



Tamarindus indica L. (“tamarindo”): Evaluación del Potencial Mutagénico y Antioxidante

Janet PILOTO FERRER ^{1*}, Antonia Remigio MONTERO ¹, Yamilet VEGA HURTADO ¹,
Carlos RODRÍGUEZ FERRADA ² & Caridad CARBALLO ²

¹ Grupo de Genotoxicidad. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM).
Ave. 26 # 1605 el Boyeros y Puentes Grandes. Plaza. Ciudad Habana. Cuba

² Estación Experimental de Plantas Medicinales “Juan T. Roig”. Güira de Melena. Cuba

RESUMEN. El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial mutagénico y antioxidante de un extracto hidroalcohólico al 70% de la corteza de *T. indica* L. a través de los ensayos de: *Salmonella*/Microsoma (Test de Ames) para reversión bacteriana, inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón, reducción de DPPH, peroxidación lipídica y secuestro de radicales OH. El extracto evaluado no resultó mutagénico con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA-1535, TA-1537, TA-98 y TA-100 cuando se ensayaron concentraciones en un rango de 312 a 5000 $\mu\text{g/placas}$ en un protocolo de incorporación en agar. Sin embargo en el ensayo *in vivo* de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón se emplearon dosis hasta 2000 mg/kg de peso corporal mostrando resultados positivos, ya que produjo un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de la médula ósea en todas las dosis evaluadas. En los ensayos de actividad antioxidante mostró valores de $\text{IC}_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$ y $\text{IC}_{50} < 32 \mu\text{g/ml}$ en la reducción de DPPH y en la inhibición de la peroxidación lipídica respectivamente lo que indica que tiene potencialidad como secuestrador de radicales libres.

SUMMARY. “*Tamarindus indica* L. (“tamarindo”): Evaluation of the Mutagenic and Antioxidant Potential”. The objective of this work was to evaluate the mutagenic and antioxidant potential from a hydroalcohol extract to 70% of bark the *T. indica* L. by the *Salmonella*/microsome (Ames Test) assays for bacterial reversion, mouse bone marrow micronucleus test, DPPH reduction assay, lipid peroxidation and scavenging of OH radical. The extract evaluated was not mutagenic with the strains of *Salmonella typhimurium* TA-1535, TA-1537, TA-98 and TA-100 when concentrations were assessed in a range from 312 to 5000 $\mu\text{g/plate}$ in a protocol of incorporation in agar; however in the assays of mouse bone marrow micronucleus were used doses until 2 000 mg/kg of w.b., showing positive results, where a significant increase in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes in all the evaluated doses was produced. In the assays of antioxidant activity the extract showed values of $\text{IC}_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$ in DPPH reduction and $\text{IC}_{50} < 32 \mu\text{g/ml}$ in inhibition of lipid peroxidation, indicating good potential as free radical scavenger.

INTRODUCCION

La revalorización de las plantas medicinales como opción terapéutica ha demostrado ser un importante instrumento en la atención de salud, tanto como recurso local validado en la atención primaria, como en forma de fitomedicamento industrializado. Desde hace varios años, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado incluir en los programas de salud los componentes tradicionales y aprovechar los recursos locales como medicamentos a base de plantas ¹. Sin embargo, para contar con una al-

ternativa terapéutica de fuente y origen vegetal que reúna los requisitos mencionados, de seguridad, eficacia y calidad, es indispensable demostrar, sobre bases científicas la inocuidad de una planta medicinal y cumplir con todo lo establecido en los lineamientos internacionales para la evaluación y el control de los medicamentos herbarios ².

Entre los estudios de Toxicología Preclínica que es necesario emprender al respecto, las pruebas de mutagenicidad a corto plazo son ensayos diseñados para discernir si un agente quí-

PALABRAS CLAVE: Antioxidante, Genotoxicidad, Mutagénico, Tamarindo.

KEY WORDS: Antioxidant, Genotoxicity, Mutagenic, Tamarindo.

* Author to whom correspondence should be addressed *E-mail:* andres.piloto@infomed.sld.cu, cidem@infomed.sld.cu

mico es capaz de causar alteraciones en la constitución genética de los organismos, vale decir mutaciones a nivel de gen o cromosoma, cuyos efectos sobre la salud humana abarcan alteraciones potenciales tan importantes como cáncer, infertilidad, teratogénesis, etc. A partir de un estudio inicial de la actividad antimutagénica realizada a varias especies de la flora cubana de uso frecuente por nuestra población ³, se evidenció que el extracto con un menstruo etanólico al 70% de tamarindo tuvo resultados alentadores cuando se midió inhibición del ensamblaje/desensamblaje de la tubulina ⁴.

El tamarindo (*Tamarindus indica* L.) es una planta medicinal de reconocido uso tradicional en el tratamiento de diferentes afecciones, de la cual su fruto es oficial en la Farmacopea Británica ⁵ con conocidas propiedades terapéuticas, como hepatoprotectora y antimicrobiana ⁶. En Cuba es utilizada como refrescante y contra las enfermedades hepáticas ⁷.

La flora medicinal cubana ha sido poco investigada como fuente de compuestos capaces de inhibir la formación de microtúbulos del huso mitótico por tanto se realizó un screening de 85 extractos de plantas usadas comúnmente por la población cubana donde una de las plantas con mejores resultados fue el *T. indica* L. ³; de ahí la necesidad de profundizar en el estudio de la corteza de *T. indica* L. desde el punto de vista genotóxico que contribuirá a los estudios necesarios para su utilización como materia prima en la industria fitofarmacéutica.

En este trabajo nos propusimos evaluar el potencial mutagénico y antioxidante de un extracto hidroalcohólico al 70% de tamarindo a través de los ensayos de: *Salmonella*/Microsoma (Test de Ames) para reversión bacteriana, Inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón, Reducción de DPPH, Peroxidación lipídica y Secuestro de radicales OH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para este estudio se utilizó la corteza del tallo de tamarindo, material colectado en la Estación Experimental de Plantas Medicinales "Dr. Juan Tomas Roig" sito en Güira de Melena, Provincia de La Habana en los meses de marzo a mayo del 2005. Un ejemplar de la misma se conserva en el herbario de la institución con número ROIG 4670.

Preparación del extracto

El material vegetal seco y molido fue so-

metido a la extracción por percolación con alcohol al 70% descrito por Martin & Cook y Soler *et al.* ^{8,9}.

Ensayo de *Salmonella*/Microsoma (Test de Ames)

Se empleó una batería de 4 cepas de *Salmonella typhimurium*, TA-1535, TA-1537, TA-98 y TA-100, donadas por el Dr. Bruce N Ames (Instituto de Investigación del Hospital pediátrico de Oakland, USA), empleando el método de incorporación en placa con un protocolo de trabajo estandarizado ^{10,11}. Se ensayaron concentraciones de 312, 625, 1250, 2500, y 5000 µg/placa de sólidos totales, sembrándose tres placas por concentración. Se utilizaron diferentes controles positivos en dependencia de la cepa y la presencia o no de la activación metabólica exógena. La misma contenía 10% de fracción S9 en solución de co-factores, obtenida a partir de hígado de ratas tratadas con fenobarbital y 5,6 naftoflavona ¹¹⁻¹³. Las placas se incubaron a 37 °C y se contaron las colonias revertantes a las 48 h. Para el análisis estadístico se aplicó el programa SALANAL (*Salmonella Assay Analysis*. Versión 1. US Environmental Protection Agency) ¹⁴.

Ensayo de inducción de micronúcleos

Se emplearon ratones albinos de la línea no isogénica Suizo, procedentes del Laboratorio de Control Biológico del CIDEM, con un peso promedio de 21,8 ± 1,6 g y con 5 semanas de nacidos. Previo al experimento, los animales se sometieron a un período de adaptación de una semana en condiciones de temperatura y humedad convencionales. La alimentación consistió en ratonina peletizada y agua sin restricción. Se establecieron 5 grupos experimentales: control negativo (etanol al 60%), un control positivo (Mitomicina C, 2 mg/kg de pc en dosis única, 24 h antes del sacrificio) y 3 dosis (500, 1 000 y 2 000 mg/kg de pc), cada grupo estuvo representado por 10 animales 5 de cada sexo ¹⁵. La vía de administración fue oral a razón de 10 ml/kg de pc en dosis separadas por 24 h. El sacrificio de los animales, el muestreo, procesamiento y evaluación de las extensiones de médula ósea se realizó de acuerdo a la metodología establecida ¹⁶.

El análisis estadístico se llevó a cabo aplicando la transformación $\sqrt{X + 1}$ al por ciento de eritrocitos policromáticos micronucleados (% MPCE) y posteriormente se aplicó un Anova simple para los ratones machos y hembras empleando el paquete estadístico MICROSTA ¹⁷.

Reducción de DPPH

La reducción del radical 1,1-difenil-2-picrylhidracil (DPPH) por el extracto fue desarrollado en una placa de 96 pozos. Se midió la absorbancia a 515 nm a las diferentes concentraciones del extracto según Navarro *et al.*¹⁸. IC₅₀ fue derivado de las curvas obtenidas

Ensayo de Peroxidación lipídica

La inhibición de la peroxidación lipídica fue llevada a cabo según Ramos *et al.*¹⁹.

Secuestro de radicales •OH

La inhibición del daño del radical hidroxilo fue ensayado según Jodynis-Liebert *et al.*²⁰. Se utilizó una Densidad Óptica de 535 nm y la concentración de la sustancia de prueba fue de 100 µg/ml. Manitol (50 mM) fue usado como referencia para el secuestro de radicales •OH.

RESULTADOS

Ensayo de Salmonella/Microsoma (Ames)

Los resultados en la frecuencia de reversión bacteriana en el test mutagénico de Salmonella/microsoma se presentan en la Tabla 1. Como se puede observar no hubo un incremento significativo en los revertantes en el rango de concentración de 312 a 5000 µg/placas.

Ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón

Los resultados del ensayo aparecen en la Tabla 2. En ambos sexos se encontró un aumento significativo ($p < 0,05$) en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (PCE-MN) de las dosis en estudio.

Ensayos de reducción de DPPH, Peroxidación lipídica y Secuestro de radicales •OH

El extracto mostró un valor de IC₅₀ menor de 30 µg/ml (16 µg/ml) en la reducción del DPPH. En la Tabla 3 se observan los valores de inhibición de la peroxidación lipídica *in vitro* y del secuestro de radicales libres OH indicando que tiene potencialidades como antioxidante.

DISCUSIÓN

Tal como puede observarse a partir de los resultados, en el sistema de ensayo Salmonella/Microsoma que mide inducción de mutaciones génicas detectadas como reversión del fenotipo histidina- dependiente en cepas de *Salmonella typhimurium* el extracto de *T. indica* L. no indujo efecto mutagénico, al no incrementarse el número de revertantes por placas para las ce-

Concentración (µg/placas)	TA-98		TA-100	
	-S9+S9	-S9	-S9	+S9
	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
0 ^a	27,7 ± 8,3	19,0 ± 9,2	133,0 ± 17,1	153,0 ± 38,2
312	16,0 ± 7,9	14,7 ± 3,1	143,7 ± 41,2	159,7 ± 11,5
625	12,7 ± 6,7	19,7 ± 2,1	145,0 ± 24,0	155,7 ± 2,1
1250	17,5 ± 0,7	17,7 ± 2,5	121,0 ± 4,4	121,0 ± 17,3
2500	16,7 ± 3,8	11,3 ± 2,5	152,0 ± 16,7	136,3 ± 22,8
5000	10,7 ± 1,5	11,3 ± 1,5	86,7 ± 6,8	117,0 ± 9,5
Control Positivo ^b	1057,3 ± 140,5**	2166,7 ± 208,2**	1070,7 ± 55,6**	371,3 ± 93,5**
Concentración (µg/placas)	TA-1535		TA-1537	
	-S9+S9	-S9	+S9	
	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
0 ^a	13,0 ± 3,0	20,67 ± 12,50	28,0 ± 4,6	29,7 ± 1,5
312	13,7 ± 3,1	6,67 ± 3,21	24,0 ± 9,2	17,7 ± 14,3
625	9,0 ± 3,6	10,33 ± 2,08	23,3 ± 8,1	18,0 ± 13,9
1250	11,7 ± 1,5	17,00 ± 3,00	19,7 ± 6,0	25,7 ± 8,1
2500	17,7 ± 7,6	22,33 ± 3,21	19,7 ± 1,5	20,3 ± 0,6
5000	18,7 ± 2,1	24,00 ± 2,00	26,0 ± 5,6	21,7 ± 1,5
Control Positivo ^b	997,0 ± 167,9**	470,7 ± 56,4**	-	223,3 ± 36,5**

Tabla 1. Resultado del Ensayo *Salmonella*/Microsoma para el extracto con un menstruo etanólico al 70% de *Tamarindus indica* L. ** $p < 0,01$. ^a control negativo, dimetil sulfoxido (DMSO). ^b TA-1535 TA-100 (-S9) NaNO₃ (50 µg/ml), TA-1535 (+S9) ciclosfosfamida (5000 µg/ml), TA-98 (-S9) ácido picrolónico (1000 µg/ml), TA-98 TA-1537 (+S9) 2 amino fluoreno (100 µg/ml), TA-100 (+S9) benzo(a)pireno (100 µg/ml), TA-1537(-S9) 9 amino acridina (1000 µg/ml).

Dosis (mg/kg)	Sexo	Índice de Toxicidad (PCE/NCE) (X ± DE)	Índice de Genotoxicidad (%PCE-MN) (X ± DE)
500	M	0,47 ± 0,04	0,35 ± 0,25*
	H	0,48 ± 0,12*	0,52 ± 0,16*
1000	M	0,40 ± 0,13	0,48 ± 0,21*
	H	0,56 ± 0,09*	0,23 ± 0,14*
2000	M	0,53 ± 0,54	0,61 ± 0,11*
	H	0,51 ± 0,04*	0,60 ± 0,31*
Mitomicina C 2 mg/kg	M	0,40 ± 0,03	1,84 ± 0,99**
	H	0,36 ± 0,03	0,86 ± 0,14**
Etanol	M	0,49 ± 0,0	0,27 ± 0,17
	H	0,36 ± 0,1	0,15 ± 0,21

Tabla 2. Porcentaje de Micronúcleos e Índice de Toxicidad de los grupos controles y tratados. MN: micronúcleos PCE: Eritrocitos policromáticos NCE: Eritrocitos normocromáticos X: Media DE: Desviación Estándar. M: machos. H: hembras. * p< 0.05. ** p<0.01 (Test de Dunnett).

Especie	% Inhibición	
	secuestro de radicales OH	peroxidación lipídica
<i>Tamarindus indica</i> L.	6,23	100 (18,70) ^a

Tabla 3. Resultados de Actividad antioxidante in vitro en cuanto a la inhibición del secuestro de radicales libres y peroxidación lipídica de un extracto con un menstuo etanólico de la corteza de *Tamarindus indica* L. ^a Ensayado 100µg/ml del extracto, el valor en paréntesis indica IC₅₀ en µg/ml.

pas y dosis empleadas; con y sin activación metabólica. Reportes anteriores corroboran la negatividad de *T. indica* L. en el ensayo de reversión bacteriana con *Salmonella typhimurium* para las cepas TA-98, TA-100 y TA-102 mostrándose no genotóxicos ²¹.

En el ensayo *in vivo* de inducción de Micronúcleos en médula ósea de ratón, para las hembras ninguna dosis causó toxicidad detectable en el órgano blanco, la médula ósea, es de destacar que ninguna de las dosis en estudio afecta citotóxicamente la médula ósea con el extracto de *T. indica* L., ya que son registrados microscópicamente muchos más eritrocitos maduros (PCE). Sin embargo encontramos que los valores para el índice de toxicidad en los machos para la dosis de 1000 mg/kg (0,40) difieren estadísticamente del control negativo (0,49) indicando una clara toxicidad medular.

Obsérvese que la toxicidad celular conduce a la rotura del ADN y la consiguiente aparición de aberraciones cromosómicas ya que los índices de genotoxicidad en los grupos tratados con 500, 1000 y 2000 mg/kg de peso corporal del extracto de *T. indica* L. indican un incremento

significativo de este índice respecto al grupo control negativo, y en el caso particular de los machos al realizar la prueba de tendencia lineal en proporciones, para analizar la relación dosis-respuesta se encontró un aumento de la frecuencia vinculado al aumento de la dosis.

Estos resultados positivos indican que bajo las condiciones probadas el extracto de la corteza o de *T. indica* L. es genotóxico en ratones ya que produjo un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de la médula ósea en todas las dosis evaluadas, encontrándose un aumento de la frecuencia vinculado al aumento de la dosis. Ya en 1986 Yadav reportó que *T. indica* L. tenía efecto mitodepresivo y mitoclastógeno, ya que inhibía la mitosis e inducía aberraciones cromosómicas ²². Por otra parte los resultados del test antimitótico de inhibición del ensamblaje/desensamblaje de la tubulina indican que este extracto puede considerarse un posible inhibidor de la mitosis ³.

Más información puede derivarse de los ensayos de actividad antioxidante desarrollados en el extracto mostrando que tiene potencialidades como reductor del radical DPPH e inhibidor de la peroxidación lipídica. Entre los componentes mayoritarios del extracto de *T. indica* L se encuentran los taninos y los fenoles que han sido reportado con actividad antioxidante ²³; adicionalmente se reportan propiedades antioxidantes en la semilla producto de la presencia de (-) epicatequina y (+) catequina encontradas mayoritariamente en las mismas ²⁴, así como propiedades antioxidantes de un polifenol flavonoide extraído de la semilla que inhibe la producción de oxido nítrico en macrófagos murinos *in vitro* e *in vivo* ²⁵.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Attiso, M.A. (1978) *Profit scientifique rationnel des médications traditionnelles des pays en voie de développement en vue d'une Phytothérapie renouvelée*. Documento OMS. DPM/78. Ginebra, OMS.
2. World Health Organization (2000) *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*. Geneva.
3. Piloto J., A. Vizoso, A. Ramos, A. García, M. Guerra, M.L. González., C. Carballo & C. Rodríguez (2004) II Simposium Internacional de plantas medicinales y Fitoterapia. Perú.
4. Gaskin, F., C.R. Cantor & M.L. Shelanski (1974) *J. Mol. Biol.* **89**: 737-55.
5. Martindale, W. (1993) "Martindale: The Extra pharmacopoeia", 30th Edn. London. The Pharm. Press, pp. 909-10.
6. Robineau, L. & B. Weniger (1995) Seminario TRAMIL 7 Antioquia, 619-20.
7. Roig, J.T. (1988) "*Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba*". La Habana: Editorial Ciencia y Técnica, pp. 128-9.
8. Martin, E.W. & E.F. Cook (1961) "*Remington's Practice of Pharmacy*" 12th Mack Publishing, Easton, pp. 377-80.
9. Soler, B., G. Méndez, M. García & M. Miranda (1992) "*Normas Ramales. Medicamentos de Origen Vegetal. Tinturas y Extractos Fluidos*". Ministerio de Salud Pública, Ciudad de La Habana, pp. 1-13
10. Maron, D.M. & B.N. Ames (1983) *Mutat. Res.* **113**: 173-215.
11. Gatehouse D., S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohmi, T. Ohta, S. Venitt & E. Zeiger (1994) *Mutat. Res.* **312**: 217-33.
12. OECD (1994) "*Guidelines for genetic toxicology*". Publisher by OECD París.
13. OECD (1998) "*Ninth Addendum to the testing of chemicals*". Norma 471.
14. Mortelmans, K. & E. Zeiger (2000) *Mutat. Res.* **455**: 29-60.
15. Hayashi M, R. Tice, J.T. MacGregor, D. Anderson, D.H. Bladey, M. Kirsh-Volders, F.B. Oleson Jr, F. Pacchierotti, F. Romagna, H. Shimada, S. Sutou & B. Vannier (1994) *Mutat. Res.* **312**: 293-304.
16. Mavournin K.H., D.H. Blakey, M.C. Cimino, M.F. Salamone & J. Heddle. (1990) *Mutat. Res.* **239**: 29-80.
17. Ramos A, A. Villaescusa & A. Vizoso (1996) *Rev. Cub. Plant. Med.* **2**: 35-8.
18. Navarro M.C., M.P. Montilla, A. Martín, J. Jiménez & M.P. Utrilla (1992) *Planta Med.* **59**: 312-4
19. Ramos A., R. Rivero, M.C. Victoria, A. Vizoso, J. Piloto & A. García (2001) *J. Ethnopharmacol.* **77**: 25-30.
20. Jodynis-Liebert, J., M. Murias & E. Bloszyk (1999) *Planta Med.* **65**: 320-4.
21. Arimoto-Kobayashi S, M. Machida, K. Okamoto & A. Yamaguchi (2005) *Mutagenesis* **20**: 229-33.
22. Yadav, S.K. (1986) *J. Trop. Forestry* **2**: 53-8.
23. Duke, J.A. (2005) Phytochemical Database, USDA - ARS - NGRl, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland.
24. Sudjaroen Y, R. Haubner, G. Wurtele, W.E. Hull, G. Erben, B. Spiegelhalder, S. Changbumrung, H. Bartsch & R.W. Owen (2005) *Food Chem. Toxicol.* **43**: 1673-82.
25. Komutarin T., S. Azadi, L. Butterworth, D. Keil, B. Chitsomboon, M. Suttajit & B.J. Meade (2004) *Food Chem. Toxicol.* **42**: 649-58.