

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos  
Departamento de Investigaciones Microbiológicas

## ESTUDIO TOXICOGENÉTICO DE UN EXTRACTO FLUIDO DE *OCIMUN BASILICUM* L. (ALBAHACA BLANCA)

Lic. Arilia García López,<sup>1</sup> Lic. Ángel Vizoso Parra,<sup>2</sup> Lic. Alberto Ramos Ruiz,<sup>3</sup> y Lic. Janet Piloto<sup>4</sup>

---

### Resumen

Se presentan los resultados obtenidos al evaluar el potencial toxicogenético de un extracto fluido con un mensturo etanólico al 70 % de *Ocimum basilicum* L. en 3 sistemas de ensayos a corto plazo, se emplean 2 modelos *in vitro* el sistema Salmonella/microsoma (*Ames*) y el de segregación mitótica con el hongo diploide *Aspergillus nidulans* D-30 y otro *in vivo* que utiliza el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón. En el ensayo de *Ames* se observó una respuesta positiva con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA-98 con activación metabólica en el rango de concentraciones de 1 500 y 5 000 µg/placa y TA-1535 sin activación metabólica en el rango de concentraciones de 50, 150, 500 y 1 500 µg/placa. En el ensayo de segregación mitótica, se evaluaron concentraciones desde 0,005 a 1,00 mg de sólidos totales/mL, sin detectar aumentos significativos concentración-dependiente en la Frecuencia de Sectores Segregantes por Colonias (FSC). En el ensayo de inducción de micronúcleos se ensayaron dosis de 500, 1 000 y 2 000 mg/kg de peso corporal (pc). Los resultados obtenidos demuestran que el extracto de *Ocimum basilicum* L. fue mutagénico en el sistema Salmonella/microsoma, moderadamente citotóxico en el ensayo de segregación mitótica sin mostrar daño genético en esta prueba. En el ensayo *in vivo* no se observó respuesta genotóxica en las dosis estudiadas.

Descriptores DeCS: PLANTAS MEDICINALES/genética; PLANTAS MEDICINALES/toxicidad; EXTRACTOS VEGETALES; ASPERGILLUS NIDULANS/genética; SALMONELLA TYPHIMURIUM; RATONES; MEDICINA HERBARIA; ALBAHACA/genética; ALBAHACA/toxicidad; TESTS DE MUTAGENICIDAD; TESTS DE MICRONUCLEOS.

### Summary

The results obtained on evaluating the toxicogenetic potential of a fluid extract with an ethanol menstruum 70 % of *Ocimum basilicum* L. in 3 systems of short-term tests are presented. 2 *in vitro* models were used: the Salmonella/microsome system (*Ames*) and that of mitotic segregation with the *Aspergillus nidulans* D-30 fungus. Another *in vivo* model that uses the micronucleus induction test in mouse bone marrow was also included. A positive response was observed in the Ames' test with the strains of *Salmonella typhimurium* TA-98 with metabolic activation in the range of concentrations of 1 500 and 5 000 µg/plate and TA-1535 without metabolic activation in the range of concentrations of 50, 150, 500 and 1 500 µg/plate. Concentrations from 0,005 to 1,00 mg of total solids/mL were evaluated in the mitotic segregation test. No significant concentration-depending increases were found in the Frequency of Segregating Sectors by Colonies (FSC). In the micronucleus induction test, doses of 500, 1 000 and 2 000 mg/kg of body weight were assayed. The results showed that the extract of *Ocimum basilicum* L. proved to be mutagenic in the Salmonella/microsome system and moderately cytotoxic in the mitotic segregation test. No genetic damage was detected in this assay.

Subject headings: PLANTS, MEDICINAL/genetic; PLANTS, MEDICINAL/toxicity; PLANT EXTRACTS; ASPERGILLUS NIDULANS/genetic; SALMONELLA TYPHIMURIUM; MICE; MEDICINE, HERBAL; ALBAHACA/genetic; ALBAHACA/toxicity; MUTAGENICITY TESTS; MICRONUCLEUS TESTS.

---

<sup>1</sup> Licenciada en Microbiología.

<sup>2</sup> Licenciado en Biología. Investigador Auxiliar.

<sup>3</sup> Licenciado en Bioquímica. Investigador Auxiliar.

<sup>4</sup> Licenciada en Biología.

Dentro de los estudios farmacológicos y toxicológicos comprendidos en el Proyecto de Validación del uso tradicional de Plantas Medicinales utilizadas como antimicrobianas y/o antiparasitarias desarrolladas en el CIDEM, los estudios toxicogenéticos, que se encargan de investigar la probable inducción de daño genético, como consecuencia de los cuales pueden ocasionar enfermedades, tales como desarrollo de procesos tumorales, transmisión de alteraciones genéticas a la descendencia y malformaciones congénitas, ocupan un lugar imprescindible en la evaluación de los fitofármacos con actividad terapéutica reconocida.<sup>1-3</sup>

La albahaca blanca (*Ocimum basilicum* L.) es una planta perteneciente a la familia *Lammiaceae*, es una especie de planta empleada en la medicina tradicional como antiespasmódica, carminativa, y antihipocondríaca; la infusión de sus hojas se administra como remedio contra catarros y disentería, además se atribuyen propiedades vermífugas, antieméticas y estimulantes de la secreción mamaria.<sup>4,5</sup>

Farmacológicamente se le reporta actividad antibacteriana sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Trychoophyton mentagrophytes*. Su aceite esencial es activo sobre los gérmenes Gram positivos y negativos (Alcalde Perez JC, Actividad antimicrobiana *in vivo* de las especies vegetales *Cymbopongo citratus* L. y *Ocimum basilicum* L. Trabajo de Diploma. Universidad de La Habana. Facultad de Biología). Esta planta es natural del Sur de Arabia, introducida en Europa desde el siglo XVI. Es cultivada en Cuba en patios y jardines como hierba aromática.<sup>4</sup>

Con el objetivo de determinar si el extracto fluido con un menstuo estanoico al 70 % de *Ocimum basilicum* L. tiene acción genotóxica, se emplearon 3 sistemas de ensayo: la prueba de Salmonella/microsoma (*Ames*), que detecta mutaciones génicas, el ensayo de segregación mitótica en diploides heterocigóticos de *Aspergillus nidulans*, que mide inducción de recombinación mitótica y malasegregación cromosómica *in vitro* y el ensayo de inducción de micronúcleos que detecta daño genético por agentes clastogénicos y aneugénicos *in vivo*.

## Métodos

### MATERIAL VEGETAL

La planta se cultivó en la Estación Experimental de Plantas Medicinales "Dr. Juan Tomás Roig", Güira de Melena, La Habana y se colectó en Enero de 1998. Un ejemplar de la planta se conserva en el herbario de dicha institución con el número Roig 4635. Para preparar el extracto fluido se empleó etanol al 70 % como menstuo.<sup>6</sup> Las especificaciones del extracto fluido son las siguientes: etanol 62,72 %, sólidos totales 50 mg/mL, pH 5,65 y aceite 0,136 %. El aceite esencial mayoritario es el metilcharvacol, aunque también se reporta el linalol, además contiene taninos, ácidos orgánicos, saponinas y sales minerales.<sup>7</sup>

### ENSAYO DE SALMONELLA/MICROSOMA (*AMES*)

Se empleó una batería de 4 cepas de *Salmonella typhimurium*, TA-1535, TA-1537 y TA-98 y TA-100, donadas por el Dr. Bruce N Ames (Universidad de California en Berkeley, USA). El etanol fue eliminado por presión reducida y el sólido residual se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO). Se empleó el método de incorporación en placa con un protocolo de trabajo bien estandarizado.<sup>8</sup> Se ensayaron concentraciones de 50, 150, 1 500 y 5 000  $\mu$ /placa de sólidos totales, sembrándose 3 placas por concentración en un experimento único. El ensayo se realizó en presencia y ausencia de activación metabólica exógena, que contenía 4 % de fracción S9 en solución de co-factores,<sup>9</sup> obtenida a partir de hígado de ratas tratadas con fenobarbital y 5,6 naftoflavona.<sup>10</sup> 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 SANALAL (Salmonella Assay Analysis. Versión 1. US Environmental Protection Agency).

### ENSAYO DE SEGREGACIÓN MITÓTICA EN *ASPERGILLUS NIDULANS* D-30

Se empleó la cepa *Aspergillus nidulans* D-30,<sup>11</sup> obtenidas de los haploides A593(a) y A594(b) procedentes del *Fungal Genetic Stock Center* (FGSC), Atlanta, USA. El medio empleado fue Medio Completo (MC).<sup>12</sup> La cepa *Aspergillus nidulans* D-30 es heterocigótica para 4 marcadores recesivos del color de los conidios. Las mutaciones presentes en la cepa son las siguientes: yA(Ia)= amarillo; wA2(IIb) = blanco; fwA2(VIIIa)= amarillo-carmelita; chaA1(VIIIb) = verde chartré. La presencia de eventos genéticos, como recombinación mitótica y la no-disyunción cromosómica se manifiesta a través de la segregación en estado homocigótico de aquellos marcadores recesivos para el color de los conidios y la consiguiente aparición de sectores coloreados, fácilmente distinguible por inspección ocular sobre un fondo de conidiación correspondiente a la cepa salvaje.<sup>11</sup> Se siguió un protocolo experimental de exposición crónica en MC agarizado donde se sembraron los conidios en punto al centro de las placas y se incubaron durante 72 h a 37 °C para determinar la toxicidad cuantitativa (IT %) del extracto fluido, evaluándose el por ciento de reducción del diámetro de las colonias en relación al control negativo. La acción genotóxica se evaluó en términos de frecuencia de sectores segregantes de color de los conidios (FSC), marcadores recesivos en condición homocigótica, para cada concentración ensayada.<sup>13</sup> Se ensayaron concentraciones hasta 1,00 mg/mL de sólidos totales. El control negativo empleado fue etanol al 62,72 %, a una concentración final en el MC de 1,2 % v/v. El control positivo fue el metilmetanosulfonato 2,4 mm. Para el análisis estadístico los datos primarios (sectores por colonias) se normalizaron aplicando la fórmula  $\sqrt{(0,5 + X)}$ , posteriormen-

te se le aplicó un Anova simple, y se utilizó el paquete estadístico MICROSTA.

## ENSAYO DE INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS

El extracto fluido del *Ocimum basilicum* L., llevado a sequedad a presión reducida se resuspendió en etanol al 60 % para obtener una concentración de 200 mg/mL de sólidos totales en el momento de la administración a los animales. Se emplearon ratones albinos de la línea no isogénica Suizo, procedentes del Laboratorio de Control Biológico del CIDEM, con un peso promedio de  $28,26 \pm 2,36$  g y con 6 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 ración peletizada y agua sin restricción. Se establecieron 5 grupos experimentales: control negativo (etanol al 60 %), un control positivo (ciclofosfamida, 20 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).<sup>14,15</sup> Cada grupo estuvo representado por 10 animales, 5 de cada sexo. 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.<sup>16</sup> 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. Se empleó el paquete estadístico MICROSTA.

## Resultados

En la tabla 1 se muestran los resultados del ensayo de Salmonella/microsoma. Como puede apreciarse, hasta valores de 5 mg/placa (valor que se acepta como máximo de exposición en dependencia de la solubilidad del producto y de la toxicidad,<sup>17</sup> se observa para la cepa TA-98, con activación metabólica y la TA-1535, sin activación metabólica; un incremento significativo ( $p = 0,001$  y  $P = 0,003$ ) en la frecuencia de colonias revertantes por placa a las concentraciones de 1 500 y 5 000 y 50, 150, 500 y 1 500  $\mu\text{g/placa}$ , respectivamente (parámetro indicador de mutagenicidad para este ensayo).

**TABLA 1.** Resultados del ensayo de Ames frente al crudo de *Ocimum basilicum* L.

Concentración $\mu\text{g/placa}$	Colonias revertantes/placa $\pm$ D.S.			
	TA-98		TA-100	
	(- S9)	(+ S9)	(- S9)	(+ S9)
0 <sup>a</sup>	40,33 $\pm$ 11,35	44,00 $\pm$ 4,58	206,67 $\pm$ 5,86	245,33 $\pm$ 3,00
50	36,67 $\pm$ 5,03	45,33 $\pm$ 5,13	198,67 $\pm$ 5,13	46,33 $\pm$ 4,73
150	50,33 $\pm$ 9,07	50,07 $\pm$ 9,01	88,33 $\pm$ 40,07	252,00 $\pm$ 7,21
500	40,67 $\pm$ 3,79	61,67 $\pm$ 7,64	177,33 $\pm$ 22,81	257,43 $\pm$ 18,88
1 500	62,00 $\pm$ 5,29	77,00 $\pm$ 13,75*	68,67 $\pm$ 5,69	255,33 $\pm$ 25,58
5 000	60,33 $\pm$ 5,50	123,33 $\pm$ 5,03**	45,67 $\pm$ 14,36	173,33 $\pm$ 14,98
Control positivo <sup>b</sup>	984 $\pm$ 64,00**	2 763,33 $\pm$ 75,06**	634,67 $\pm$ 48,88**	2 029,33 $\pm$ 232,18**

  

Concentración mg/placa	Colonias revertantes/placa $\pm$ D.S.			
	TA-1535		TA-1537	
	(- S9)	(+ S9)	(- S9)	(+ S9)
0 <sup>a</sup>	9,33 $\pm$ 1,53	18,00 $\pm$ 2,00	15,00 $\pm$ 3,61	18,00 $\pm$ 2,00
50	14,67 $\pm$ 1,53*	15,00 $\pm$ 1,00	14,67 $\pm$ 3,51	15,00 $\pm$ 1,00
150	17,33 $\pm$ 2,08*	19,33 $\pm$ 7,57	13,00 $\pm$ 3,00	19,33 $\pm$ 7,57
500	16,67 $\pm$ 1,53*	10,67 $\pm$ 1,53	18,00 $\pm$ 2,65	10,67 $\pm$ 1,53
1 500	18,67 $\pm$ 7,51*	22,00 $\pm$ 5,57	17,67 $\pm$ 2,52	22,00 $\pm$ 5,57
5 000	8,67 $\pm$ 2,08	18,57 $\pm$ 3,57	16,67 $\pm$ 2,31	18,67 $\pm$ 3,51
Control positivo <sup>b</sup>	520,00 $\pm$ 65,48**	896,00 $\pm$ 55,43**	1 963,33 $\pm$ 497,22**	894,67 $\pm$ 147,09**

<sup>a</sup> Control negativo: Dimetilsulfóxido (DMS).

<sup>b</sup> Control positivo: TA-1535 (-S9) ázida de sodio, 1,5  $\mu\text{g/placa}$ ; (+S9) ciclofosfamida, 500  $\mu\text{g/placa}$ .

TA-1537 (-S9)9-aminoantraceno, 100  $\mu\text{g/placa}$ ; (+S9)2 aminofluoreno, 100  $\mu\text{g/placa}$ .

TA-98 (-S9) ácido picrolónico, 100  $\mu\text{g/placa}$ ; (+S9) 2-aminofluoreno, 10  $\mu\text{g/placa}$ .

TA-100 (-S9) ázida de sodio, 1,5  $\mu\text{g/placa}$ ; (+S9), benzo(a) pireno, 10 Anova:  $p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$ .

**TABLA 2.** Resultados de la segregación somática en el hongo *Aspergillus nidulans* D-30 frente a un extracto fluido de *Ocimum basilicum* L. con un menstuo etanólico al 70 %

Concentración mg/mL	Colonias	Toxicidad <sup>a</sup> (IT %)	Genotoxicidad			
			Colonias	Sectores Segregantes	FSC	ISMI <sup>b</sup>
Etanol						
1,2 % <sup>c</sup>	24	-	44	73	1,66	-
0,005	24	03	41	89	2,17	1,31
0,05	24	-1,00	41	93	2,27	1,37
0,15	24	0,00	38	82	2,16	1,30
0,30	24	6,00	37	57	1,54	0,93
0,45	24	9,00	38	66	1,74	1,05
0,75	24	13,00	37	59	1,59	0,96
1,00	24	16,00	41	76	1,85	1,11
Metilmetano <sup>d</sup>	24	37,00**	43	343	7,98**	4,81**
Sulfonato 2,40 mm						
Espontáneo	16	- 3,75	28	32	1,14	0,69

<sup>a</sup> Reducción del diámetro de las colonias las 72 h de incubación respecto al control negativo.

<sup>c</sup> Control negativo.

<sup>b</sup> Índice de Segregación Mitótica Inducida.

<sup>d</sup> Control positivo.

Ecuación del IT: IT = 16,95 (conc.) - 0,0774; r = 0,979; P = 1,15 H 10<sup>-4</sup>

\*\* p < 0,01.

Ecuación de la FSC: FSC = 1,98 (conc.) - 0,241; r = 0,439; P = 0,277

**TABLA 3.** Ensayo de micronúcleos en ratones tratados con un extracto de *Ocimum basilicum* L. con un menstuo etanólico al 70 %

Dosis (mg/kg/día)	Sexo <sup>a</sup>	PCE/NCE (media ± DS)	MNPCE/1 000 PCE (media ± DS) <sup>b</sup>
Etanol	M	1,55 ± 0,19	1,80 ± 0,27
	F	1,55 ± 0,13	2,40 ± 0,22
500	M	1,45 ± 0,22	1,60 ± 0,23
	F	1,54 ± 0,99	2,10 ± 0,22
1 000	M	1,53 ± 0,10	1,30 ± 0,18
	F	1,65 ± 0,20	1,20 ± 0,11
2 000	M	1,64 ± 0,18	1,80 ± 0,17
	F	1,51 ± 0,11	1,90 ± 0,26
CP 20 <sup>d</sup>	M	0,67 ± 0,06	20,50 ± 0,71**
	F	0,65 ± 0,04	22,50 ± 0,00**

<sup>a</sup> M, machos; F, hembras.

\*\* p < 0,01 (t-Student).

<sup>b</sup> PCE micronucleados.

Cochran-Armitage, p = 0,40 (M)

<sup>c</sup> Control negativo

Cochran-Armitage, p = 0,82 (F)

<sup>d</sup> Ciclofosfamida, control positivo.

Los resultados del ensayo de segregación mitótica con el hongo diploide *Aspergillus nidulans* D-30, aparecen en la tabla 2. Como se observa se presenta una toxicidad moderada, concentración-dependiente (hasta 1,00 mg de sólidos totales/mL). Sin embargo, no se observó un incremento significativo (P = 0,548) en la frecuencia de sectores por colonias (FSC) que es el indicador de daño genético.

Los resultados del ensayo de inducción de micronúcleos (*in vivo*) aparecen en la tabla 3. No se observaron incrementos significativos para la relación PCE/NCE

(indicadora de citotoxicidad medular), ni para ratones machos (P= 0,517), ni para ratones hembras (P= 0,432). El valor del por ciento de eritrocitos policromáticos (% MNPCE) parámetro de daño clastogénico y aneugénico no presentó diferencias significativas con respecto al control negativo, ni para ratones machos (P= 0,655) ni para ratones hembras (P= 0,309). Tampoco el estadígrafo *Cochran-Armitage* para pruebas de tendencias en las proporciones lineales en el valor de MNPCE respecto a las dosis estudiadas demostró resultados significativos en cada caso (P<sub>machos</sub> = 0,389; P<sub>hembras</sub> = 0,824).<sup>18</sup>

## Discusión

Los resultados del presente experimento indican que el extracto fluido con un menstruo estanoico al 70 % de *Ocimum basilicum* L. contiene compuestos que causan mutaciones puntuales, ya sea por corrimiento del marco de lectura por delección (cepa TA-98) o por sustitución de pares de bases (cepa TA-1535). Estas observaciones no concuerdan con lo reportado para extractos clorofórmicos y metanoicos en los cuales no están presente genotoxinas que induzcan mutaciones génicas.<sup>19</sup> En este extracto hidroalcohólico de la albahaca blanca se detectaron taninos que pueden estar asociados a saponinas, a los ácidos orgánicos y a los aceites esenciales, etc. Se reporta que compuestos con grupos taninos están relacionados con la inducción de cáncer de esófago,<sup>20</sup> pero también con mecanismos antimutagénicos y anticarcinogénicos relacionados con la actividad oxidativa.<sup>21</sup> Estos taninos pueden inducir una acción reparativa por medio del mecanismo de escisión en el ADN dañado en presencia del proceso de metabolización, pero en ausencia de este, dicho mecanismo puede inhibirse y tal reparación resultaría en un efecto co-mutagénico.<sup>22</sup> Se podría pensar también que las saponinas asociadas a los taninos mostraran patrones de respuestas mutagénicas no esperadas o que el aceite esencial mayoritario induzcan estos efectos genotóxicos en este sistema de ensayo.

Esta respuesta positiva en el sistema Salmonella/microsoma, también puede estar relacionada a la acción conjunta de dichos compuestos como un todo, donde el sinergismo, antagonismo, aditividad y las interacciones entre efectos mutagénicos y antimutagénicos, pueden conducir a respuestas muy específicas de cada una de las mezclas complejas de que está constituido el extracto fluido del *Ocimum basilicum*.

La citotoxicidad observada en el ensayo de segregación mitótica en el hongo *Aspergillus nidulans* D-30 frente al extracto fluido de *Ocimum basilicum* L. a las concentraciones ensayadas (máxima de 1,00 mg/mL) está atribuida a los aceites esenciales. Esta citotoxicidad no está relacionada a daño genético, sino a otras moléculas dianas relacionadas a mecanismos bioquímicos complejos del ciclo celular. Se ha reportado que compuestos como la nistatina, el carboxín y la cicloheximina influyen en el crecimiento micelial pero no interaccionan con el material hereditario.<sup>23</sup> La ausencia de daño genético en este ensayo hace pensar que se está en presencia de genotoxinas que no inducen recombinación genética, no disyunción cromosómica o efectos clastogénicos que causen desequilibrio cromosomal.

El resultado negativo obtenido en el ensayo *in vivo* de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón demuestra que la genotoxina(s) que provocó la mutación génica en el ensayo de Salmonella/microsoma no induce ningún efecto clastogénico ni aneugénico en el mamífero, pues estos poseen mecanismos detoxificadores (fase II) representados por sistemas enzimáticos presentes en el hígado, pulmones y sistema gastrointestinal responsable de la inactivación del

agente mutagénico presente en el extracto fluido de *Ocimum basilicum* L.<sup>24</sup> Se recomienda realizarle el estudio mutagénico al aceite esencial de la planta, pues no existen reportes en la literatura al respecto.

## Referencias bibliográficas

1. Madrigal-Bujaidar E, Barriga D, Mata P, Guzmán R, Cassani M. Sister chromatid exchange induced in vitro and in vivo by extract of Black pepper. *Food Chem Toxicol* 1997;35:567-71.
2. Ramos A, Edreira A, Vizoso A, Betancourt J, López M, Décalo M. Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. *J Ethnopharmacol* 1998;61:49-55.
3. Ames NA. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 1983;221:1256-64.
4. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1988:125.
5. Duraffourd C, Hervicourt D, Lapraz C. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. Barcelona: Masson, 1986:75-80.
6. Soler B, Menéndez G, García M, Miranda M. Normas Ramales. Medicamentos de origen vegetal. Tinturas y extractos fluidos. La Habana. Ministerio de Salud Pública, 1992.
7. FITOMED Plantas Medicinales. La Habana: Editora Ciencias Médicas, 1991:10-1.
8. Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, et al. Report from working group on bacterial mutation assays: International Workshop on Standardization of Genotoxicity by Test Procedure. *Mutat Res* 1994;312:217-33.
9. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 1983;113:173-215.
10. Matsushima T, Sawamura M, Hara K, Sugimuta T. A safe substitute for polychlorinated biphenols as an inducer of metabolic activation system. En: De Serres FJ, Font JR, Bend JR, Philpot RM. eds. *In vitro* metabolic activation in mutagenesis testing. Amsterdam: Elsevier, 1976:85-8.
11. Käfer E. Test which distinguish induced crossing-over and aneuploid from secondary segregation in *Aspergillus nidulans* treated with chloral hydrate and gamma rays. *Mutat Res* 1986;164:143-66.
12. Scott BR, Käfer E. *Aspergillus nidulans*-an organism for detecting a range of genetic damage. En: De Serres FJ, Hollaender A. eds. *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection*. New York: Plenum, 1982:447-79.
13. Torre RA de la, Rúa R de la, Hernández G, Espinosa J, Cortinas de Nava C. Genotoxic effects of niclosamide in *Aspergillus nidulans*. *Mutat Res* 1989;222:337-41.
14. Hayashi M, Tice R, MacGregor JT, Anderson D, Bladley DH, Kirsh-Volders M, et al. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res* 1994;312:293-304.
15. Mavourin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle J. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US EPA Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1990;239-80.
16. Ramos A, Villaescusa A, Vizoso A. Ausencia de genotoxicidad en extractos fluidos de *Ortosiphon aristatus* Blume (té de riñón) y *Lepidium virginicum* L. (mastuerzo). *Rev Cubana Plant Med* 1996;2:35-8.
17. Gatehouse D, Howorth S, Cebula T. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutt Res* 1994;312:217-33.
18. Lovell D, Albanese R, Clare G. Statistical analysis of *in vivo* cytogenetic assays. En: Kirland K DL, ed. *Statistical evaluation of mutagenicity test data*. Cambridge: University, 1989:184-230.
19. Rocwell P, Raw I. A antimutagenic screening of various herbs, spices and food additives. *Nutr Cancer* 1979;1:10-5.
20. Morton JF. Search for carcinogenic principles. En: *Recent advances in phytochemistry*. Swain T, Klerman R, eds. Plenum, 1980;14:53-73.

21. Kada T, Kaneko K, Matsuzaki T, Matsuzaki S, Hara Y. Detection and chemical identification of natural bioantimutagens. A case of the green tea factor. *Mutat Res* 1985;150:127-32.
22. De Sá Ferreira Fernández IC, Ferrao Vargas V. Mutagenicity of medicinal plants extracts in Salmonella/microsoma assay. *Phytotherapy* (en prensa).
23. Georgopoulos SG, Kappas A, Hastie AC, Induced sectoring in diploid *Aspergillus nidulans* as criterion of fungitoxicity by interference with hereditary processes. *Phytopathology* 1976;66:217-20.
24. Sharma DS. Plant extracts as modulators of genotoxic effects. *Botanic Rev* 1996;62(4):276-91.

Recibido: 28 de febrero del 2000. Aprobado 7 de mayo del 2000.  
Lic. *Arilia García López*. Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave 26 No. 1605 e/ Cerro y Boyeros. Plaza. Ciudad de La Habana. CP 10600.