2009. Genotoxicity assessment of water extracts of *Ocimum gratissimum*,