



SECCION ARTICULO ORIGINALES
REVISTA CENTRO DE ESTUDIOS EN SALUD
Año 5 Vol 1 No. 6 (Pags. 13 -21)

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In vitro* DE EXTRACTOS DE
Carica candamarcensis SOBRE AISLAMIENTOS DE *Helicobacter pylori***
Jaqueline Mena Huertas¹, Maria Clara Yépez Chamorro², Ayda Santacruz³, Elkin Noguera⁴

Recibido Junio 24 - 05 Enviado para evaluación Junio 30 - 05 Aceptado Agosto 27 - 05

RESUMEN

Diversos estudios demuestran que la presencia de infección con *Helicobacter pylori* está fuertemente asociada con úlceras pépticas y cáncer gástrico, el tratamiento terapéutico convencional se basa en el uso de antibióticos; sin embargo, frecuentemente se desarrolla resistencia a los medicamentos como consecuencia del uso indiscriminado de ellos. Para contribuir con la búsqueda de soluciones a este problema se planteó la necesidad de buscar alternativas en el tratamiento a través de la evaluación del efecto *in vitro* de extractos de pulpa y semilla de *Carica candamarcensis* sobre poblaciones de *H. pylori*. Para ello se obtuvo cuatro tipos de extractos: acuoso de pulpa y semilla y aceite esencial de pulpa y semilla mediante hidrodestilación asistida por radiación con microondas; la evaluación de antibiosis se realizó por el método de difusión en placa en Agar Columbia suplementado con sangre de cordero al 8% utilizando sensidiscos impregnados con 1.5 µl de cada extracto. A pesar de que todos los extractos presentaron algún grado de actividad, el análisis de varianza y la prueba de medias de Tukey evidencian que el aceite esencial de pulpa tiene efecto inhibitorio significativamente mayor sobre las poblaciones de *H. pylori*. El análisis químico del aceite esencial de pulpa demuestra la presencia de compuestos como octanol, linalool, farnesol y decanoato de butilo, ésteres y derivados que pueden estar asociados con la actividad biológica reportada; por esta razón, se recomienda ampliar los estudios con aceite esencial de pulpa de *C. candamarcensis*

PALABRAS CLAVE: *Carica candamarcensis*, extractos vegetales, aceites esenciales, *Helicobacter pylori*, efecto antibacterial

¹ Docente Tiempo completo. Categoría Asistente. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad de Nariño. sajamena@udenar.edu.co

² Docente Tiempo Completo. Categoría Asociado. Facultad de Ciencias de las Salud. Directora Centro de Estudios en Salud CESUN. Universidad de Nariño. cesun@udenar.edu.co

³ Bióloga egresada Universidad de Nariño. aydilar0677@latinmail.com

⁴ Estudiante de Biología. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad de Nariño. enoguera21@hotmail.com

ABSTRACT

Several studies show that the presence of *Helicobacter pylori* is strongly associated with peptic ulceration and gastric cancer, the conventional therapeutic treatment is based on the use of antibiotics; however, antibiotic drug resistance frequently develops as a consequence of such treatment. This panorama sets up the need of searching for some alternatives in the treatment, because of which there is the proposal of evaluate the In vitro effect of *Carica candamarcensis* fruit were obtained: aqueous extracts of pulp, aqueous extracts of seed an essential oil of pulp an seed through hydrodistillation attend by radiation with microwaves; the evaluation of antibiosis was achieved using the diffusion in plate in Agar Columbia supplemented with lamb blood in 8% using sensidiscs saturated with 1,5 µl of each extract. The ANOVA and the proof of media of Tukey make evident that the essential oil of pulp had the highest inhibitory effects against *H. pylori*; the chemical analysis show the presence of compounds such as: octanol, farnesol and butyl decanoato, esters and derivates that can be associated with the reported biological activity; that's why is recommended to extend the studies with essential oil of pulp of *C. candamarcensis*.

KEY WORDS: *Carica candamarcensis*, plant extracts, essential oil, *Helicobacter pylori*, Antibacterial effect

INTRODUCCIÓN

La infección de la mucosa gástrica por *Helicobacter pylori* es la más frecuente en los seres humanos después de la caries dental y esta relacionada con diferentes enfermedades gástricas como úlcera péptica, gastritis crónica, cáncer gástrico entre otras,⁽¹⁾ además de algunas enfermedades cardiovasculares, autoinmunitarias, anemia ferropénica, urticaria, retraso en el crecimiento, entre otras, en las cuales la erradicación de *H. pylori* resulta en una significativa remisión de estas enfermedades.⁽²⁾

Existen varios factores asociados a la incidencia de la infección de *H. pylori* y desarrollo de cáncer gástrico como edad, tipo sanguíneo, ubicación geográfica, nivel de desarrollo socioeconómico, hacinamiento entre otros, que han determinado que exista una mayor prevalencia de la infección en países en vía de desarrollo.⁽³⁾ Estudios realizados en el Departamento de Nariño han reportado una alta incidencia de la infección y la recurrencia de cáncer gástrico sobre todo en la zona andina; *H. pylori* se ha encontrado principalmente en personas de bajo desarrollo socioeconómico, donde las condiciones de higiene ambiental, el manejo de aguas y excretas

no son las más adecuadas; además por ser una zona volcánica hace que se presente un medio ambiente con alto contenido de nitratos en las aguas del subsuelo y en la dieta, hay marcada disminución de agentes antioxidantes como β carotenos y vitamina E, baja ingesta de potasio, grasas, proteínas animales, legumbres, frutas frescas y alta ingesta de sal, generando un ambiente intragástrico que favorece el crecimiento bacteriano y la formación de compuestos N-nitrosos ampliamente reconocidos como carcinógenos.^(4,5)

Teniendo en cuenta la importancia de la bacteria, se han implementado un serie de terapias agresivas (combinación de un inhibidor de la bomba de protones, un compuesto a base de bismuto y 2 o tres antibióticos) con el fin de lograr la erradicación de la misma, estas terapias "triples o cuádruples" han sido exitosas entre un 80 a un 90% sin embargo, el aborto de terapias ha sido recurrente en primer lugar, por los efectos secundarios de estas y en segundo lugar por la interrupción debido a los altos costos, sobre todo si se tiene en cuenta que la población principalmente afectada corresponde a personas de bajos recursos económicos; esto ha

generado una marcada resistencia a los antibióticos usados en el tratamiento.^(6,7) Por esta razón, actualmente se adelantan varios estudios con el fin de buscar terapias complementarias que ayuden a disminuir los efectos de la terapia convencional, tal es el caso de estudios con probióticos, dietas ricas en antioxidantes y extractos de diversas plantas^(8,9,10).

En este estudio se buscó evaluar el efecto *in vitro* del extracto acuoso y aceite esencial de pulpa y semilla de *Carica candamarcensis* (papayuela, chilacuan, papaya de altura) sobre poblaciones de *H. pylori*, teniendo en cuenta que en la cultura popular se le han reportado muchas propiedades terapéuticas como eliminar hematomas, verrugas, en el tratamiento de arteriosclerosis y amigdalitis entre otras; por otro lado, los reportes literarios indican además que estudios realizados con el látex de la planta demuestran actividad mitogénica tanto *in vitro* como *in vivo* (en recuperación de quemaduras en pacientes diabéticos), y una actividad proteasa utilizada en procesos de extracción y purificación de ADN.⁽¹¹⁾ *C. candamarcensis* es probablemente originaria de los Andes de la América Meridional, Colombia o Perú y se distribuye desde Panamá hasta los Andes de Bolivia y parte de Chile, se encuentra espontánea en el Ecuador y Colombia, en los climas fríos entre los 2000 y 3000 m.s.n.m., con lluvias de 500 a 1200 mm por año.^(12,13)

MATERIALES Y METODOS

Preparación de los extractos vegetales

Para obtener una muestra representativa de la población vegetal, la recolección de los frutos maduros se realizó siguiendo el modelo de muestreo aleatorio simple en un cultivo casero de 15 árboles en total, a partir de los cuales fueron colectados al azar 150 frutos (aproximadamente 10 por cada árbol) de color semejante (amarillo) y tamaño variable, posteriormente se empacaron en bolsas plásticas para su transporte y almacenamiento a 4°C durante el menor tiempo posible para preservar las características del producto.

Para obtener los extractos de aceite esencial y acuoso

se utilizó el método de hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHM) después de que fue estandarizado por Gómez, A y Moran, N.⁽¹⁴⁾ Para esto, los frutos se lavaron con solución de hipoclorito al 2% para eliminar cualquier agente contaminante y luego se realizó la separación de la pulpa y la semilla. Se tomaron 1500 g de pulpa junto con la cáscara y se molieron para luego introducirlas en un balón de 4 litros de capacidad al que se le adicionaron 200 ml de agua destilada y se lo acopló al sistema de acuerdo con el montaje que se encuentra en el laboratorio de investigación de productos naturales de la Universidad de Nariño.

La extracción se realizó utilizando un horno microondas LG, modelo MB-14VG, con una potencia de salida 2450 MHz y nivel de potencia 7 (7% de la potencia máxima) durante 90 minutos. Se siguió el mismo procedimiento con 1000g de semillas licuadas (provenientes de los frutos maduros que producían 1500g de pulpa) y 100 ml de agua destilada. (Fig 1). El Aceite esencial extraído por su alta volatilidad se recogió sobre 5 ml de acetato de etilo de los cuales se tomaron 1.5 ml y se eliminaron trazas de agua con Na₂SO₄ anhidro. El extracto acuoso fue extraído de la fase inferior del producto obtenido.⁽¹⁵⁾ Posteriormente se determinó el pH de cada uno de los extractos obtenidos y se realizó inmediatamente la evaluación de antibiosis.



FIGURA 1. Montaje para realizar hidrodestilación asistida por radiación con microondas. Laboratorio de Productos Naturales Universidad de Nariño.

Obtención del inóculo de *H. pylori*

Se obtuvo a partir de fragmentos de biopsias obtenidas en el Hospital Departamental de Nariño de pacientes procedentes del municipio de La Florida (Nariño) con antecedentes de síndrome ulceroso y con previo conocimiento de la investigación y con su correspondiente autorización. En el laboratorio No 4 de Microbiología de la Universidad de Nariño se realizaron el macerado en mortero estéril de cada muestra en 100 μ l de solución salina 0.9% y una siembra por agotamiento en agar sangre al 8% con suplemento Dent. Las cajas se incubaron a 37 °C en cámara microaerofílica con sobres Campypack (BBL) hasta observar la formación de colonias (48 - 72 horas). Posteriormente se verificó morfológica, macroscópica y microscópicamente (tinción de Gram) y las correspondientes pruebas bioquímicas de identificación (Test de urea, oxidasa (oxid) y catalasa)

Evaluación de Antibiosis

Para esto se utilizó el método de difusión en placa en Agar Columbia suplementado con sangre de cordero al 8%; utilizando inóculos vigorosos de *H. pylori* con

una densidad aproximada de 1×10^8 UFC según la escala de MacFarland. En cada unidad experimental (caja de petri) se utilizaron 2 sensidiscos: uno impregnado con 1.5 μ l de uno de los extractos de *C. candamarcensis* puro (Aceite esencial de semilla ó aceite esencial de pulpa ó extracto acuoso de pulpa ó extracto acuoso de semilla) y otro correspondiente al testigo con 1.5 μ l de agua destilada estéril (ADE) cada prueba con 10 ensayos y por duplicado (fig 2). Las cajas se incubaron en las mismas condiciones señaladas para la obtención del inóculo.

Al cabo de 72 horas de incubación se midieron los diámetros de las zonas claras alrededor de los sensidiscos (halos de inhibición) como indicadores el efecto inhibitorio de crecimiento de extracto. Para su evaluación se aplicó un diseño irrestrictamente al azar de una sola vía y un solo factor, con un total de 80 unidades experimentales evaluadas. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y la prueba de medias de Tukey. La identificación de los componentes de los extractos promisorios fueron realizados por Gómez *et al.* ⁽¹⁴⁾ utilizando Cromatografía de Gases en las instalaciones de laboratorios especializados de la Universidad de Nariño.

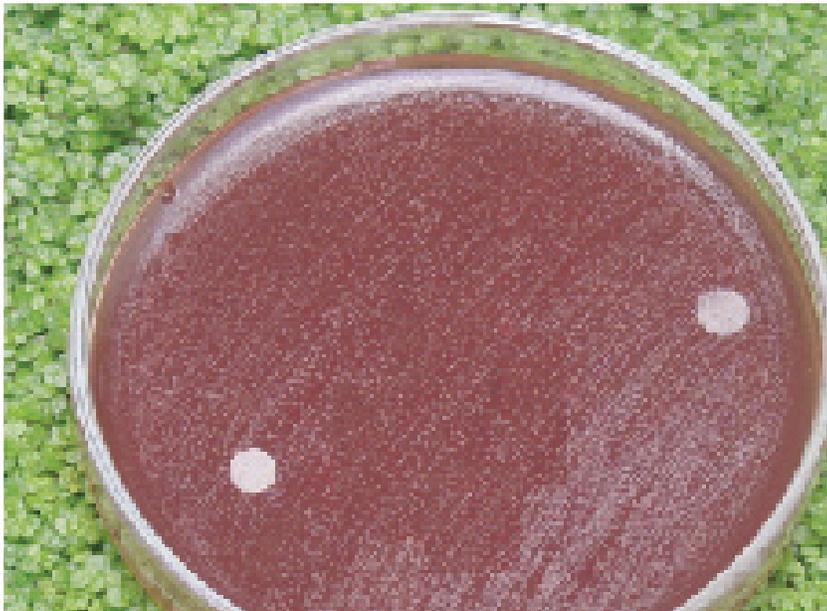


FIGURA 2. Disposición de sensidiscos en cada unidad experimental (caja de Petri) se observa además el crecimiento masivo de *H. pylori*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De 27 paciente evaluados, el 74.07% (20) resultaron positivos para *H. pylori*, datos que fueron verificados con las pruebas bioquímicas, macroscópica y microscópicas pertinentes, a partir de ellos se establecieron los inóculos vigorosos utilizados para la prueba de antibiosis.

Teniendo en cuenta el diámetro de halos observados (fig 3), el estudio demuestra que todos los extractos evaluados tienen algún efecto inhibitorio sobre *H. pylori*, sin embargo el análisis de varianza indica la presencia de diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% entre los tratamientos.

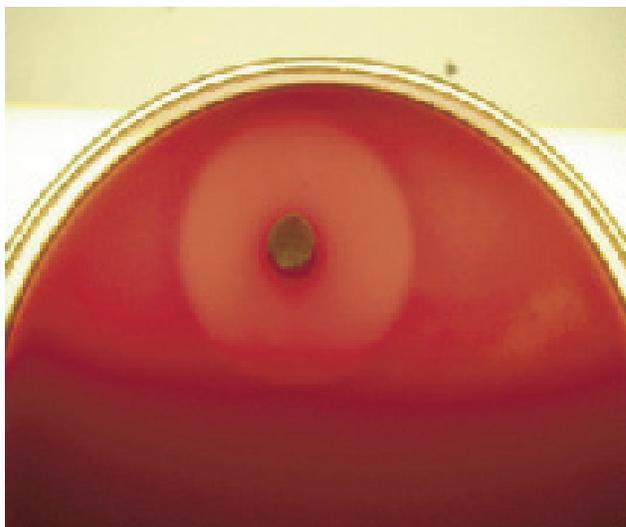
La prueba de medias de Tukey (fig 4) indica que el mejor tratamiento es el de aceite esencial de pulpa de frutos de chilacuan con halos de inhibición promedio de 9.6 mm., presentando diferencias significativas en relación con el resto

de tratamientos y resultando así como promisorio para continuar estudios sobre el y posiblemente establecerlo como una terapia complementaria al tratamiento convencional de *H. pylori*.

Todos los extractos evaluados presentan un pH ácido (tabla 1), sin embargo no se observa ningún tipo de relación entre pH y actividad biológica, indicando así que el efecto del extracto es resultado de alguno(s) de sus componentes(s), haciendo necesaria la caracterización preliminar del extracto promisorio.

La caracterización preliminar del aceite esencial de frutos de *C. candamarcensis* obtenido por MWHD mediante cromatografía de gases realizada por González et al.⁽¹⁶⁾ demuestra la presencia de los compuestos señalados en la Tabla 2.

A



B

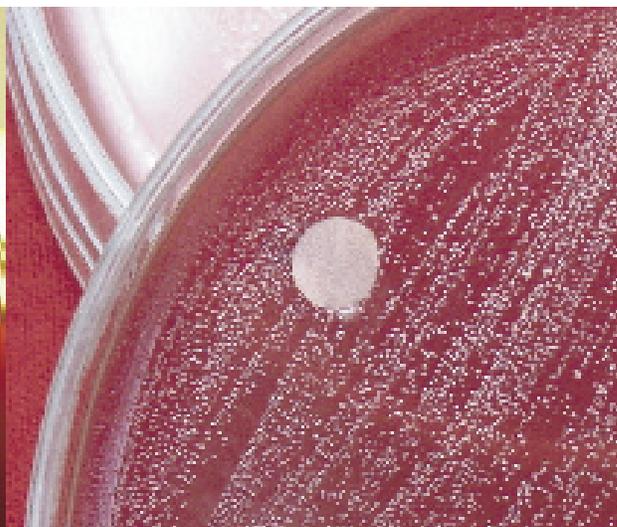


FIGURA 3. A. Halo de inhibición observado con extracto de Aceite esencial de pulpa de *C. candamarcensis*. B: Detalle de crecimiento de colonias junto a sensidisco testigo (sin halo de inhibición).

Figura No. 4. Resultados prueba de Medias de Tukey para halos de inhibición observados en *Helicobacter pylori*

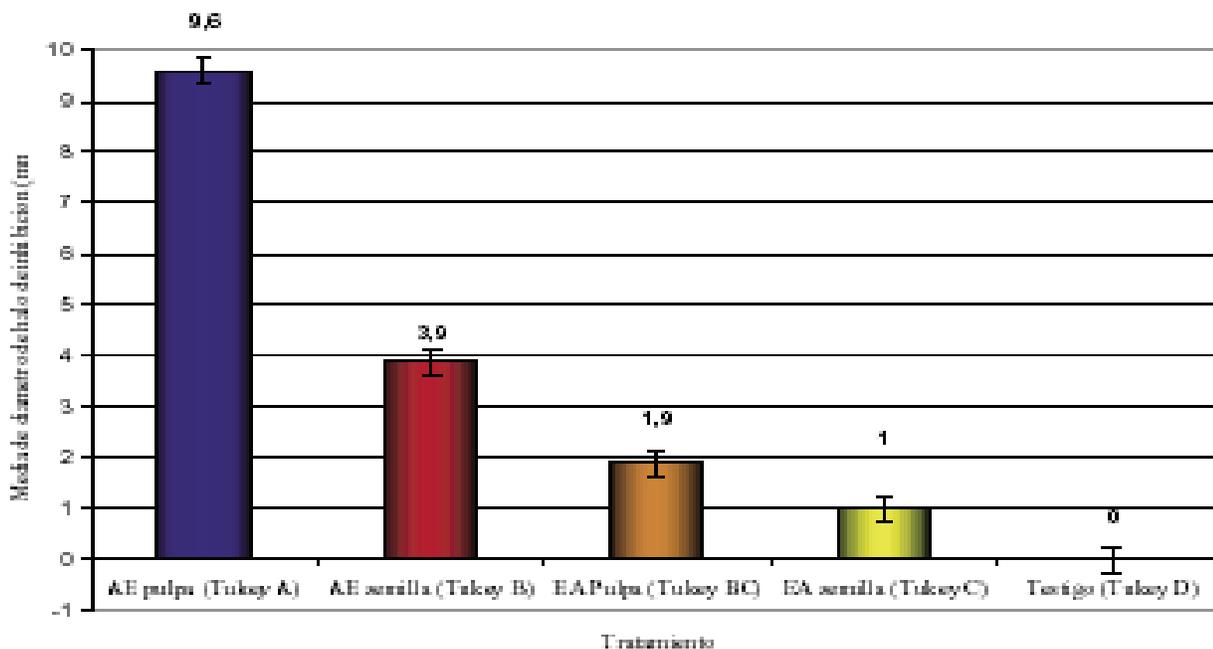


TABLA 1. pH de los extractos de *C. candamarcensis* evaluados sobre poblaciones de *H. Pylori*.

Extracto	A. E Pulpa	A. E. Semilla	EA Pulpa	EA semilla
pH	4.9	4.6	5.2	5.1

Dentro de los componentes encontrados existen algunos ampliamente reconocidos y sobre los cuales existen reportes previos de actividad biológica; por ejemplo:

- ✓ Dentro de los hidrocarburos se destaca el Heneicosano sobre el cual existen varios reportes de actividad antimicrobial, siendo uno de los estudios mas recientes el realizado para el tratamiento de una forma de neumonía nosocomial⁽¹⁷⁾ y el Tolueno
- ✓ El Linalool es un monoterpeneo del cual también se tienen reportes de efectos antibacteriales, tanto sobre organismos gram positivos como gram negativos⁽¹⁸⁾.

- ✓ El Farnesol es un sesquiterpeneo ampliamente utilizado en la industria farmacéutica y cosmética gracias a que presenta diferentes niveles de actividad biológica como: bactericida, fungicida, antiinflamatorio, ha sido utilizado en productos como desodorantes, bases para maquillaje entre otros⁽¹⁹⁾.

La acción combinada de estos compuestos y otros de los presentes en el extracto podrían ser la causa de la actividad inhibitoria observada *in vitro* en *H. pylori*.

Sin embargo, también se encontraron algunos componentes como el tolueno que por si mismo y/o por sus derivados metabólicos se reportan como de actividad mutagénica, toxicológica o

TABLA 2. Concentración y asociación por familia de compuestos presentes en AE de frutos maduros de *C. candamarcensis* mediante cromatografía de gases.

FAMILIA		COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN (mg/K material Vegetal húmedo)
Oxigenados		Hexadecanoato de butilo	295×10^{-3}
		Benzato de butilo	178×10^{-3}
		Locten-3-ona	342×10^{-3}
		Hexanoato de etilo	152×10^{-3}
		Caprilato de butilo	345×10^{-3}
		Acetato de hexilo	97×10^{-3}
		Furancarboxilato de etilo	581×10^{-3}
		Octanol	242×10^{-3}
		2-octenoato de etilo	702×10^{-3}
		Octanoato de metilo	341×10^{-3}
		Acido octanoico	481×10^{-3}
		2-hidro xibenzoato de etilo	200×10^{-3}
		Octanoato de etilo	128×10^{-3}
		Acido tetradecanoico	150×10^{-3}
		Decanoato de butilo	645×10^{-3}
		Hexadecanoato de etilo	308×10^{-3}
		9,12,15-octadecatrienoato de metilo	108×10^{-3}
		Caprilato de metilo	633×10^{-3}
Hidrocarburos	Insaturados	5-metil-1-hexeno	128×10^{-3}
		2-metil-1-penteno	671×10^{-3}
	Saturados	Heneicosano	180×10^{-3}
	Aromáticos	Tolueno	106×10^{-3}
Monoterpenos		Linalool	335×10^{-3}
Sesquiterpenos		Famesol	76×10^{-3}
Nitrogenados		2-miristinol glicinamida	198×10^{-3}

carcinogénica^(20,21), esto hace necesario realizar evaluaciones de genotoxicidad y citotoxicidad al aceite esencial de pulpa de *C. candamarcensis* antes de iniciar pruebas *in vivo* para recomendar el extracto como un tratamiento terapéutico complementario.

Teniendo en cuenta que el extracto acuoso de pulpa presentó igualmente actividad controladora sobre *H. pylori*, es conveniente continuar estudios evaluando el extracto total de la pulpa pues la acción combinada de los componentes de los dos extractos (acuoso y aceite esencial), podrían incrementar el efecto sobre *H. pylori*, además podrían existir otros componentes que se pierden durante la extracción que eventualmente podrían favorecer la actividad antibacteriana, tal es el caso de la proteinasa de *C. candamarcensis* que ha sido estudiada previamente en Brasil en procesos de purificación de ADN, ya que gracias a su efectiva actividad, evita la degradación de la molécula por nucleasas⁽²²⁾; es posible entonces que, teniendo en cuenta el carácter Gram negativo de la bacteria, la proteinasa pueda afectar la estructura de su membrana lipoprotéica externa, causando así, la lisis celular

De esta manera, con este trabajo se abre un campo de exploración para diversas aplicaciones clínicas de este producto que actualmente se limita a ser utilizado dentro de la repostería y evidencia la necesidad de continuar estudiando la flora nativa de la región, aprovechando la riqueza etnobotánica existente.

CONCLUSIONES

Todos los extractos evaluados presentaron efecto inhibitorio sobre *H. pylori*, sin embargo debido al diámetro de los halos observados el aceite esencial de de frutos maduros de *C. candamarcensis* resultar promisorio para ser utilizado en terapias complementarias para el tratamiento de *H. pylori*.

No se encontró ningún tipo de relación entre el pH de los extractos con la actividad inhibitoria observada.

RECOMENDACIONES

Es importante establecer la concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto evaluado y simultáneamente, optimizar a nivel industrial la obtención del extracto de aceite esencial de pulpa de frutos de *C. candamarcensis*

Se debe estudiar el efecto de extractos puros, y productos preparados (dulces) sobre poblaciones de *H. pylori* para establecer posibles formas de consumo del producto.

Es necesario realizar estudios de genotoxicidad y citotoxicidad antes de su implementación.

AGRADECIMIENTOS

Al sistema de investigaciones de la Universidad de Nariño por la financiación del proyecto, a los pacientes que colaboraron con sus biopsias, al Hospital Departamental de Nariño, a todas las personas y entidades que de una u otra forma colaboraron con el desarrollo del proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Muñoz, N. 1998. Cáncer Gástrico y *Helicobacter pylori*. En: Infección por *Helicobacter pylori* en lesiones gastroduodenales. La segunda década. Editorial Proas Science S.A. Barcelona España: 199 - 209
2. Gasbarrino, A., Franceschi, F. y Gasbarrini, G. 1998. *Helicobacter pylori* y enfermedades extradigestivas. En: Infección por *Helicobacter pylori* en lesiones gastroduodenales La segunda década. Editorial Proas Science S.A. Barcelona España: 99 - 105
3. Malaty, H. et al. 1994. *Helicobacter pylori* infection genetic and environmental influences: a study of twins. Annals of internal medicine. Vol 120:982-986.
4. Ceron C., Yopez M. y Rivas G. 2004. Estilos de

- vida y factores protectores y de riesgo para enfermedad gástrica. Municipio de Nariño Colombia. En: Universidad y Salud. Año 4 Vol1 No. 5:9-25
5. Nithola C. y Yepez M. 2000. Factores asociados a la infección por *H. pylori* en Lactantes. En: Universidad y Salud. Año 1 Vol 1 No. 1: 31-36
 6. Jeng Yih Wu, Jae J. Kim, Rita Reddy, W. M. Wang, David Y. Graham and Dong H. Kwon. 2005. Tetracycline-Resistant Clinical *Helicobacter pylori* Isolates with and without Mutations in 16S rRNA-Encoding Genes. In: Antimicrob Agents Chemother. 49(2): 578-583.
 7. May Sherif, Zaynab Mohran, Hanan Fathy, David M. Rockabrand, Patrick J. Rozmajzl and Robert W. Frenck. 2004. Universal High-Level Primary Metronidazole Resistance in *Helicobacter pylori* Isolated from Children in Egypt. In: J Clin Microbiol. 2004 October; 42(10): 4832-4834.
 8. G. E. Bergonzelli, D. Donnicola, N. Porta, and I. E. Corthésy-Theulaz 2003 Essential Oils as Components of a Diet-Based Approach to Management of *Helicobacter* Infection. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 47, No. 10: 3240-3246.
 9. Nostro A, Cellini L, Di Bartolomeo S, Di Campli E, Grande R, Cannatelli MA, Marzio L and Alonzo V. 2005. Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. In: Phytother Res. 19(3):198-202.
 10. Montes C., Santacruz B., Sañudo J. y Pazos A. 2003. Efecto in vitro de *Lactobacillus casei subsp. Rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori*. En: Universidad y Salud. Vol1 No. 4: 5-12.
 11. Gomes MT, Mello VJ, Rodrigues KC, Bemquerer MP, Lopes MT, Faca VM, Salas CE. 2005. Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogens for mammalian cells. In: Planta Med. Mar; 71(3):244-8.
 12. Garcia, H. 1975. Flora medicinal de Colombia: Botánica médica. Bogotá: Talleres editoriales de la imprenta nacional.
 13. Alvarez, L. 2000 Recolección, caracterización y evaluación de papayas de altura, con énfasis en papayuelas: Universidad de Caldas [Cited 25 Sep 2003]. Available from Internet: <<http://ciagrope.tripod.com/ff01.html>>
 14. Gómez D. y Morán M. 2005. Extracción e identificación de los metabolitos secundarios presentes en los frutos maduros de *Carica candamarcensis* Hooker *filius*. Tesis de Grado para optar título de Químico. Universidad de Nariño.
 15. Ibid.
 16. Ibid
 17. Sun HK, Kuti JL, Nicolay DP. 2005. Pharmacodynamics of antimicrobials for the empirical treatment of nosocomial pneumonia: A report from the OPTAMA Program. Crit Care Med. Oct; 33(10):2222
 18. Friedman M, et al. 2004. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. J Agric food Chem. Sep 22; 52(19):6042-8.
 19. Koo H. et al. 2003. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. In: J Antimicrob Chemother. Nov; 52(5):782-9.
 20. Da Silva Nunes - Halldorson V, Steiner RL, Smith G.B. 2004. Residual toxicity after biodegradation: interactions among benzene, toluene, and chloroform. Ecotoxicol Environ Saf. Feb; 57(2):162-7.
 21. Seel K, Walber U, Herbold B, Kopp R. 1999. Chemical behaviour of seven aromatic diisocyanates (toluenediisocyanates and diphenylmethanediisocyanates) under in vitro conditions in relationship to their results in the Salmonella/microsome test. Mutat Res. Jan 13; 438(2): 109-123.
 22. Genelhu MS, Zanini, MS, Veloso IF, Carneiro AMD, Lopes MTP, Salas CE 1998. Use of cysteine protease from *Carica candamarcensis* as a protective agent during DNA extraction. In: Braz J Med Biol Res 31: 1129-1132.