

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE
FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antiinflamatorias *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho, 2013.

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

PRESENTADO POR:

Bach. GABRIEL MISAEL ALARCÓN GÓMEZ

AYACUCHO - PERÚ

2014

Acta de Sustentación de Tesis

Bach. Gabriel Misael ALARCÓN GÓMEZ

R.D.N° 093-2014-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho siendo las cuatro de la tarde del día 29 de agosto del 2014, en el auditorio del departamento académico de ciencias biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga se reunieron los miembros del jurado evaluador presidido por el Dr. Tomás Castro Carranza y como miembros del jurado Blgo. Pedro A. Vila Quintanilla, Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich (Asesor), y el Dr. Edwin C. Enciso Roca quien además actuó como secretario encargado, con la finalidad de recepcionar el acto de sustentación de tesis: Efecto Genotóxico *In vitro* de plantas medicinales antiinflamatorias *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Valh "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho 2013, presentado por el Bach. En Farmacia y Bioquímica Gabriel Misael Alarcón Gómez quien pretende obtener el Título Profesional de Químico Farmacéutico.

Constatado la documentación el presidente del jurado calificador autorizó al sustentante a iniciar el acto de sustentación en el tiempo reglamentario.

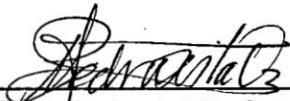
Concluida la disertación, el presidente invito a cada uno de los miembros del jurado evaluador para que puedan realizar las preguntas, así como las aclaraciones necesarias, dando respuesta a ello el sustentante. Concluido con este proceso se invita al sustentante como al público asistente a abandonar el auditorio, con la finalidad de efectuar la calificación por parte de los miembros del jurado calificador en estricto privado, obteniéndose los siguientes resultados.

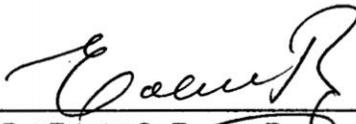
Jurado evaluador	exposición	respuesta	promedio
Blgo. Pedro A. Vila Quintanilla	18	18	18
Dr. Edwin C. Enciso Roca	17	17	17
Blgo. Tomas Y. Miranda Tomasevich	20	19	20
Dr. Segundo Tomas Castro Carranza	18	18	18
Promedio			18

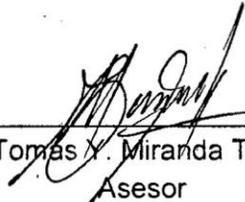
De la calificación efectuada se obtuvo la nota promedio de (18) dieciocho.

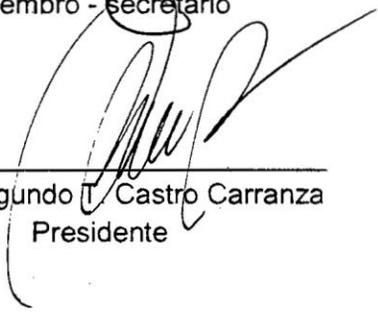
A continuación se invita al sustentante y al público a ingresar al auditorio, con la finalidad de que se le dé a conocer el resultado y se le tome la juramentación respectiva.

El acto de sustentación culminó siendo a las 6:00 P.M. firmando al pie de la presente los miembros del jurado evaluador en señal de conformidad


Blgo. Pedro A. Vila Quintanilla
Miembro


Dr. Edwin C. Enciso Roca
Miembro - secretario


Blgo. Tomás Y. Miranda Tomasevich
Asesor


Dr. Segundo T. Castro Carranza
Presidente

DEDICATORIA

A Dios por permitirme culminar una etapa más, a mis maravillosos padres y hermanos por su gran apoyo y cariño incondicional y a la memoria de mi hermana.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por ser nuestra *alma mater*, que nos acogió durante estos años de estudio y nos dio la oportunidad de adquirir conocimiento.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, que me permitió realizar el trabajo.

A la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, por darnos la oportunidad de formarnos como profesionales.

Al Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich y Mg. Q.F. Enrique Javier Aguilar Felices por su asesoría y por brindarme la oportunidad de llevar a cabo el presente trabajo de Tesis.

A mi familia por su apoyo incondicional, cariño y comprensión en cada etapa de mi vida.

A toda las personas que han estado conmigo y me han brindado su amistad, apoyo y consejos.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. <i>Oenothera rosea</i> Ait "yawar suqu"	7
2.3. <i>Piper elongatum</i> Vahl "matico"	9
2.4. <i>Xanthium catharticum</i> HBK "amor seco"	11
2.5. Inflamación	12
2.6. Dosis	16
2.7. Toxicidad	17
2.8. Genotoxicidad	19
2.9. Modelo tridimensional del ADN	21
2.10. Evaluación genotóxica	23
2.11. Electroforesis en gel	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1. Lugar de trabajo de investigación	26
3.2. Población y muestra	26
3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos	27
3.3.1. Recolección de muestra	27
3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico	27
3.3.3. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico	28
3.4. Extracción de ADN genómico de linfocitos humanos	29
3.5. Cuantificación de ADN genómico de linfocitos humanos	30
3.5.1. Espectrofotometría	31
3.6. Ensayos de la genotoxicidad "in vitro"	31
3.7. Análisis de datos	34
IV. RESULTADOS	35

V.	DISCUSIÓN	49
VI.	CONCLUSIONES	54
VII.	RECOMENDACIONES	55
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
IX.	ANEXOS	60

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Preparación de las soluciones para la prueba de genotoxicidad "in vitro".	32
Tabla 2. Valoración numérica de la genotoxicidad.	33
Tabla 3. Características fisicoquímicas de los extractos hidroalcohólicos de las plantas en estudio, Ayacucho 2013.	35
Tabla 4. Tamizaje fitoquímico para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Oenothera rosea</i> Ait "yawar suqu", Ayacucho 2013.	36
Tabla 5. Tamizaje fitoquímico para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Piper elongatum</i> Vahl "matico", Ayacucho 2013.	37
Tabla 6. Tamizaje fitoquímico para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Xanthium catharticum</i> HBK "amor seco", Ayacucho 2013.	38
Tabla 7. Cuantificación de ADN genómico extraído de linfocitos humanos por espectrofotometría ultra violeta, Ayacucho 2013.	39
Tabla 8. Valores numéricos del grado de genotoxicidad de las plantas medicinales en estudio.	78

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Electroforesis de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Oenothera rosea Ait</i> "yawar suqu", Ayacucho 2013.	42
Figura 2	Gráfica de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Oenothera rosea Ait</i> "yawar suqu", Ayacucho 2013.	43
Figura 3	Gráfica de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Oenothera rosea Ait</i> "yawar suqu", Ayacucho 2013.	44
Figura 4	Electroforesis de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Piper elongatum Vahl</i> "matico", Ayacucho 2013.	45
Figura 5	Gráfica de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Piper elongatum Vahl</i> "matico", Ayacucho 2013.	46
Figura 6	Gráfica de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Piper elongatum Vahl</i> "matico", Ayacucho 2013.	47
Figura 7.	Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Xanthium catharticum HBK</i> "amor seco", Ayacucho 2013.	48
Figura 8	Gráfica de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Xanthium catharticum HBK</i> "amor seco", Ayacucho 2013.	46
Figura 9	Gráfica de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Xanthium catharticum HBK</i> "amor seco", Ayacucho 2013.	47

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de clasificación taxonómica de <i>Oenothera rosea</i> Ait "yawar suqu".	60
Anexo 2. Certificado de clasificación taxonómica de <i>Piper elongatum</i> Vahl "matico".	61
Anexo 3. Certificado de clasificación taxonómica de <i>Xanthium catharticum</i> HBK "amor seco".	62
Anexo 4. Protocolo de procedimiento muestral	63
Anexo 5. Esquema de la marcha fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos, Ayacucho 2013.	64
Anexo 6. Esquema de la obtención del extracto hidroalcohólico marcha fitoquímica y ensayo de genotoxicidad.	65
Anexo 7. Selección y secado de las muestras vegetales	66
Anexo 8. Molienda y pesado de las muestras vegetales	67
Anexo 9. Preparación y maceración de las muestras etanólicas	68
Anexo 10. Filtrado y separación del etanol de la muestra mediante el rotavapor.	69
Anexo 11. Tamizaje fitoquímico realizado a las tres especies vegetales en estudio.	70
Anexo 12. Reactivos empleados para la extracción de linfocitos humanos a partir de sangre	71
Anexo 13. Extracción de ADN de linfocitos humanos a partir de sangre.	72
Anexo 14. Cuantificación de ADN de linfocitos humano extraído a partir de sangre	73
Anexo 15. Preparación e incubación de la muestra para su sembrado respectivo en la cámara de electroforesis de gel de agarosa al 1%.	74
Anexo 16. Sembrado de las muestras en estudio en la cámara de electroforesis	75
Anexo 17. Valores numéricos del grado de genotoxicidad de las plantas medicinales en estudio	76
Anexo 18. Prueba de Mann-Whitney del tiempo de incubación de las plantas medicinales en estudio.	77

Anexo 19. Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración en dos tiempos de incubación de las plantas medicinales en estudio.	78
Anexo 20. Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración en dos tiempos de incubación de las plantas medicinales en estudio.	79
Anexo 21. Matriz de consistencia.	80

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de setiembre de 2013 a mayo de 2014 en la ciudad de Ayacucho - Perú. Planteándose como objetivo: Determinar el efecto genotóxico *in vitro* de las plantas medicinales antiinflamatorias *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Los extractos hidroalcohólicos fueron obtenidos con alcohol a 80^o, realizándose el tamizaje fitoquímico y la determinación genotóxica a diferentes concentraciones, exponiéndose éstos sobre el ADN genómico de linfocitos humano; la estimación del daño genotóxico "*in vitro*" fue determinado mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% y visualizado en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra UVsolo TS. Los metabolitos secundarios identificados en extractos hidroalcohólicos de: "yawar suqu" y "matico" fueron alcaloides, lactonas y/o cumarinas, fenoles y/o taninos, flavonoides, quinonas y glicósidos cardiotónicos; y en extracto hidroalcohólico de "amor seco" alcaloides, fenoles y/o taninos, flavonoides y quinonas; las tres plantas presentan las mismas características organolépticas y de solubilidad. Los extractos hidroalcohólico presentaron una importante actividad genotóxica sobre el ADN genómico de linfocitos humano, siendo los extractos de "amor seco" y "yawar suqu", con mayor efecto genotóxico a concentraciones de 50 mg/ml y 100 mg/ml con respecto a "matico". Se concluye que el daño genotóxico depende directamente de la concentración de los extractos hidroalcohólico; mas no así del tiempo de incubación.

Palabras clave: Genotoxicidad, *Oenothera rosea*, *Piper elongatum* y *Xanthium catharticum*.

I. INTRODUCCIÓN

El paso del tiempo, el avance del saber, la tecnificación de los conocimientos y las industrias, ha llevado al hombre a beneficiarse más de las plantas medicinales, detallando en sus características, virtudes, formas de uso y aplicación.¹

Actualmente existe un gran interés por los complementos alimenticios de origen vegetal, se cree que dichos productos tienen la capacidad de disminuir los factores de riesgo para casi todas las enfermedades; esto permite una amplia acogida entre los consumidores que a menudo consideran que lo "natural" está libre de compuestos químicos nocivos y por lo tanto es "seguro" para la salud; premisa que debe reconsiderarse y controlarse conociendo de antemano que muchos compuestos de origen botánico también contienen toxinas, que incluso pueden tener efecto genotóxico, pues la integridad del ácido desoxirribonucleico (ADN) constituye un aspecto fundamental para la célula y el buen funcionamiento de los organismos vivos; así mismo, este material genético es susceptible a daños causados por numerosos agentes y/o procesos.²

El uso de las plantas medicinales en la terapéutica, requiere al igual que los productos sintéticos, de investigaciones previas y posteriores a su comercialización, donde sigan siendo observadas mediante estudios de farmacovigilancia.³

Las pruebas de toxicidad se realizan con el fin de identificar posibles daños para el ser humano ya que, se han detectado extractos de plantas medicinales que poseen actividad embriotóxica y/o teratogénica, y se ha reportado actividad mutagénica y carcinogénica en productos de origen vegetal (flavonoides y taninos), encontrándose que existe una correlación positiva entre la ocurrencia de enfermedades y tumores en la población.⁴

Estas plantas han sido usadas en la medicina tradicional en el tratamiento de diversas afecciones a la salud, entre ellas como antiinflamatorias, las mismas que fueron demostradas por trabajos de investigación. Se emplea un sistema de ensayo a corto plazo *in vitro* utilizando el ADN genómico de linfocitos humanos para detectar daño genético, como parte del estudio farmacológico y toxicológico de estas plantas, en el presente trabajo se pretende desarrollar los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL:

- Determinar el efecto genotóxico *in vitro* de las plantas medicinales antiinflamatorias *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco".

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en las plantas medicinales antiinflamatorias *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco".
- Caracterizar el efecto de la genotoxicidad de las plantas medicinales antiinflamatorias en estudio, mediante ensayo *in vitro* sobre el ADN genómico de linfocitos humano, detectado mediante electroforesis.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Las plantas han sido desde la antigüedad, un recurso al alcance del ser humano para su alimentación y la curación de sus enfermedades; éstas últimas llamadas plantas medicinales eran veneradas por las virtudes que se les había reconocido, transmitiéndose de generación en generación; nadie buscaba el saber por qué o cómo actúan, pero era un hecho incontestable y que parecía mágico.⁵

En la actualidad cientos de plantas son utilizadas en la medicina, del mismo modo la ciencia moderna analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, no con el fin de disminuir la confianza en la naturaleza, sino, para agrupar a las plantas de efectos similares, a fin de conocer los principios activos responsables de cortar, aliviar o curar enfermedades, separarlos de las plantas que lo contienen, determinar sus estructuras químicas, procurar su síntesis, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad y, finalmente, dar a conocer a la humanidad los resultados de los estudios. Un análisis de esta naturaleza debe ser realizado como una acción multidisciplinaria con la intervención de botánicos, químicos, farmacólogos, farmacognostas, entre otros.⁴

El uso de plantas medicinales podría convertirse en una alternativa médica a tomarse en cuenta, tanto por la comodidad del precio como por la fuerza de la costumbre. Así mismo, podrían integrarse dentro de los programas oficiales de salud, a fin de aprovechar las características positivas de ambos enfoques terapéuticos de salud. Se estima que casi el 80% de todos los habitantes de la tierra confían en medicinas tradicionales para resolver sus principales necesidades de salud.⁵

Se estudió la parte aérea de la especie *Oenothera rosea Ait*, que es la que se emplea para preparar las infusiones, como una de las formas de uso. La muestra seca y molida finalmente se sometió a una extracción selectiva con hexano, acetato de etilo y metanol y con los extractos obtenidos se determinaron por un lado, los grupos de metabolitos secundarios que la conforman para determinar la actividad antiinflamatoria; por otro, se midió su actividad antibacteriana y su toxicidad frente a *Artemia salina*. Dentro de los grupos de metabolitos secundarios se determinó presencia de alcaloides, flavonoides, terpenos, esteroides y glicósidos. Detectaron alcaloides en el extracto hexánico de *Oenothera rosea Ait*. La planta presentó actividad antibacteriana frente a las especies de prueba y toxicidad frente a *Artemia salina*.⁶

En un estudio de *Oenothera rosea Ait* se reportó la presencia de flavonoides, y demostró la actividad antiinflamatoria de extractos acuosos encontrándose mayor eficacia antiinflamatoria a 250mg/Kg. de peso en cobayos, respecto a la actividad hepatoprotectora contra el daño producido por el paracetamol, se concluye que se obtienen mejores resultados a la dosis de 250mg/Kg del extracto acuoso liofilizado. Asimismo, afirma que los grupos fenólicos y los flavonoides podrían ser los responsables del efecto hepatoprotector. También determina que la DL₅₀ del extracto acuoso liofilizado de *Oenothera rosea*, al ser administrado por vía oral es mayor de 2g/Kg de peso de ratón. No presentando

muerte hasta las 72 horas de experimento; y La DL₅₀ por vía intraperitoneal es de 165,2107 mg/Kg de ratón a las 72 horas de evaluación.^{7,8}

Se realizó un estudio sobre la bioactividad y toxicidad de las hojas y tallos de *Oenothera rosea* Ait en extractos acuosos y etanólicos, concluyendo que son ligeramente tóxicos. La Concentración Letal 50 (CL50) en *Artemia salina* para el caso del extracto acuoso de las hojas y del tallo fue de 246,93 ppm y 1141,63 ppm respectivamente. La Concentración Letal 50 (CL50) en *Artemia salina* en el caso del extracto alcohólico de las hojas fue de 1,49 ppm y para el tallo fue de 5,38 ppm. La Dosis Letal 50 (DL50) en ratones albinos para el extracto acuoso de las hojas fue de 1073,89 mg/Kg y del tallo fue de 129832 mg/Kg. En el extracto alcohólico se obtuvo, para el caso de las hojas, una DL50 de 612,52 mg/Kg y para el caso del tallo, una DL50 de 877,94 mg/Kg.⁶

Resultados por ensayo de micronúcleos concluyen que a diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Xanthium catharticum* la prueba no mostró ningún efecto mutagénico para eritrocitos de peces. Además, el ensayo cometa en células de leucocitos humanos mostró que no había daño en el ADN en la concentración más baja del extracto probado.⁹

Estos hallazgos sugieren que el extracto de *Xanthium catharticum* no proporciona lesiones significativas en la genética celular, especialmente a una concentración de 0,02g/L⁻¹, ya que los fragmentos de ADN no forman el "cometa". Lo anterior indica baja genotoxicidad para las diferentes concentraciones en el ADN de leucocitos humanos, al menos en las condiciones experimentales probadas. Por otra parte, teniendo en cuenta que la concentración de 0,02g/L⁻¹ corresponde a la utilizada en la medicina tradicional y no refleja la concentración de biodisponibilidad en los individuos después de la ingesta de la infusión, por lo cual su seguridad se vuelve aún más importante. Además, las otras concentraciones ensayadas parecen proporcionar seguridad

relativa en su uso, a pesar de que son cinco y diez veces mayor que la concentración utilizada por la medicina tradicional.⁹

Se realizó la evaluación genotóxica del aceite esencial en concentraciones de 75, 50, 25 mg/mL del extracto etanólico de *Piper elongatum Vahl* mediante la prueba *in vivo* de mutación y recombinación somática (SMART), que emplea a *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) como organismo experimental. Se utilizaron dos diferentes tipos de cruces con los marcadores genéticos *flr*³ y *mwh*: El cruce estándar (ST) y el cruce de alta bioactivación (HB); como control positivo se empleó mitomicina C (MMC). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el estadístico de *Kastenbaum-Bowman* ($\alpha=0,05$), y sugieren que el extracto hidroalcohólico de *Piper elongatum Vahl* a concentraciones por debajo de 100mg/ml, así como el aceite esencial en concentraciones por debajo de 0,5% (p/v), no producen daño genotóxico detectado mediante la prueba de SMART.¹⁰

Los resultados obtenidos muestran que en ninguno de los marcadores analizados MSP, MSG y MG, el aceite esencial a concentraciones de 0,01, 0,05 y 0,1% presenta genotoxicidad; sin embargo a la concentración de 0.5% los resultados obtenidos no permiten conclusiones definitivas debido a que el número de manchas encontradas son insuficientes para poder establecer si el aceite esencial presenta o no genotoxicidad a esa concentración.¹⁰

De las larvas que se sometieron al tratamiento crónico con el extracto a concentraciones de 25, 50 y 75 mg/mL, durante 48 horas, se han obtenido los datos del porcentaje de sobrevivencia tanto para el cruce ST y el cruce HB, analizándose el genotipo trans-heterocigoto; en el cruce ST se evidenció una frecuencia de 1,18 de manchas simples pequeñas MSP/mosca a la concentración de 25 mg/mL y una frecuencia de 0,45 MSP/mosca a una

concentración de 75mg/mL del extracto hidroalcohólico de *Piper elongatum* Valh. En el control negativo se observó una frecuencia de 1,53 MSP/mosca.¹⁰ Los datos obtenidos en el análisis estadístico del potencial genotóxico mediante el cruce estándar, refieren que el extracto hidroalcohólico a las concentraciones evaluadas no induce daño genotóxico, debido a que las frecuencias de manchas encontradas son inferiores respecto al control negativo, lo cual indica que la genotoxicidad para el cruce ST el genotipo trans-heterocigoto, es negativo de acuerdo a los datos obtenidos mediante el paquete estadístico empleado.¹⁰

2.2 Aspectos Botánicos de *Oenothera rosea* Ait “yawar suqu”.

2.2.1 Clasificación Taxonómica.

La determinación botánica se realizó en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga según el sistema de clasificación de Cronquist A. 1988:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	MYRTALES
FAMILIA	:	ONAGRACEAE
GÉNERO	:	<i>Oenothera</i>
ESPECIE	:	<i>Oenothera rosea</i> Ait
NOMBRE VULGAR	:	“yawar suqu”

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH (2013) (Anexo 01)

2.2.2 Descripción botánica

Es una planta herbácea, perenne, de más o menos 30 centímetros de alto, aunque existen arbustos que miden un metro o más, de raíz tuberosa.¹¹

Tallo: Herbáceo, erecto o ascendente y uniformemente decumbente delgado, simple o ramificado, coloreado de rojo violáceo, más intensamente en la base, presenta pelos blanquecinos.¹¹

Hojas: Oblongo-lanceoladas, subenteras o groseramente sinuadas, irregularmente dentadas, de dos a cinco centímetros de longitud con pecíolo delgado. Las hojas de la parte superior están reducidas a brácteas verdosas en cuyas axilas nacen las flores. De color verde oscuro en el haz, un poco más claro en el envés.¹¹

Flores: Agrupadas en inflorescencias racimosas. Son hermafroditas, heteroclamídeas, pedunculadas y períginas; presenta hipanto que encierra al ovario ínfero, cuya parte externa presenta ocho estrías (cuatro más prominentes). Cáliz tetrámero, gamosépalo, los sépalos son reflexos durante la antesis, pubescente, con lóbulos largos y decumbentes. Corola tetrámera, dialipétala, constituida por cuatro pétalos aovados de color rosado o rojo violeta. Androceo diplostémono constituido por ocho estambres con anteras dorsifijas, alargadas ditésicas, con dehiscencia longitudinal, filamento de color blanco, granos de polen de forma tetraédrica. Gineceo completo, ovario ínfero, tetracarpelar, tetralocular, multiovular, óvulos anátropos, epítropos, péndulos, de placentación central y axial, estilo desarrollado, estigma formado por cuatro ramas estigmáticas coloreadas de rosado.¹¹

Fruto: Cápsula ovoide de 8 a 10 mm de longitud, extraídos con ocho costillas longitudinales y caras arrugadas, poseen como base un pedúnculo hueco. Semillas de forma oblonga, aovada y asimétrica, de color marrón.¹¹

2.2.3 Composición química

En su trabajo titulado *New Sources of Gamma-Linoleic Acid Wolf* determinó la presencia de ácidos grasos insaturados en las semillas de *Oenothera rosea* y los identifica como: ácido linoleico, ácido linolénico, ácido palmítico, ácido oleico.¹²

Se reporta la presencia de sustancias fenólicas: ácido elágico, gálico, cafeico, o-cumárico, m-digálico, neoclorogénico, kaemferol, quercetina, cianidina, delfinidina y glicósidosflavónicos los cuales estuvieron presentes en las hojas.

En el trabajo titulado Flavonoid survey of *Oenothera* (Onagraceae), Averett, J determinó la presencia de flavonoides en las hojas de *Oenothera rosea* y los identifica bajo la forma de glucósidos flavónicos.¹³

2.3 Aspectos Botánicos de *Piper elongatum* Vahl “matico”.

2.3.1 Clasificación taxonómica

La determinación botánica se realizó en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga según el sistema de clasificación de Cronquist A. 1988:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	MAGNOLIIDAE
ORDEN	:	PIPERALES
FAMILIA	:	PIPERACEAE
GÉNERO	:	<i>Piper</i>
ESPECIE	:	<i>Piper elongatum</i> Vahl.
NOMBRE VULGAR	:	“matico”

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH (2013) (Anexo 02)

2.3.2 Descripción botánica

Arbolillo delgado, erecto de 40cm de alto. Tallos verdes, glabros, nudos hinchados. Hojas con peciolo corto; lámina ovada, de 15 x 9 cm, oblicuamente atenuada en la base, largamente atenuada en el ápice; superficie escabrosa, nervadura secundaria mayor levantada desde la mitad inferior de la vena media. Inflorescencia erecta, 4 mm de grosor, 12 cm de largo, curvado, blanco.¹⁴

2.3.3 Distribución

Se distribuye a nivel del territorio Peruano en los departamentos de Amazonas, Ayacucho, Cajamarca, Cuzco, Huánuco, Junín, Loreto, Madre de Dios, Pasco, San Martín, Ucayali.

2.3.4 Composición química

Se reporta la presencia de los siguientes compuestos aromáticos aislados de las hojas: asebogenina, 2',6'- dihidroxi – 4'-metoxidihidrochalcona, ácido 3 –geranil – 4 – metoxi – benzoico, ácido 3 – geranil – 4 – hidroxil –benzoico, ácido norvogénico y 2,2 – dimetil – 6 –carboxil – 8 prenil –cromeno.¹⁵

2.3.5 Estudios biológicos

Se evaluó la actividad antioxidante de los compuestos aromáticos, en donde la asebogenina demostró tener una actividad mayor que el α – tocoferol, mientras que el 3 – geranil – 4 – hidroxil –benzoico y el ácido norvogénico mostraron una mayor actividad que el tert – butil – 4 –hidroxil –anisol (BHA).¹⁵

2.3.6 Usos Tradicionales ¹⁶

Las hojas se utilizan tradicionalmente en:

- Infecciones urinarias: el cocimiento de las hojas junto con las flores de retama, se deja durante una noche; al día siguiente se toma como agua de tiempo.
- Resfrío: preparar una infusión con una porción de hojas y tomar cuatro veces al día.
- Antidiarreico: se hierve una porción de hojas y se toma tres veces al día, durante tres días.
- Úlceras: las hojas secas se trituran; el polvo se aplica directamente en la piel.
- Bronquitis: el cocimiento de 15 hojas en un litro de agua se deja reposar 10 minutos. Se toma como agua de tiempo.

- Heridas y antiséptico vaginal: se utiliza la infusión de las hojas en lavados vaginales. .
- Herpes: se utiliza el zumo de las hojas en aplicación directa sobre las heridas de la boca.

2.4 Aspectos Botánicos de *Xanthium catharticum* HBK “amor seco”.

2.4.1 Clasificación taxonómica

La determinación botánica se realizó en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga según el sistema de clasificación de Cronquist A. 1988:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	ASTERALES
FAMILIA	:	ASTERACEAE
GÉNERO	:	<i>Xanthium</i>
ESPECIE	:	<i>Xanthium catharticum</i> HBK.
NOMBRE VULGAR	:	“amor seco”

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH (2013) (Anexo 03)

2.4.2 Descripción Botánica

Es una planta herbácea anual de mediana altura (30 – 120 cm). Posee hojas lanceolada – lobuladas de color verde oscuro con envés grisáceo o blanquecino.

Es originaria de América, probablemente del cono sur (Perú, Bolivia, Chile y Argentina).¹⁷

Las flores son de dos tipos, de color amarillo o verdoso. Las masculinas nacen sobre cortas ramillas terminales. Las femeninas surgen arracimadas en las axilas de las hojas.¹⁷

Las semillas están encerradas en un fruto granado (aquenio). Éste consiste en un pequeño y duro cadillo de forma ovalada, dividido en dos cámaras, recubierto de espinas rígidas y ganchudas.¹⁷

El éxito de la dispersión de esta planta es sin lugar a dudas notable: sus semillas, con ese tipo de "gancho" invertido se agarra a todo lo que se le acerca (pantalones, calcetines, pelos, al ganado, etc.); en fin en un solo paseo por el campo podemos traer cientos de semillas de este tipo.¹⁷

2.4.3 Composición química:

Refieren que esta especie contiene dos lactonas sesquiterpénicas y tres diterpenos de núcleo kaurano, dos xantonas, el xantanol y el isoxantanol.¹⁷

2.4.4 Usos tradicionales:

Se realizó un estudio etnobotánico de esta especie en la zona de Puquio (Ayacucho – Perú) reportando que es utilizado para los golpes, heridas, inflamación de la próstata, dolor de ovario y riñones, cálculos renales, tratamiento de afecciones de la piel como la rasca – rasca y la sarna, tratamiento de las inflamaciones internas, heridas internas y en veterinaria para golpes, hinchazones y heridas.¹⁷

2.5 Inflamación

La inflamación es una respuesta defensiva del organismo frente a un agente irritante o infeccioso es caracterizada por el movimiento de células y fluidos desde la sangre hacia los tejidos extravasculares en el lugar en el que se ha iniciado el estímulo nocivo, bajo la influencia de factores quimiostáticos producidos localmente. Esta reacción vascular tiene como objetivo eliminar los agentes y los tejidos lesionados.^{18,19,20,}

2.5.1. Pasos del proceso antiinflamatorio

Tras ocurrir un estímulo nocivo en un tejido, el proceso de inflamación inicia con la dilatación de los capilares y arteriolas locales, esto produce un exceso de flujo sanguíneo local.²¹

La vasodilatación es provocada por numerosos mediadores químicos producidos por las células del tejido circundante, entre ellos: la histamina, prostaglandinas (PGE₂, PGEI₂, PGE₁) y el Factor Activador de Plaquetas.²²

Otro fenómeno que ocurre en la respuesta inflamatoria es un aumento de la permeabilidad de las paredes de las vénulas postcapilares locales, lo que favorece el paso de un volumen de líquido a los espacios intersticiales (exudado o escape de plasma). Al intersticio ingresan grandes cantidades de agua fibrinógeno, inmunoglobulinas. El paso de proteínas aumenta la presión oncótica y la salida de agua lo que clínicamente provoca el edema que se localiza en el área de la lesión.^{23,24,25}

El incremento de la permeabilidad vascular se favorece por acción principalmente de la histamina y las prostaglandinas PGE-2 y PGI-1.²⁴

Como parte de la repuesta inflamatoria se activa la cascada de la coagulación para la formación de fibrina. Esta forma una red que ocluye los vasos linfáticos lo que a su vez limita la diseminación de los microorganismos. También favorece la separación del área de la lesión del tejido sano.^{21,24}

En el fenómeno inflamatorio ocurre migración de diferentes tipos de células, según su *status* de movilidad. Aquellas de carácter fijo; es decir, se encuentran asentadas de forma permanente en los tejidos, son los responsables de las reacciones inmediatas que se producen en el proceso inflamatorio. Entre ellas se encuentran:^{21,22}

- Macrófagos.

- Células endoteliales de los vasos sanguíneos.
- Mastocitos
- Macrófagos: son fagocitos mononucleares que se forman en la médula ósea que luego emigran hacia los tejidos, donde maduran a macrófagos tisulares. Los factores del complemento C3b y C5a favorecen la emigración de los macrófagos del tejido. Los macrófagos liberan interleucinas (IL-1), leucotrienos, factor de necrosis tumoral (FTN) (conocido anteriormente como catequina).²¹
- Mastocitos: Se activan por diversos tipos de estímulos, como un traumatismo, una agresión química, anticuerpos específicos (de tipo IgE), por componentes del sistema del complemento. Los mastocitos liberan grandes cantidades de histamina y menos intensamente heparina. También producen algunas prostaglandinas (PGE2, PGD2), leucotrienos y PAF.²²
- Células endoteliales de los vasos sanguíneos: en la pared de las arteriolas segregan un *Factor Relajante Derivado del Endotelio* (EDRF), capaz de relajar la musculatura lisa de la pared de los vasos, produciendo vasodilatación. Estas células endoteliales son activadas por diversos mediadores químicos, especialmente por histamina y acetil colina. Estas células producen, además, grandes cantidades de prostaglandinas (PGI2).²²

2.5.2 Manifestaciones de la reacción inflamatoria

Existen cinco principales efectos o signos cardinales de la inflamación aguda ²⁴

- Rubor: enrojecimiento cutáneo progresivo, debido a una dilatación de los vasos (venas) de la zona afectada. ²⁵

- Fiebre o calor: la fiebre es la manifestación general más común de la respuesta inflamatoria. La fiebre es la manifestación general más común de la respuesta inflamatoria. La fiebre ocurre por una alteración del centro regulador de la temperatura a nivel del hipotálamo, la variación de la temperatura interna se transmite por el sistema nervioso mediante las oscilaciones de la temperatura sanguínea. En la inflamación se liberan interleucinas (IL-1 y factor de necrosis tumoral TNF- pirógenos endógenos) que actúan sobre las neuronas del órgano vascular lo que produce la activación de la prostaglandina E2. Este mediador se difunde hacia la región hipotalámica anterior (subcentro del calor), provoca aumento de la temperatura y la liberación de citocinas que generan una respuesta autonómico endocrina.²⁵
- Tumefacción o tumor: Aumento del tamaño debido a un cúmulo anormal de fluidos en los espacios extravasculares.²⁵
- Dolor: Debido a la compresión del líquido sobre las terminaciones nerviosas y a la irritación nerviosa directa facilitada por los mediadores de la inflamación como las prostaglandinas.²⁵
- Pérdida de la funcionalidad.²⁵

2.5.3 Mediadores tisulares de la inflamación

La activación de los mastocitos, basófilos y plaquetas estimula el metabolismo del ácido araquidónico con la consiguiente síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos. La histamina y la serotonina, segregadas por mastocitos, basófilos y plaquetas, producen vasodilatación y aumentan la permeabilidad vascular. El PAF es un complejo lisofosfolípido-acetilado que induce la agregación plaquetaria y la degranulación. Además, aumenta la permeabilidad vascular, induce la adhesión leucocitaria y estimula la síntesis de

derivados del ácido araquidónico. Estos derivados incluyen las prostaglandinas y los leucotrienos.²⁶

El ácido araquidónico es un ácido graso derivado del ácido linoleico que se encuentra en la membrana celular y bajo estimulación puede ser liberado al exterior de la célula por una fosfolipasa. El óxido nítrico se produce por las células endoteliales, macrófagos y neuronas del cerebro.²⁶

2.5.4 Reparación de la inflamación.

En la inflamación se produce una destrucción de las células del parénquima y de las del estroma. El tejido lesionado es reparado mediante tejido conectivo que va a producir la fibrosis y la escaificación. En este proceso intervienen los siguientes componentes:²¹

1. Formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis).²²
2. Migración y proliferación de fibroblastos.²²
3. Depósito de matriz extracelular.²²
4. Maduración y organización del tejido fibroso (remodelación).

El proceso de reparación empieza a las 24 horas tras la lesión. Los fibroblastos y las células del endotelio vascular comienzan a proliferar formando el tejido de granulación en el cual se forman nuevos vasos (angiogénesis).²²

2.6 Dosis

Se refiere a la cantidad de sustancia que se administra a un ser vivo para producirle un efecto determinado. La dosis depende de una serie de factores, especialmente el peso corporal, edad, sexo, ambiente, estado fisiológico o patológico.²⁶

Mecanismo de acción de los AINES, inhiben la biosíntesis de las prostaglandinas. La inhibición se realiza sobre la enzima ciclooxigenasa o prostaglandina sintetasa.²⁷ Esta inhibición sistemática es irreversible y de carácter competitivo.²⁶

2.7 Toxicidad

Es la capacidad de cualquier sustancia química física o biológica en las condiciones necesarias a un determinado tiempo y una determinada concentración de producir efectos perjudiciales o la muerte sobre un ser vivo al entrar en contacto con él, a estas sustancias se suele llamarlas con el nombre de xenobioticos por ser una sustancia extraña que procede del exterior.²⁸

2.8 Genotoxicidad

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una molécula conformada por dos cadenas de nucleótidos entrelazados que forman una doble hélice. El ADN contiene la información que codifica y determina la expresión de las proteínas del cuerpo.²⁹

En la actualidad, un gran rango de agentes naturales y sintéticos es capaz de inducir alteraciones en el ADN (Genotoxicidad), generando cambios en la estructura y por ende en la información contenida en la molécula (mutación).³⁰

La mutagénesis (generación de cambios en el ADN) puede afectar células somáticas o germinales. En las células somáticas (cualquier célula del cuerpo) la mutación puede transmitirse por división celular ocasionando degeneraciones, como el cáncer, o muerte celular. En las células germinales (óvulo, espermatozoide) causa disminución en la fertilidad, abortos espontáneos, y defectos en las progenie, estas alteraciones pueden ser dominantes o recesivas, es decir manifestarse o no en la primera generación.^{31,32,33}

El daño inducido en el "material genético" incluye no sólo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula. Ejemplos de esto último son las proteínas que intervienen en la reparación, condensación y decondensación del ADN en los cromosomas, u otras

estructuras como el huso mitótico, responsable de la distribución de los cromosomas durante la división celular.^{33,34}

Los agentes capaces de ocasionar toxicidad genética son llamados genotóxicos o xenobióticos y se clasifican en tres categorías de acuerdo a su origen: químicos, físicos y biológicos. La primera categoría está constituida por los compuestos químicos, la segunda incluye las radiaciones en todo su espectro y la última algunos parásitos, bacterias, hongos, vegetales o incluso virus (aunque estos últimos no son considerados seres vivos, por lo que muchas veces aparecen clasificados en una categoría aparte). La acción o capacidad de inducir daño de estos xenobióticos está influida por la dosis recibida y el tiempo o vía de exposición, junto a la constitución genética del individuo que puede definir una susceptibilidad propia o particular.³⁴

A su vez, los xenobióticos también pueden clasificarse de acuerdo a su modo de acción o efectos en mutágenos, carcinógenos o teratógenos, dando lugar a tres tipos de procesos: mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis. La mutagénesis abarca los distintos tipos de alteraciones genéticas. Dichas alteraciones (mutaciones) pueden producirse a nivel de una unidad mínima de información (como por ejemplo un gen) o a nivel de unidades mayores como grupos estructurales (cromosomas) correspondiendo a lo que se denomina micromutación o macromutación respectivamente. En el caso de las macromutaciones, se definen como agentes clastógenos a aquellos capaces de inducir rupturas cromosómicas y agentes aneunógenos, a aquellos que producen la pérdida de cromosomas enteros o grupos de cromosomas. Las mutaciones pueden producirse sobre las células somáticas y/o germinales, siendo en este último caso heredable si son transmitidas a la prole. La carcinogénesis es un proceso que involucra cambios (transformación celular) de tipo irreversible, a través de una serie de estadíos (iniciación, promoción y

progresión). Se ha observado que la mayoría de los carcinomas están asociados entre un 90-95% de los casos a agentes químicos, entre un 1-5% a agentes físicos (radiaciones) y entre un 1-2% a agentes de tipo biológico o virus. Por otra parte, la teratogénesis, implica el daño inducido sobre el organismo en desarrollo, es decir, en alguno de los distintos períodos de gestación o a lo largo de la misma como proceso.^{34,35}

Dentro de los genotóxicos de origen químico encontramos una amplia gama de compuestos con efectos múltiples. Es de conocimiento público el incidente de la Talidomida en los años 60, una droga suministrada como sedante e indicada para estados nauseosos. Debido a esta segunda propiedad fue ingerida por mujeres que atravesaban el primer trimestre del embarazo, acarreado consecuencias fatales. Este compuesto, del cual se desconocía su efecto teratogénico, indujo malformaciones fetales, produciendo el nacimiento de niños con ausencia de miembros o que presentaban afecciones neurológicas.³⁴

Encontramos también numerosos contaminantes ambientales en esta categoría: metales pesados, hidrocarburos aromáticos y pesticidas representan un breve ejemplo de ello. La exposición ocupacional también constituye un factor determinante en el desarrollo de patologías neoplásicas. Se ha mostrado que la inhalación de partículas de asbestos desencadenan en el desarrollo de cáncer de pulmón., así como otros xenobióticos químicos que son introducidos por lo que se conoce como "estilos de vida", dentro de los que podemos encontrar el hábito de fumar o el alcoholismo.³⁵

En cuanto a los agentes de tipo físico, las altas dosis de radioactividad liberadas en el accidente de la planta nuclear de Chernobyl en 1986 y aquellas devenidas como producto de la explosión de las bombas atómicas arrojadas por EE.UU. en Hiroshima y Nagasaki, dejaron notables evidencias del alcance del daño capaz de ser inducido por las radiaciones en el material genético. Como consecuencia

directa de las altas dosis recibidas que provocaron la muerte de cientos de miles de personas, las poblaciones en cuestión desarrollaron distintos tipos de cáncer, además de mutaciones en sus células germinales que dieron lugar a la aparición de multiplicidad de enfermedades genéticas y malformaciones que se manifestaron en las generaciones postreras, por lo que las consecuencias de la exposición a este xenobiótico se prolongaron largamente en el tiempo.^{32,34}

Los rayos UV, encuentran como blanco de daño a las células epiteliales, debido a que la piel constituye la mayor vía de exposición. Numerosas patologías relacionadas a la deficiencia en los mecanismos de reparación del ADN, ejemplifican de manera paradigmática los efectos carcinogénicos en la epidermis producidos³⁴

Por otra parte, aún existen controversias en cuanto los efectos genotóxicos de otro tipo de radiaciones como las electromagnéticas.³⁴

Entre los agentes de tipo biológico, un ejemplo radica en las aflatoxinas, micotoxinas producidas por algunos hongos unicelulares, las que han mostrado ser potentes carcinógenos. Por otra parte, ejemplificando a la subcategoría constituida por los xenobióticos de origen vegetal, algunas hierbas a las que se le adjudican propiedades medicinales también pueden representar un riesgo para la salud, de acuerdo con las dosis ingeridas y debido a que muchas de ellas no han sido caracterizadas en cuanto a su genotoxicidad. La quercetina y la rutina, por ejemplo, han mostrado ser mutagénicas e incluso carcinogénicas.

Para evaluar el daño causado por los potenciales agentes genotóxicos se hace imprescindible el reconocimiento, caracterización y seguimiento de ese efecto y en distintos niveles de análisis, tarea que le compete a una rama de la ciencia interdisciplinaria, la Genética Toxicológica, que se encarga del monitoreo ambiental y humano en general, por distintos tipos de exposición.^{33,34}

2.9. Modelo tridimensional del ADN

En 1953, Watson y Crick postularon un modelo tridimensional para la estructura de ADN que estaba de acuerdo con todos los datos disponibles. Consiste en dos cadenas helicoidales de ADN enrolladas alrededor del mismo eje, que forman una doble hélice dextrógira. Los esqueletos hidrofílicos formados por unidades alternas de desoxirribosas y grupos fosfato cargados negativamente se hallan en el exterior de la doble hélice, en contacto con el agua circundante. Las bases purínicas y pirimidínicas de ambas cadenas están apiladas en el interior de la doble hélice, con sus estructuras en anillo hidrofóbicas y prácticamente planas situadas a muy corta distancia las unas de las otras y en posición perpendicular con relación al eje longitudinal de la hélice. La relación espacial entre las dos cadenas da lugar a la formación de un surco mayor y un surco menor en la doble hélice. Cada base de una cadena está apareada con una base de la otra cadena, y ambas bases están situadas en el mismo plano. Watson y Crick dedujeron que los pares de bases unidos por enlace de hidrógeno eran los que mejor encajaban con la estructura, a la vez que proporcionaban una explicación a las reglas de Chargaff. Es importante observar que se pueden formar tres enlaces de hidrógeno entre G y C, cuya unión se simboliza $G \equiv C$, mientras que solamente se pueden formar dos entre A y T, enlace simbolizado por $A = T$; otros apareamientos diferentes tienden, en distinto grado, a desestabilizar la estructura en doble hélice.³⁶

En la estructura de Watson y Crick las dos cadenas o hebras de la hélice son antiparalelas; sus enlaces fosfodiéster 5', 3' tienen direcciones opuestas. Trabajos posteriores con DNA polimerasas aportaron pruebas experimentales, confirmadas por cristalografía de rayos x, de que las hebras son realmente antiparalelas.³⁶

Con el fin de poder incluir en su modelo las periodicidades observadas en el modelo de difracción de rayos x, Watson y Crick utilizaron modelos moleculares para demostrar que las bases apiladas verticalmente en el interior de la doble hélice estarían separadas por una distancia de 0,34 nm, y que la distancia secundaria de aproximadamente 3,4 nm podría corresponder a la presencia de 10 (en realidad se ha comprobado que son 10,5) residuos de nucleótido en cada vuelta completa de la doble hélice. Las dos cadenas antiparalelas de polinucleótidos en el DNA en doble hélice no son idénticas ni en secuencia ni en composición de bases. En cambio, son complementarias entre ellas. Siempre que hay adenina en una cadena, se encuentra timina en la otra; de manera similar, la presencia de guanina en una cadena implica la presencia de citosina en la otra.³⁶

La doble hélice o el dúplex de DNA se mantiene por dos tipos de fuerzas: enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias e interacciones por apilamiento de bases. La especificidad que mantiene invariable una secuencia dada de bases en cada hebra de DNA se debe únicamente a los enlaces de hidrógeno formados entre los pares de bases. Las interacciones por apilamiento de bases, mayoritariamente inespecíficas por lo que respecta a la identidad de bases apiladas, contribuyen principalmente a la estabilidad de la doble hélice, la característica fundamental del modelo es la complementariedad de las dos hebras de DNA.³⁶

El proceso de copia de la estructura (replicación) podría proceder de una manera lógica a través de (1) separación de las dos hebras y (2) la síntesis de una hebra complementaria para cada una de ellas mediante las concatenadas de nucleótidos en la secuencia especificada por las reglas de apareamiento de bases comentadas anteriormente. Cada hebra preexistente podría funcionar como un molde para dirigir la síntesis de la hebra complementaria. Las hipótesis

comentadas se confirmaron experimentalmente, lo que significó una revolución en la concepción del metabolismo del DNA.³⁶

2.10. Evaluación genotóxica

La genética toxicológica estudia los efectos mutagénicos de sustancias químicas y radiaciones, así como las consecuencias para la salud humana de la exposición a mutágenos, considerando como tal a cualquier agente que induzca mutaciones génicas (cambio de uno o pocos pares de bases), aberraciones cromosómicas estructurales (cambios en la estructura) o numéricas (aneuploidías y poliploidías por afecciones en los componentes del aparato mitótico o meiótico) o alteraciones al ADN (formación de aductos, alquilación de bases, intercalamiento de bases), a los mecanismos de reparación (incrementando la sensibilidad a los efectos de muchos mutágenos), a los eventos de recombinación mitótica.³⁷

Las plantas medicinales no llevan una indicación metodológica especial para su evaluación genotóxica, por lo que deben ser sometidas a las mismas regulaciones que rigen los fármacos en general. La evaluación genotóxica de extractos de plantas medicinales deben ser realizadas, en primera instancia, mediante ensayos *in vitro*, validados internacionalmente, que midan el daño en los niveles de mutaciones genéticas y cromosómicas.³⁷

En el mundo las guías o rutas críticas para los estudios genotóxicos persiguen como objetivo fundamental evidenciar qué tipo o a qué nivel de organización del ADN opera el daño causado por el compuesto evaluado. En concordancia con ello se reconocen cuatro niveles: mutación génica (nivel I), mutación cromosómica (nivel II), daño primario del ADN (nivel III), transformaciones celulares (nivel IV), entre otras alteraciones. Los ensayos pertenecientes a los dos primeros niveles son muy variados y ampliamente utilizados, en especial las pruebas *in vitro* que se caracterizan por tener una alta sensibilidad y precisión.

En los últimos años las pruebas para medir daño a nivel primario del ADN, han alcanzado gran importancia entre los análisis de genotoxicidad.³⁷

Con el fin de detectar en sus etapas iniciales la acción sobre el material genético se utilizan las siguientes determinaciones *in vitro* que son muy utilizadas en nuestro medio para detectar genotoxicidad inicial: Aberraciones Cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas, micronúcleos, mutaciones genéticas a nivel de Locus HPRT, síntesis de ADN no programada y electroforesis de una célula (ensayo del cometa).³⁶

2.11. Electroforesis en gel

La electroforesis en gel es un modo conveniente de cuantificar el ADN y analizar su estado físico al mismo tiempo, se puede visualizar si existen contaminantes que pueden estar presentes en la muestra de ADN o si está degradado.³⁷

La electroforesis es la aplicación de las técnicas de separación de macromoléculas en un campo eléctrico en función de su tamaño y carga eléctrica superficial, se define como el método de separación de sustancias cargadas al aplicar un campo eléctrico, de modo que se diferencian en el comportamiento en un campo eléctrico. Aquellas partículas cargadas positivamente (cationes) migrarán hacia el cátodo y las cargadas negativamente (aniones) hacia el ánodo.³⁸

Entre las macromoléculas, las más utilizadas son las proteínas seguidas de los ácidos nucleicos, ya que ambos tipos presentan una carga importante, algo que no presentan los lípidos, sin contar con que son insolubles.³⁸

El método consiste en inmovilizar las muestras en estudio en un material gelatinoso (gel). El gel se somete a una corriente eléctrica durante un periodo de tiempo determinado. Cada muestra comenzará a migrar a través de los poros del gel con una velocidad diferencial, que dependerá de la carga eléctrica y del tamaño molecular. Cuando las separaciones se han completado se interrumpe el

paso de corriente y las muestras separadas se tiñen para visualizarse. Cada muestra se encontrará a una distancia distinta respecto al origen.³⁸

Los ácidos nucleicos presentan carga y son solubles ya que tienen un grupo fosfato, parte que confiere la carga, y está presente de forma regular en la estructura. Los ácidos nucleicos tienen la capacidad de migrar en un campo eléctrico y por tanto, son susceptibles de ser separados por electroforesis.³⁸

El gel se encuentra sumergido en un electrolito tamponado con tris-Borato (no glicina), para garantizar que los ácidos nucleicos estén cargados negativamente; por esto a la técnica se le denomina electroforesis de inmersión. Las moléculas migraran hacia el polo positivo, de modo que viajarán en esa dirección por el gel, separándose por tamaño (nº de nucleótidos), a la hora de cargar la muestra se colocan unos marcadores de frente (loadingdye) que nos permita detener la electroforesis en el momento que lo creamos oportuno.³⁸

Para visualizar las bandas, hay que teñir el gel o marcar radiactivamente las moléculas. El método más utilizado en geles de agarosa es el bromuro de etidio, el cual se comporta como un agente intercalante, de modo que además de disminuir la densidad de la molécula, tiene la capacidad de emitir luz cuando se le excita con luz ultravioleta. Hay que tener cuidado con este compuesto ya que es altamente cancerígeno.³⁸

La electroforesis en gel es muy utilizada en la detección, control de pureza, caracterización, cuantificación (por comparación con controles) así como preparación y purificación (por extracción de bandas desde el gel) de moléculas y fragmentos de DNA y RNA.³⁸

La electroforesis en gel tiene dos mecanismos de separación: la electroforesis, que separa por la relación carga/tamaño y el tamizado por el gel, que separa mayormente por tamaño. Los geles más comunes son agarosa y poliacrilamida.³⁹

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar del trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación se desarrolló, durante los meses de setiembre del 2013 a mayo del 2014. La obtención de los extractos y tamizaje fitoquímico de las plantas en estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Farmacognosia del Área de Farmacia; la obtención de ADN de linfocitos humanos y los ensayos de genotoxicidad se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.2. Definición de población y muestra

Población: Plantas de *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco", que crece en la localidad de Ñahuinpuquio de la ciudad de Ayacucho.

Muestra: Se realizó un muestreo por conveniencia de los vegetales en estudio seleccionando manualmente las mejores hojas para el obtener el extracto correspondiente de la siguiente manera

- 500 g de hojas frescas de *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu".
- 500 g de hojas frescas de *Piper elongatum* Vahl "matico".
- 500 g de hojas frescas de *Xanthium catharticum* HBK "amor seco".

3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos

3.3.1. Recolección e identificación de la muestra.

Las muestras fueron recolectadas al azar, durante el mes de setiembre de la localidad de Ñahuinpuquio de la ciudad de Ayacucho; fueron transportadas al Laboratorio de Farmacognosia, donde fueron secadas al medio ambiente, previamente acondicionada, teniendo como base papel Kraft, fue cambiada constantemente y volteando la muestra para un secado uniforme, evitando el deterioro por la humedad y separando aquellas que cambien de color o muestren signos de alteración. Una vez secada la muestra, se trituró empleando un mortero, con la finalidad de reducir hasta un polvo fino y se procedió a realizar la preparación de los extractos hidroalcohólico. Para la identificación taxonómica se emplearon muestras con flores, vainas y hojas lo que corresponde a cada planta, lo cual se realizó en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas, con certificación a cargo de la Blga. Laura Aucasime Medina (Anexo 1, 2 y 3)

3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico.

Los 500 g de muestra seca y pulverizada de cada planta medicinal en estudio, se maceró en un frasco de vidrio color ámbar por siete días, para ello se utilizó 1 L de alcohol 80° y cubrir a la muestra por lo menos con 1 cm de diferencia; durante el proceso se agitó el frasco por 15 minutos dos veces al día para que el alcohol se distribuya homogéneamente en la muestra. Las muestras en maceración se mantuvieron en un lugar fresco y oscuro. Luego se procedió a filtrar con ayuda del papel filtro, finalmente se llevó a un evaporador rotatorio BUCHI-3000 a presión reducida y se concentró a sequedad en una estufa Memmert. A partir de las cuales se realizó el tamizaje fitoquímico.

3.3.3 Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait “yawar suqu”, *Piper elongatum* Vahl “matico” y *Xanthium catharticum* HBK “amor seco”.

Se realizó una marcha fitoquímica cualitativa a los extractos obtenidos de las plantas medicinales en estudio, para determinar la presencia de los diferentes metabolitos secundarios tales como: alcaloides, lactonas, cumarinas, flavonoides, quinonas, catequinas, saponinas, azúcares reductoras, taninos, fenoles, aminas, cardenólidos y resinas. Las reacciones de identificación se realizaron siguiendo la metodología propuesta.⁴⁰(Anexo N° 5).

La identificación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios se realizó mediante ensayos de coloración y precipitación.⁴⁰

a) Determinación de las características organolépticas

Color: Se tomó cantidad suficiente de muestra en un tubo de ensayo, esta fue colocada en un fondo blanco, para observar y determinar el color.

Olor: Se tomó cantidad suficiente de muestra en un tubo de ensayo, se percibió y se determinó el olor.

Sabor: Se tomó cantidad suficiente de muestra en un tubo de ensayo, para luego hacer contacto con la lengua y se determinó el gusto.

Aspecto: Se tomó cantidad suficiente de muestra en un tubo de ensayo, se observó y se determinó el aspecto.

b) Identificación de compuestos químicos

La identificación de los diferentes compuestos químicos (metabolitos secundarios) de los extractos hidroalcohólicos al 80% de *Oenothera rosea* Ait “yawar suqu”, *Piper elongatum* Vahl “matico” y *Xanthium catharticum* HBK “amor seco”, fueron realizadas siguiendo los procedimientos de Miranda M. y Cuellar A. del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana - Cuba.⁴⁰

c) Determinación de la solubilidad.

Solubilidad en agua: Se vertió en un tubo de ensayo 1 mL de agua destilada, luego se añadió 1 g de muestra, se agitó fuertemente, en caso de no disolverse se aumentó el disolvente a 10 mL, se agitó y observó, así sucesivamente para las tres muestras en estudio.

Solubilidad en alcohol: Se vertió en un tubo de ensayo 1 mL de alcohol etílico, luego añadimos 1 g de muestra, se agitó fuertemente, en caso de no disolverse aumentamos el disolvente a 10 mL se agitó y observó, así sucesivamente para las tres plantas en estudio.

3.4 Extracción de ADN genómico de linfocitos humanos:

A partir de ésta etapa, el estudio se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática; se consiguió la donación de una bolsa colectora de sangre "cuádruple" fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos (para desecho), del Banco de Sangre del Hospital Regional de Ayacucho "Miguel Ángel Mariscal Llerena", para la obtención del ADN genómico de linfocitos con el siguiente protocolo descrito en Miranda T.⁴¹

1. Se transfirió 1 mL de sangre (paquete globular) a un tubo de centrifuga con tapa rosca y se adicionó 9 mL del tampón Tris- HCL 50 mM (pH 7.7) precalentado a 37 °C.
2. Se homogenizó e incubó a 37 ° C por 30 minutos, se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos para sedimentar los linfocitos.
3. Se descartó el sobrenadante aspirándolo con una pipeta Pasteur, dejando 1 mL del centrifugado en la parte inferior del tubo.
4. Se repitió dos veces, los procedimientos 3 (esta vez con 5 mL de tampón Tris - HCl 50 mM (pH 7.7), 4 y 5 hasta tener un preparado claro.
5. Se adicionó 1 mL de centrifugado, 9 mL de solución salina (NaCl al 0.85%) se homogenizó y centrifugó a 2500 rpm/ 10 minutos.

6. Se aspiró y descartó el sobrenadante dejando sólo el sedimento, se resuspendió el paquete celular en 0.4 mL de la solución "high TE" (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 100 mM), luego se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
7. Se adicionó 0.4 mL de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 40 mM; SDS al 1%; NaCl 10 mM). precalentada a 50 °C.
8. Se agregó 7 µL de la solución de proteinasa K (20 mg/mL) y se incubó por una noche a 53 °C.
9. Luego se adicionó 750 µL de la solución cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1) y homogenizó por inversión, delicadamente durante 10 minutos.
10. Se instaló el tubo en la microcentrífuga por 10 minutos a 14000 rpm para separar las fases, luego se aspiró la fase superior acuosa que contiene el DNA y transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5 mL.
11. A la fase acuosa, se adicionó 750 µL de la solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y homogenizó por inversión durante 5 minutos. Nuevamente se centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm, se aspiró la fase acuosa que contiene el DNA y transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2 mL.
12. Se adicionó la solución de acetato de sodio 3M, pH 5.2. en cantidad de 20 µL.
13. Se agregó 600 µL de alcohol isopropílico helado y dejó en reposo por 1 hora en hielo. Luego se centrifugó por 15 minutos a 14000 rpm.
14. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y enjuagó el sedimento con 1 mL de etanol al 70%.
15. Se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 14000 rpm. eliminando el alcohol y dejando secar el sedimento a temperatura ambiente.
16. Se resuspendió el sedimento con 80 µL de la solución "low TE" (Tris HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM) y se guardó en la nevera.

3.5 Cuantificación de ADN genómico de linfocito humano extraído

3.5.1 Por espectrofotometría

Procedimiento:

1. Se homogenizó las muestras de ADN con una micropipeta de 100 μL , manteniendo el tip dentro de la muestra, luego presionando y retrocediendo el pulsador lentamente de manera uniforme unas 20 veces.
2. Se preparó el espectrofotómetro UV marca Eppendorf BioPhotometer plus, con la opción de cuantificación de ADN.
3. Para limpiar la superficie de muestra del adaptador se depositó 2 μL de agua PCR por un minuto y se absorbió el agua utilizando papel "tissue".
4. Nuevamente se depositó 2 μL de agua PCR sobre la superficie del adaptador, se colocó la tapa de 10 – Lp 0,2 mm y se presionó la opción BLANK para calibrar y obtener "cero de Absorbancia" (0,000 A°).
5. Se absorbió el agua utilizando papel "tissue", luego se depositó 2 μL de la muestra de ADN, se colocó la tapa y presionó la opción SAMPLE para ver el resultado de la cuantificación y pureza de ADN en la pantalla del equipo; luego se absorbió la muestra con papel "tissue".
6. Se repitió los pasos 4 y 5 para la cuantificación de cada muestra de ADN.
7. Terminada la cuantificación de ADN, se depositó 2 μL de agua PCR, se dejó por un minuto luego se secó con papel "tissue" y apagó el equipo.

3.6. Ensayos de la genotoxicidad "in vitro":

Se desarrolló siguiendo el "método Tomasevich" propuesto por Miranda⁴¹; con las siguientes fases:

3.6.1. Fase I: Cuantificación y preparación de Stock de ADN genómico de linfocitos humano

El ADN genómico de linfocitos humanos obtenido, fue cuantificado por espectrofotometría UV en Eppendorf BioPhotometer plus; luego se preparó un

stock a concentración de 1000 ng/ μ L en volumen final de 150 μ L, para cada planta medicinal en estudio.

3.6.2 Fase II: Prueba de genotoxicidad "in vitro" de ADN genómico de linfocitos humano

Se preparó las soluciones de los extractos hidroalcohólico de cada planta medicinal, a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, con agua bidestilada estéril.

Se acondicionó las soluciones de genotoxicidad "in vitro" de los extractos de las plantas medicinales en estudio, con ADN genómico de linfocitos humanos, de acuerdo al detalle siguiente:

Tabla 1. Preparación de las soluciones para la prueba de genotoxicidad "in vitro" en ADN genómico, por efecto de extracto hidroalcohólico de plantas medicinales. Ayacucho 2013

CONDICIONES	SOLUCIONES PARA PRUEBA DE GENOTOXICIDAD "in vitro"									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Nº de tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Stock de ADN (1 000 ng/ μ L) Volumen en μ L	14	14	14	14	14	14	14	14	14	
Extracto hidroalcohólico	Concentración (mg/mL)	5	10	50	100	5	10	50	100	-
	Volumen (μ L)	6	6	6	6	6	6	6	6	-
Agua bidestilada estéril	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
Volumen total (μ L)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Incubación a 37°C (h)		1					4			-

Se realizaron 4 repeticiones de las pruebas de genotoxicidad "in vitro", de cada planta medicinal en estudio.

3.6.3 Fase III: Electroforesis para la detección de genotoxicidad

Se preparó el gel de agarosa a 1% y se dispuso en una cámara de electroforesis Biometra.

Para el volumen de carga en gel de agarosa, se utilizó las siguientes cantidades: 1 μL de loading (colorante señalizador de migración de las bandas), 4 μL de la solución para la prueba de genotoxicidad "*in vitro*" y 2 μL de agua bidestilada estéril, volumen final 7 μL ; se mezcló y se cargó en el respectivo pozo del gel de agarosa para electroforesis.

Se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y programó a 30 voltios (V) por 5 horas.

3.6.4 Fase IV: Radiación UV para la visualización de genotoxicidad

Luego del tiempo de corrido electroforético, se sumergió el gel de agarosa en una solución de bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos aproximadamente, se enjuagó con agua corriente dos veces y para visualizar las bandas y/o fragmentos de ADN productos de la genotoxicidad, se colocó el gel en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra *UVsolo TS*.

3.6.5 Fase V: Interpretación y clasificación del registro visual de genotoxicidad

La escala de los valores numéricos correspondientes a los niveles de fragmentación del ADN como producto de la genotoxicidad, visualizados en el registro fotográfico, fueron basados en la clasificación del "*ensayo cometa*"

Tabla 2. Valoración numérica de la genotoxicidad.

CLASE	GENOTOXICIDAD
0	Fragmentación de ADN < 5%
1	Fragmentación de ADN entre 5 a 20%
2	Fragmentación de ADN entre 20 a 40%
3	Fragmentación de ADN entre 40 a 95%
4	Fragmentación de ADN > 95%

3.7. Análisis de datos

Los datos fueron agrupados y presentados en tablas, expresados en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. Se aplicó la prueba de Mann-Whitney y prueba de Kruskal-Wallis a un nivel de significancia del 95% para el análisis de los resultados de la genotoxicidad, con valores numéricos que indican esta actividad de las plantas medicinales en estudio, sobre el ADN genómico de linfocitos humano.

IV. RESULTADOS

Tabla 3: Características fisicoquímicas de los extractos hidroalcohólicos de *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho, 2013

CARACTERÍSTICAS	ENSAYOS	RESULTADOS		
		"yawar suqu"	"matico"	"amor seco"
FISICOQUIMICAS				
	Color	verde oscuro	verde oscuro	verde claro
	Olor	suigeneris	suigeneris	Suigeneris
ORGANOLÉPTICO				
	Sabor	Amargo	Amargo	Amargo
	Aspecto	mucilaginoso	mucilaginoso	Mucilaginoso
	Agua	poco soluble	poco soluble	poco soluble
SOLUBILIDAD				
	Metanol	soluble	soluble	Soluble
	Cloroformo	muy soluble	muy soluble	muy soluble

Tabla 4: Identificación cualitativa de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu". Ayacucho 2013.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Wagner	+++	Turbidez
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	++	precipitado naranja
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+++	azul intensa
Flavonoides	Shinoda	+++	coloración amarilla
Quinonas	Borntrager	+	turbidez
Glicósidos cardiotónicos	Kedde	++	Coloración naranja

Leyenda:

- (+) : Leve
- (++) : Moderada
- (+++): Abundante

Tabla 5: Identificación cualitativa de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Piper elongatum* Vahl "matico". Ayacucho 2013.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Wagner	+++	Turbidez
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	+++	Precipitado marrón
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+++	Coloración azul
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración naranja
Quinonas	Borntrager	++	Coloración roja
Glicósidos cardiotónicos	Kedde	++	Coloración azul

Leyenda:

- (+) : Leve
- (++) : Moderada
- (+++): Abundante

Tabla 6: Identificación cualitativa de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho 2013.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Wagner	+++	Turbidez
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+	coloración oscura
Flavonoides	Shinoda	+++	coloración verde amarillento
Quinonas	Borntrager	++	coloración naranja

Leyenda:

(+) : Leve

(++) : Moderada

(+++): Abundante

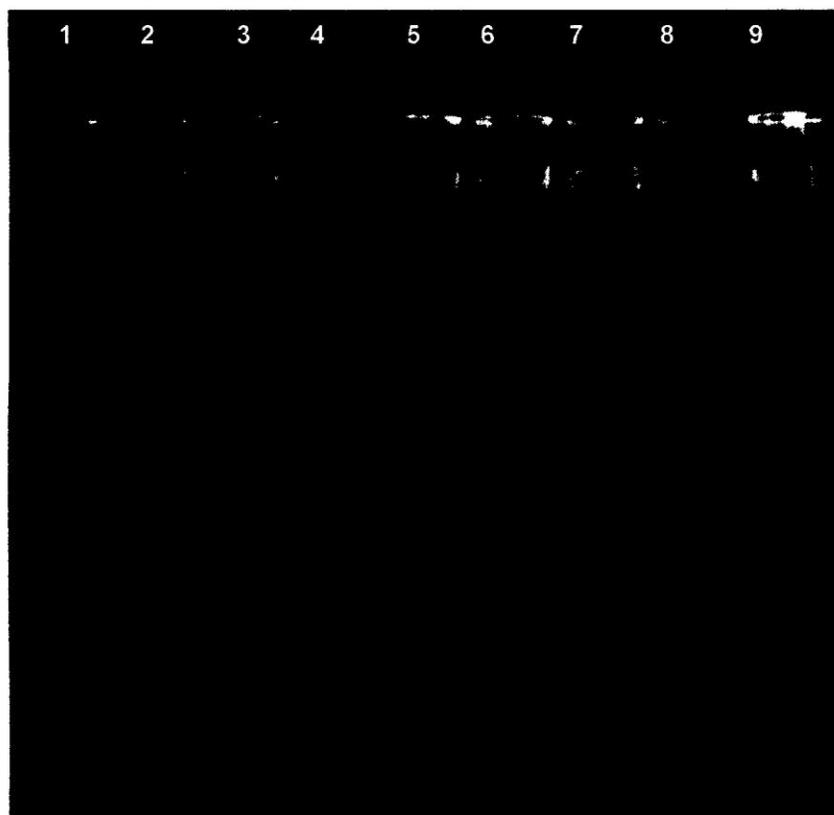
Tabla 7. Cuantificación por espectrofotometría ultra violeta de ADN genómico extraído de linfocitos humanos. Ayacucho 2013.

Muestra	Concentración ADN $\mu\text{g/ml}$	ADN	PROTEINAS	PUREZA DE ADN
		A 260	A 280	A260/A280
1	1 000	0,583	0,300	1,94
2	1 000	0,654	0,352	1,86

Leyenda:

A 260 : Absorbancia de la luz a 260 nanómetros de longitud de onda.

A 280 : Absorbancia de la luz a 280 nanómetros de longitud de onda.



Leyenda:

- Carril 1: Con 5 mg/mL del extracto, durante 1 hora.
- Carril 2: Con 10 mg/mL del extracto, durante 1 hora.
- Carril 3: Con 50 mg/mL del extracto, durante 1 hora.
- Carril 4: Con 100 mg/mL del extracto, durante 1 hora.
- Carril 5: Con 5 mg/mL del extracto, durante 4 horas.
- Carril 6: Con 10 mg/mL del extracto, durante 4 horas.
- Carril 7: Con 50 mg/mL del extracto, durante 4 horas.
- Carril 8: Con 100 mg/mL del extracto, durante 4 horas.
- Carril 9: ADN de linfocitos humanos a 1 000 ng/ μ L (control).

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, con extracto hidroalcohólico al 80% de *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu". Ayacucho 2013.

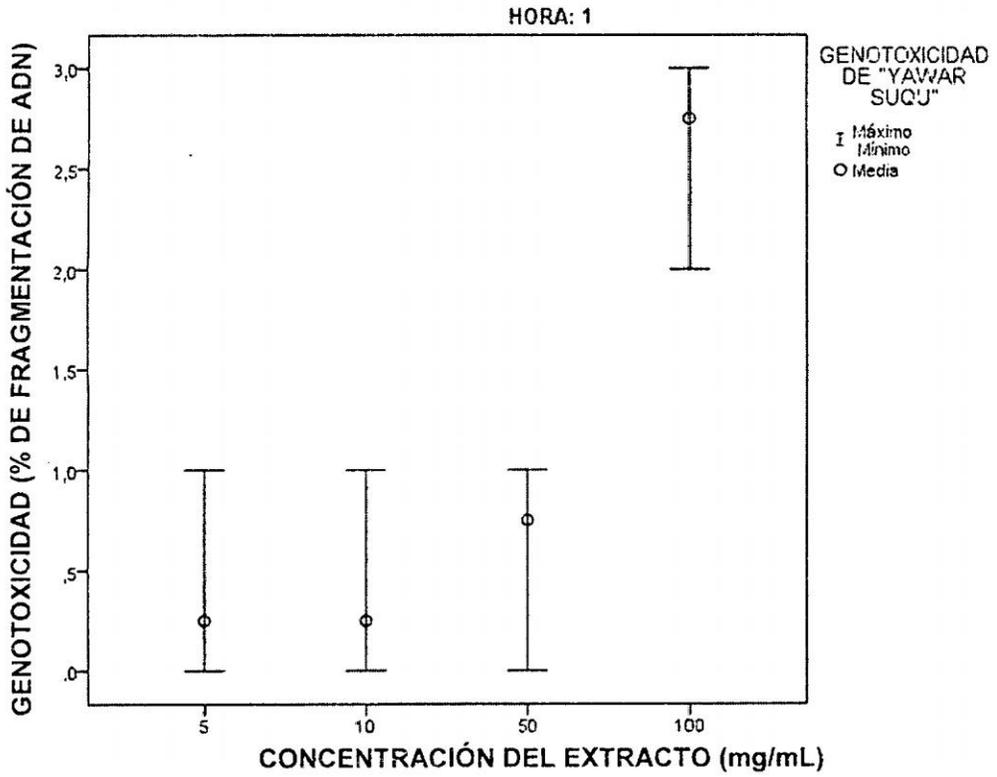


Figura 2. Genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, con extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu". Ayacucho 2013.

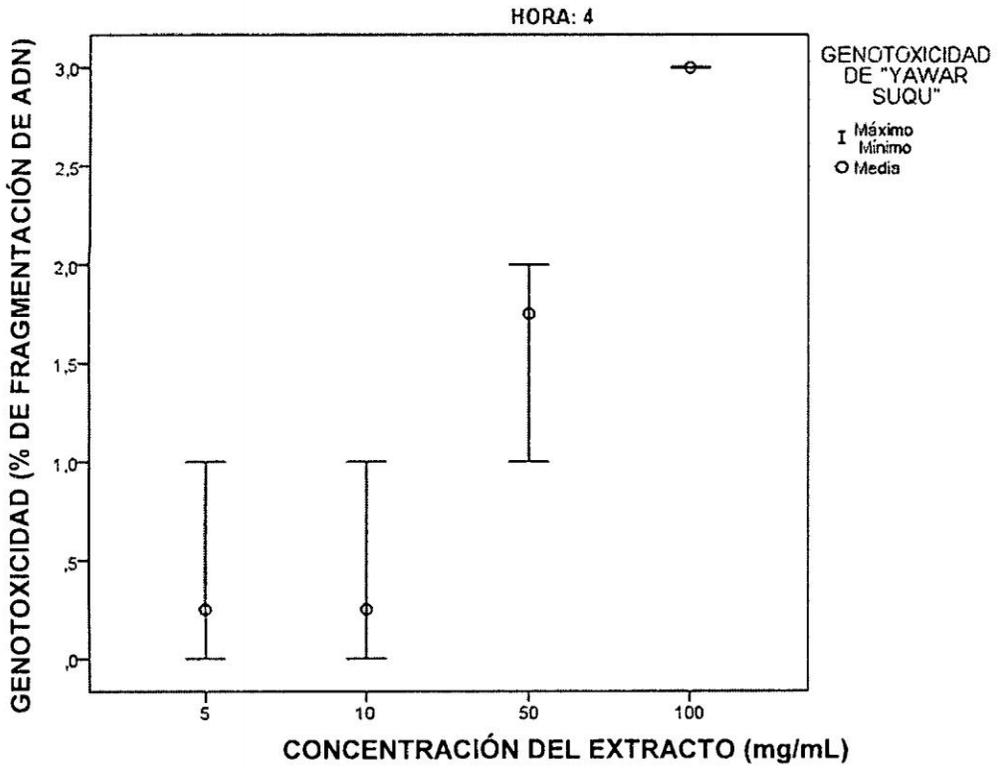
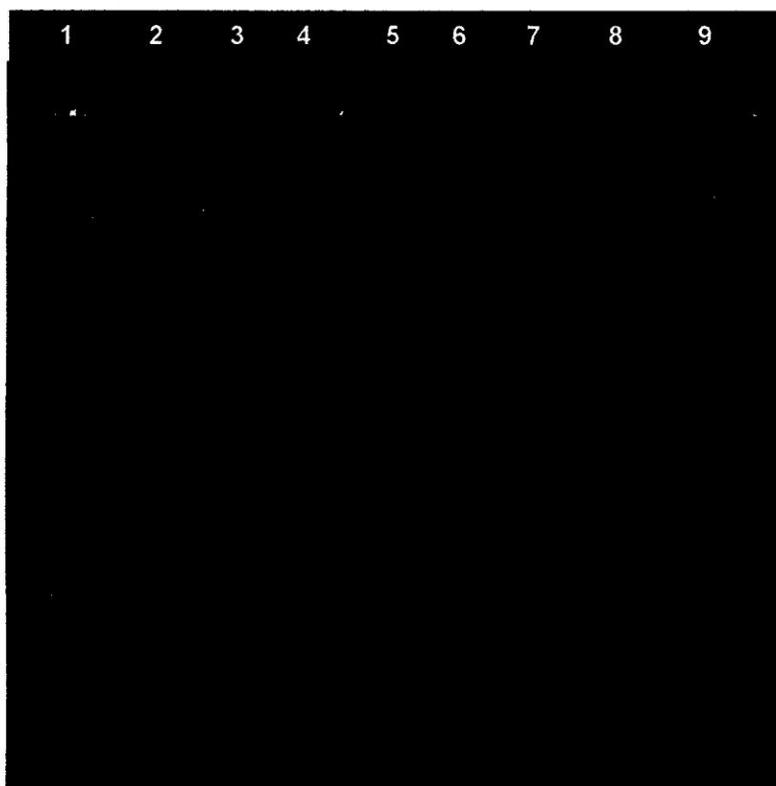


Figura 3. Genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, con extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea Ait* "yawar suqu". Ayacucho 2013.



Leyenda:

Carril 1: Con 5 mg/mL del extracto, durante 1 hora.

Carril 2: Con 10 mg/mL del extracto, durante 1 hora.

Carril 3: Con 50 mg/mL del extracto, durante 1 hora.

Carril 4: Con 100 mg/mL del extracto, durante 1 hora.

Carril 5: Con 5 mg/mL del extracto, durante 4 horas.

Carril 6: Con 10 mg/mL del extracto, durante 4 horas.

Carril 7: Con 50 mg/mL del extracto, durante 4 horas.

Carril 8: Con 100 mg/mL del extracto, durante 4 horas.

Carril 9: ADN de linfocitos humanos a 1 000 ng/ μ L (control).

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, con extracto hidroalcohólico al 80% de *Piper elongatum Vahl* "matico". Ayacucho 2013.

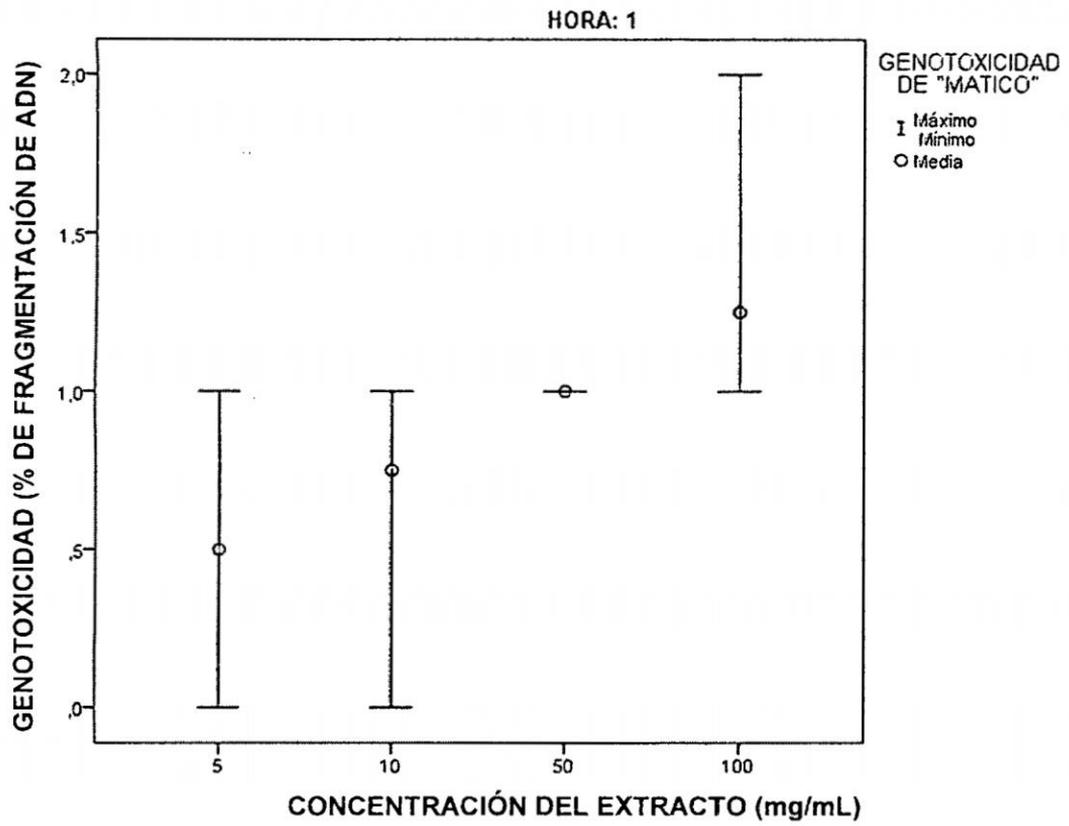


Figura 5. Genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, con extracto hidroalcohólico de *Piper elongatum* Vahl "matico". Ayacucho 2013.

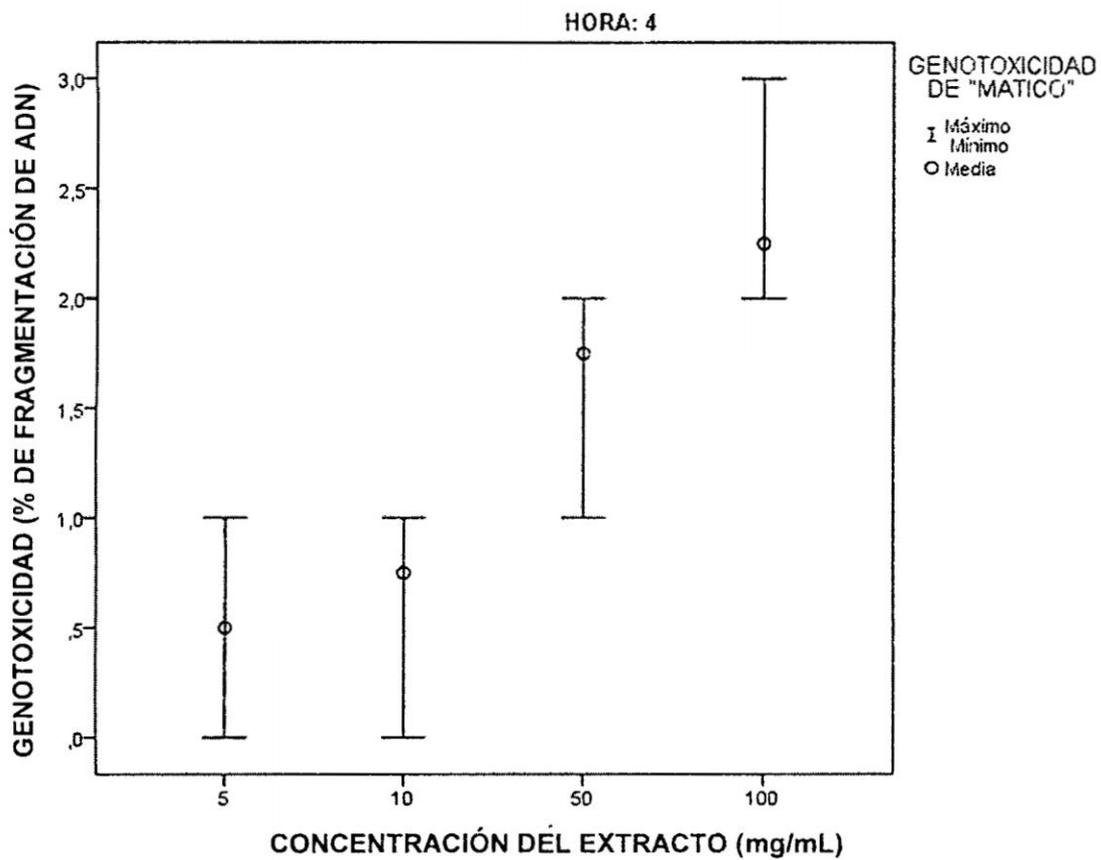
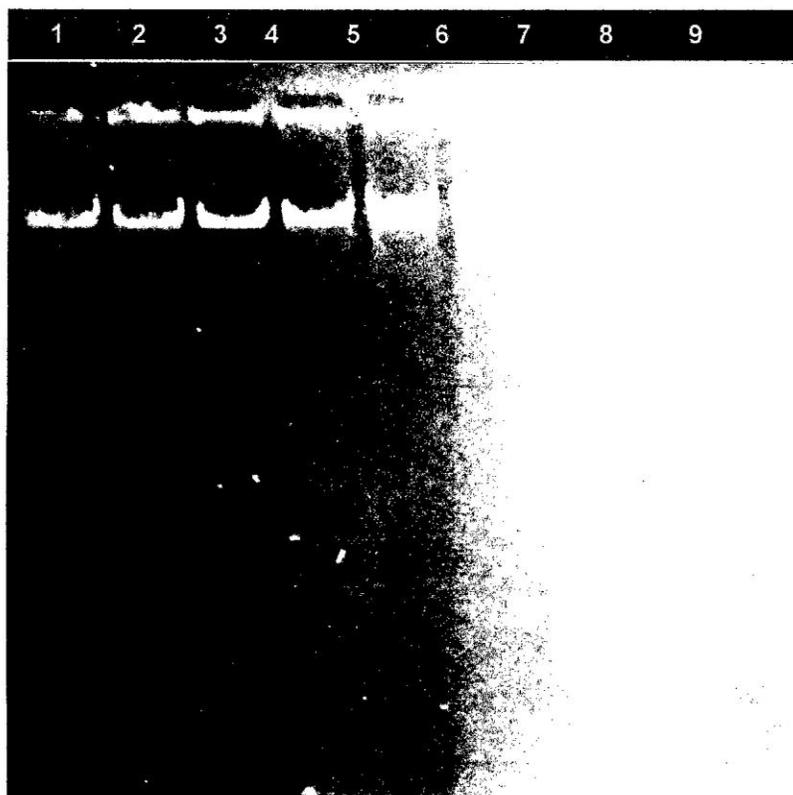


Figura 6. Genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, con extracto hidroalcohólico de *Piper elongatum Vahl* "matico". Ayacucho 2013.



Leyenda:

- Carril 1: Con 5 mg/mL del extracto, durante 1 hora.
- Carril 2: Con 10 mg/mL del extracto, durante 1 hora.
- Carril 3: Con 50 mg/mL del extracto, durante 1 hora.
- Carril 4: Con 100 mg/mL del extracto, durante 1 hora.
- Carril 5: Con 5 mg/mL del extracto, durante 4 horas.
- Carril 6: Con 10 mg/mL del extracto, durante 4 horas.
- Carril 7: Con 50 mg/mL del extracto, durante 4 horas.
- Carril 8: Con 100 mg/mL del extracto, durante 4 horas.
- Carril 9: ADN genómico de linfocitos humanos a 1 000 ng/μL (control)

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, con extracto hidroalcohólico al 80% de *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho 2013.

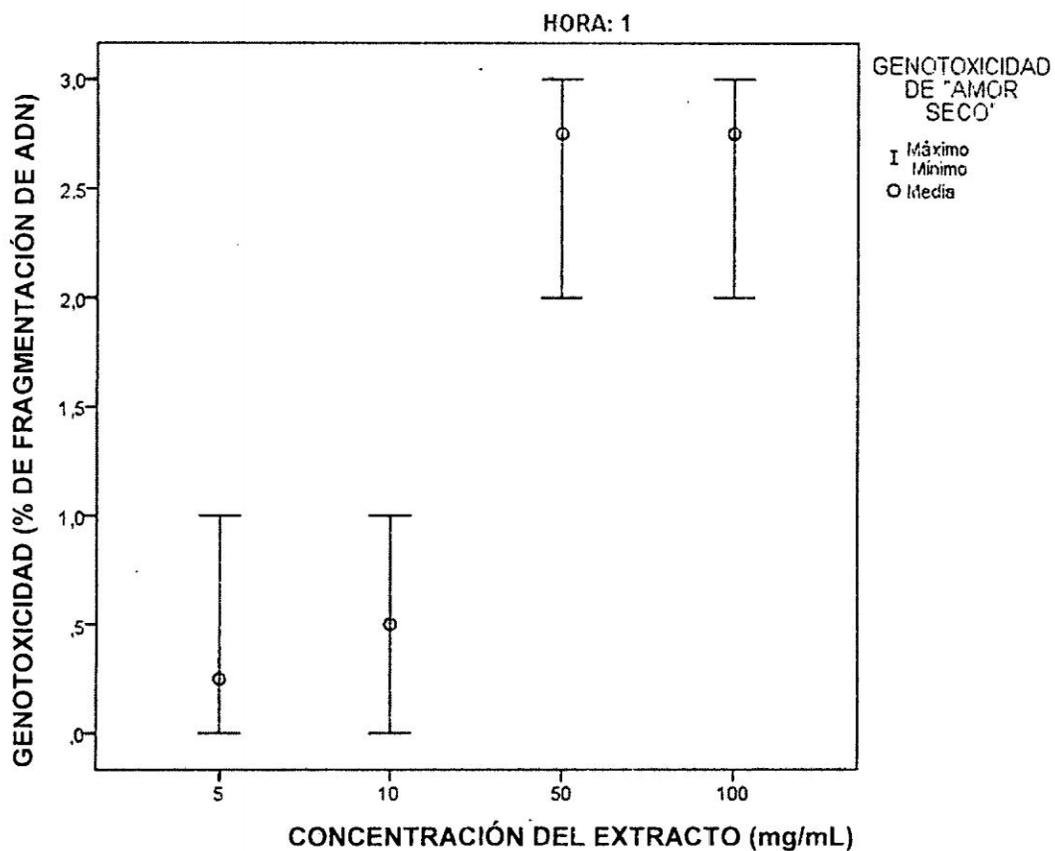


Figura 8. Genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, con extracto hidroalcohólico de *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho 2013.

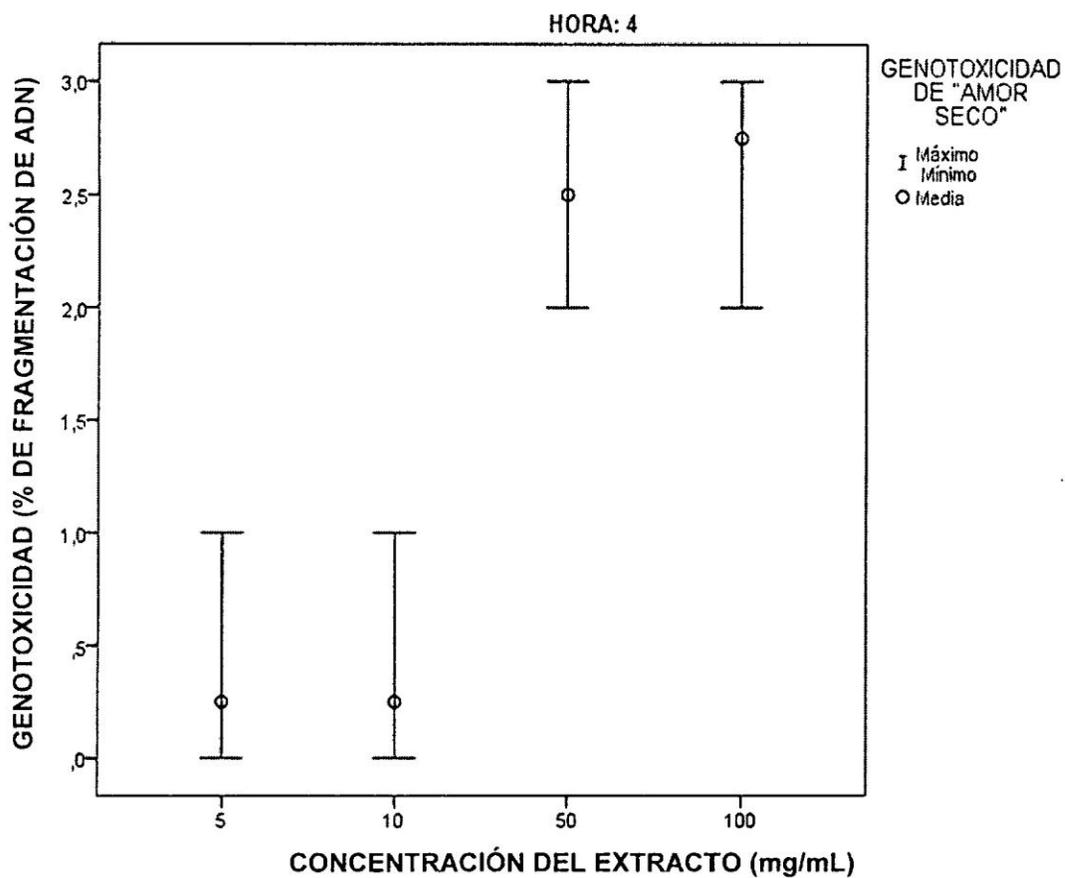


Figura 9. Genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, con extracto hidroalcohólico de *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho 2013.

V. DISCUSIÓN

La evaluación genotóxica de plantas medicinales deben ser realizadas, en primera instancia, mediante ensayos "*in vitro*" si es que resultara negativo se prosigue con el ensayo "*in vivo*", para demostrar el daño a nivel del ADN.²²

La tabla 3, muestra los resultados de los ensayos organolépticos realizado a las tres especies en estudio, se pudo determinar de que el extracto hidroalcohólico de "amor seco" es de color mucho más claro que el "yawar suqu" y el "matico"; respecto al olor las tres especies tienen la misma característica, al sabor las tres especies son muy amargas y al aspecto son muy mucilaginosos; para el ensayo de solubilidad se pudo determinar que las tres especies son poco solubles en agua, pero si muy solubles en solventes orgánicos como el alcohol y cloroformo.

En el tamizaje fitoquímico realizado a *Oenothera rosea Ait* "yawar suqu" se puede notar en la tabla 4, se observa presencia abundante de alcaloides, fenoles, taninos, flavonoides seguido de una moderada presencia de glicósidos cardiotónicos, lactonas y cumarinas a su vez una leve cantidad de quinonas.

Al realizar el tamizaje fitoquímico de *Piper elongatum Vahl* "matico" se puede observar en la tabla 4 la abundante presencia de metabolitos secundarios tales como alcaloides, lactonas, taninos, flavonoides y moderada cantidad de quinonas y glicósidos cardiotónicos.

En el tamizaje fitoquímico realizado a *Xanthium catharticum HBK* "amor seco" se puede notar en la tabla 6 la presencia abundante de alcaloides y flavonoides

seguido de la moderada cantidad de quinonas a su vez una leve cantidad de fenoles.

La figura 1 muestra los registros fotográficos de electroforesis en gel de agarosa al 1% de la genotoxicidad de ADN genómico de linfocitos humanos de 1000 ng/ μ L, por efecto del extracto hidroalcohólico obtenido de *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL con dos tiempos de incubación a 37 °C, cuanto menor es la concentración del extracto como en los carriles 1, 2 y 3 con 5 mg/mL, 10 mg/mL y 50 mg/mL la genotoxicidad es mínima (menor de 5%), mientras que con 100 mg/mL durante una hora, la fragmentación del ADN es entre 20% a 40%. Se puede observar además, con cuatro horas de incubación, la fragmentación es similar entre 5 mg/mL, 10 mg/mL y 50 mg/mL (menor a 5%), pero a concentración de 100 mg/ml la fragmentación del ADN es entre 20% a 40%, se puede apreciar que presenta ligeramente mayor degradación que a una hora de incubación. Se puede observar las "colas" con fragmentos tenues en cada carril dependiendo directamente de su cantidad, tamaño y referente a la concentración del extracto, el carril 9 muestra el corrido de ADN control a 1 000 ng/ μ L con el que se empezó a trabajar la genotoxicidad. Esta fotografía revela el efecto genotóxico visible a concentración de 100 mg/ml del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", siendo ligeramente mayor a cuatro horas de incubación respecto a una hora.

Al analizar de manera general los dos tiempos de incubación con la prueba de Mann-Whitney (Anexo 18) podemos corroborar que el tiempo no influye en el efecto genotóxico ($p=0,501$) del extracto de *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu"; como se observa en las figuras 2 y 3, que a menor tiempo de incubación la genotoxicidad es muy notoria. Mientras que la concentración es muy influyente en el efecto genotóxico del "yawar suqu", ($p=0,000$). (Anexo19).

La figura 4 muestra la gráfica de genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano, con extracto de *Oenothera rosea Ait* "yawar suqu" a diferentes concentraciones, durante una hora y cuatro horas de incubación a 37 °C, que resulta ($p=0,013$) y ($p=0,004$), respectivamente, por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 20).

Tobe, en su estudio de la parte aérea de la especie *Oenothera rosea Ait*, se midió su actividad antibacteriana y su toxicidad frente a *Artemia salina*. Dentro de los grupos de metabolitos secundarios se determinó presencia de alcaloides, flavonoides, terpenos, esteroides y glicósidos. Detectaron alcaloides en el extracto hexánico de *Oenothera rosea Ait* la planta presentó actividad antibacteriana frente a las especies de prueba y toxicidad frente a *Artemia salina*. Muriel⁷, en un estudio de *Oenothera rosea Ait* se reportó la presencia de flavonoides, y demostró la actividad antiinflamatoria de extractos acuosos encontrándose mayor eficacia antiinflamatoria a 250 mg/Kg. de peso en cobayos, respecto a la actividad hepatoprotectora contra el daño producido por el paracetamol, se concluye que se obtienen mejores resultados a la dosis de 250 mg/Kg del extracto acuoso liofilizado.

Everett⁸, realizó un estudio sobre la bioactividad y toxicidad de las hojas y tallos de *Oenothera rosea Ait* en extractos acuosos y hidroalcohólico, concluyendo que son ligeramente tóxicos.

El registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1% de la figura 4, son productos de la genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos a 1 000 ng/ μ L por efectos del extracto hidroalcohólico de *Piper elongatum Vahl* "matico", a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL en dos tiempos de incubación a 37 °C, podemos observar que la intensidad del color de las bandas de ADN se mantienen casi homogéneamente, pero de los carriles 1, 2, 3 y 4 muestran fragmentos de ADN que se expanden en la trayectoria de los

carriles en forma de "colas", cada vez más largas en proporción a la cantidad, siendo éstas "colas" más notorias en los carriles 5, 6, 7 y 8 que gradualmente son más largas, directamente proporcional a la cantidad de ADN fragmentado dependiendo directamente de la concentración de los extractos; el carril 9 es el ADN control mostrando la concentración de 1 000 ng/μL, con la cual se inició el proceso de ensayo de genotoxicidad. Esta fotografía nos revela el débil efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico de *Piper elongatum Vahl* "matico" en las cuatro concentraciones con las que se desarrolló este ensayo.

Al analizar de manera general los dos tiempos de incubación con la prueba de Mann-Whitney (Anexo 18) podemos corroborar que el tiempo no influye en el efecto genotóxico ($p=0,097$) del extracto hidroalcohólico de *Piper elongatum Vahl* "matico"; como se observa en las figuras 5 y 6, que a menor tiempo de incubación la genotoxicidad es muy notoria. Mientras que la concentración es muy influyente en el efecto genotóxico del "matico", ($p=0,002$). (Anexo19).

La figura 4 muestra la gráfica de genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano, con extracto hidroalcohólico de *Piper elongatum Vahl* "matico" a diferentes concentraciones, durante una hora y cuatro horas de incubación a 37°C, que resulta ($p=0,173$) y ($p=0,010$), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 20).

El registro fotográfico de la figura 7, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de linfocitos humanos a concentración inicial de 1 000 ng/μL, por efecto del extracto hidroalcohólico de *Xanthium catharticum HBK* "amor seco" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, que fueron realizados con dos tiempos de incubación a 37°C; los carriles 1 y 2 muestran el producto de la genotoxicidad con fragmentación menor a 5%, los carriles 3 y 4 muestran fragmentación entre 20% a 40%, durante una hora de

incubación. Los carriles 5, 6, 7 y 8 muestran productos de la genotoxicidad durante cuatro horas de incubación, podemos observar que existen una ligera disminución en la intensidad del color que va directamente proporcional a la concentración de ADN, igualmente los carriles 5 y 6 con fragmentación menores a 5%, los carriles 7 y 8 entre 20 a 40% de fragmentación, pero aparentemente con menor fragmentación que los carriles 3 y 4 que tienen la misma concentración de extractos y solo una hora de incubación, esto podría deberse a variaciones en el pulso cuando se manipula la micropipeta; el carril 9 muestra el corrido de ADN control a 1 000 ng/μL con el que se empezó a trabajar la genotoxicidad. Esta fotografía revela el efecto genotóxico visible a concentraciones de 50 mg/mL y 100 mg/mL del extracto hidroalcohólico de *Xanthium catharticum HBK* "amor seco".

Al analizar de manera general los dos tiempos de incubación con la prueba de Mann-Whitney (Anexo 18) podemos corroborar que el tiempo no influye en el efecto genotóxico ($p=0,752$) del extracto de *Xanthium catharticum HBK* "amor seco"; como se observa en las figuras 8 y 9, que a menor tiempo de incubación la genotoxicidad es muy notoria. Mientras que la concentración es muy influyente en el efecto genotóxico de la "amor seco", ($p=0,000$). (Anexo19).

La figura 7 muestra la gráfica de genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano, con extracto de *Xanthium catharticum HBK* "amor seco" a diferentes concentraciones, durante una hora y cuatro horas de incubación a 37°C, que resulta ($p=0,006$) y ($p=0,006$), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 20).

VI. CONCLUSIÓN

- El extracto hidroalcohólico de las plantas medicinales antiinflamatorias *Oenothera rosea* Ait “yawar suqu”, *Piper elongatum* Vahl “matico” y *Xanthium catharticum* HBK “amor seco”, presentan efecto genotóxico *in vitro* sobre el ADN genómico de linfocitos humano.
- Los metabolitos secundarios identificados en extractos hidroalcohólicos de: “yawar suqu” y “matico” fueron alcaloides, lactonas y/o cumarinas, fenoles y/o taninos, flavonoides, quinonas y glicósidos cardiotónicos; y en extracto hidroalcohólico de “amor seco” alcaloides, fenoles y/o taninos, flavonoides y quinonas; las tres plantas presentan las mismas características organolépticas y de solubilidad.
- En el efecto de la genotoxicidad del látex de “yawar suqu”, “matico” y “amor seco”; no influyen ($p=0,501$, $p=0,097$ y $p=0,752$) los tiempos de incubación, pero sí ($p=0,000$, $p=0,002$ y $p=0,000$) la concentración del extracto.

VII. RECOMENDACIONES

- Desarrollar trabajos de genotoxicidad en cultivos celulares con el “*ensayo cometa*” y ensayos “*in vivo*” para continuar con el conocimiento de estos efectos.
- Ampliar estudios de genotoxicidad con otras plantas medicinales de uso común en nuestra sociedad.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cytel A, Manual de Técnicas de Investigación. Programa Iberoamericano de ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Sub programa X. Química Fina Farmacéutica. 1995.
2. Ángel A. Evaluación de la actividad genotóxica de propóleos recolectados en diferentes apiarios de Cundimarca y Boyacá. [tesis maestría]. Bogotá. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. 2012.
3. García A, Avila Y, Alonso L, López P, Ruiz A, y Morón F. Reacciones adversas reportadas por consumo de productos naturales en Cuba durante 2003 y 2007. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14, 1-11. 2009
4. Carballo M, Cortada C, y Galano A. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. *Theoria: Revista teoría, historia y fundamentos de la Ciencia*, 14, 95-108. 2005
5. Henríquez P y Mahabir P. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Convenio Andrés Bello (CAB) y el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología (CYTED).1998
6. Tobe H, Wagner L y Chin H. Systematic and evolutionary studies of *Oenothera* (Onagraceae): Seed-coat anatomy. *Bot. Gaz. (Crawfordsville)* 148: 235-257. 1987.
7. Muriel P. and Suárez O. "El papel de la lipoperoxidación en el modelo de daño hepático inducido por la obstrucción biliar en la rata". XVI Congreso Nacional de Farmacología. Guanajuato, Gto. November 14-18, 1993.
8. Averett E, Huang S, and Wagner L. Flavonoid analysis of *Oenothera speciosa* (Onagraceae). *Southw. Naturalist*. 32: 117-120. 1987.
9. Martins C, Pansera E, Braccini K, Vinícius M, Batista J, Souza de Oliveira L. *In vivo* and *in vitro* genotoxicity studies of aqueous extract of *Xanthium spinosum*, Brazilian journal of pharmaceutical sciences[revista en internet] setiembre 2012 Vol. 48. Disponible en:
<http://www.scielo.br/pdf/bjps/v48n3/a13v48n3.pdf>.
10. Jiménez A, Pillco A, Flores N, Gonzáles E, Bermejo P. Evaluación genotóxica del aceite esencial y el extracto etanólico de *Piper elongatum Vahl*. *BIOFARBO*[revista en internet] Diciembre 2011 v.19 N.2. Disponible en:

http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S1813-53632011000200003&script=sci_arttext.

11. Espinosa F y Sarukhán J. Manual de Malezas del Valle de México. Claves, descripciones e ilustraciones. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 1997
12. Wolf R, Kleiman R, England E. "New Sources of Gamma-Linoleic Acid". Oil Chem. Soc. 60, pp. 1958-1860. 1983
13. Averett E, Huang S, and Wagner L. Flavonoid analysis of *Oenothera speciosa* (Onagraceae). Southw. Naturalist. 32: 117-120. 1987.
14. Flores E. «Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género *piper* de la flora Boliviana» Servicio de publicaciones Universidad de la Laguna – Bolivia 2007.
15. Hermosa R, Grondona I, Diaz-Minguez J, Iturriaga E y Monte E. Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of *trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Curr Genet* 38, 343-350. 2001.
16. Zevallos O. Tamizaje fitoquímico y evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de *piper elongatum* L. "matico" – Ayacucho 2003
17. Quispe M, Tamizaje fitoquímico y actividad antidiarreica de la part aérea del *Xanthium catarthicum* H.B.K. "amor seco" en cobayos Ayacucho - 2004
18. Diccionario Médico. Tercera edición Masson S.A. España. 1990.
19. Goodman A y Gillman Las bases Farmacológicas de la terapéutica, 9ª edición. McGraw-Hill Interamericana – México. 1996.
20. Lullman H, Mohr K, Ziegler A. Atlas de farmacología. Ediciones científicas y técnicas S.A. Barcelona. España Pág. 180 – 183. 1992.
21. Ganong W. Fisiología Médica 13 edición El Manual Moderno México. 1992.
22. García-Mol J. Cardiopatía isquémica: marcadores de la inflamación cardiovascular. Prensa médica extranjera. 1992.
23. Cotillo P. Farmacología Mecanismos de Acción Glosario. Edit Lluvia Editoras .64-65. 1998.
24. Litter M. Compendio de Farmacología. 4ta Edición tomo II. Edit. Reverte. España. 624-625. 1992.

25. Goodman G, Ruddon R, Molinoff P, Limbird L, Hardman J. Las Bases Farmacológicas de la terapéutica Ed. McGraw-Hill Interamericana 661-680. 1996.
26. Bjarnason I, Hsyllar J, Macpheson A, Russel A. Side effects of non steroidal antiinflammatory drugs an the small and large intestine. Gastroenterology. 104:832-847. 1993.
27. Robert A y Asano T. Resistance of germfree rats to indomethacin-induced ontestinal lesions. Prostaglandins. 14:333-341. 1997.
28. Timbrell J. Principles of Biochemical Toxicology, Taylor & Francis Nueva York 2000
29. Curtis H, Barnes S. Biología (6ª Ed.). Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires: 2000.
30. Abrevaya X, Carballo M, Mudry M. "Genetics and molecular biology" vol 30 Edit Sociedade Brasileira de Genética Brasil 2007.
31. Griffiths J, Gelbart M, Miller H, Lewontin C. "Genética Moderna" Editorial McGraw-Hill Interamericana. Nueva york 2000.
32. Huguet J, Iglesias G, Marrube G, Motter M, Paziencia N, Pinto G, Soria L." Guía de Lectura del curso de Genética Básica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires". Editorial BM Press Argentina 2007.
33. Teaf C. M., "Mutagenesis," in Industrial Toxicology Edit, Van Nostrand-Reinhold. New York, 1985.
34. Teaf C, Middendorf J. Mutagenesis and Genetic Toxicology. Ediciones P. L. Williams, R. C. James & S. M. Roberts (Eds.). New York: 2000.
35. PHILP J, CAMPBELL A, Leet C, Vincan E, Rockman SP, Whitehead RH, Thomas RJ, Philips WA. The Phosphadilinositol 3' kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors Cancer Res[revista en internet];OCTUBRE 2001 61:7426–7429 2013 Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606375>
36. Lehninger A, Nelson D, Cox M. Principios de Bioquímica. 2da. Edic. Barcelona. Ediciones Omega; España 1995.
37. Yoc A, Soto E, Gutiérrez J, Arriola M. Estudios de actividad biocida, citotóxica y genotóxica de tres plantas medicinales de la familia euphorbiaceae: *euphorbialancifolia*, *cnidoscolusaconitifolius* var. *mansa* y

- cnidoscolusaconitifolius* var. *estrella*. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos. Guatemala 2012. 15-16.
38. Carranza Z. Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del estado de Hidalgo más componentes en medio de cultivo sólido. Tesis. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias. Tulancingo de Bravo Hgo. 2006 (sambrook y Russell)
 39. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2da Edición. Fondo editorial; 1994.
 40. Miranda M, Cuellar A. Manual de Practicas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales Edit. Instituto de Farmacia y Alimentos – Universidad de la Habana. Habana – Cuba. 2000
 41. Miranda T, Valer G. Protocolos de Biología Molecular. Guía de Prácticas. Edit. Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2013.

ANEXO 1



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

C E R T I F I C A

Que, el Bach. en Farmacia y Bioquímica, Sr. Gabriel Misael, ALARCÓN GÓMEZ, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	MYRTALES
FAMILIA	:	ONAGRACEAE
GENERO	:	Oenothera
ESPECIE	:	<i>Oenothera rosea Ait.</i>
N.V.	:	"yawar suqu", "chupa sangre"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 07 de Octubre del 2013

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUAMANGENSIS

Bda. L. Nicastore Medina
JEFE

ANEXO 2



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

C E R T I F I C A

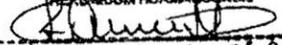
Que, el Bach. en Farmacia y Bioquímica, Sr. **Gabriel Misael, ALARCÓN GÓMEZ**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	MAGNOLIIDAE
ORDEN	:	PIPERALES
FAMILIA	:	PIPERACEAE
GENERO	:	Piper
ESPECIE	:	<i>Piper elongatum Vahl.</i>
N.V.	:	"matico"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 07 de Octubre del 2013

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUAMANGENSIS

B^lga. Laura Rocasme Medina
JEFE

ANEXO 3



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

C E R T I F I C A

Que, el Bach. en Farmacia y Bioquímica, Sr. Gabriel Mísael, ALARCÓN GÓMEZ, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	ASTERALES
FAMILIA	:	ASTERACEAE
GENERO	:	Xanthium
ESPECIE	:	<i>Xanthium catharticum</i> HBK..
N.V.	:	"amor seco"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 07 de Octubre del 2013

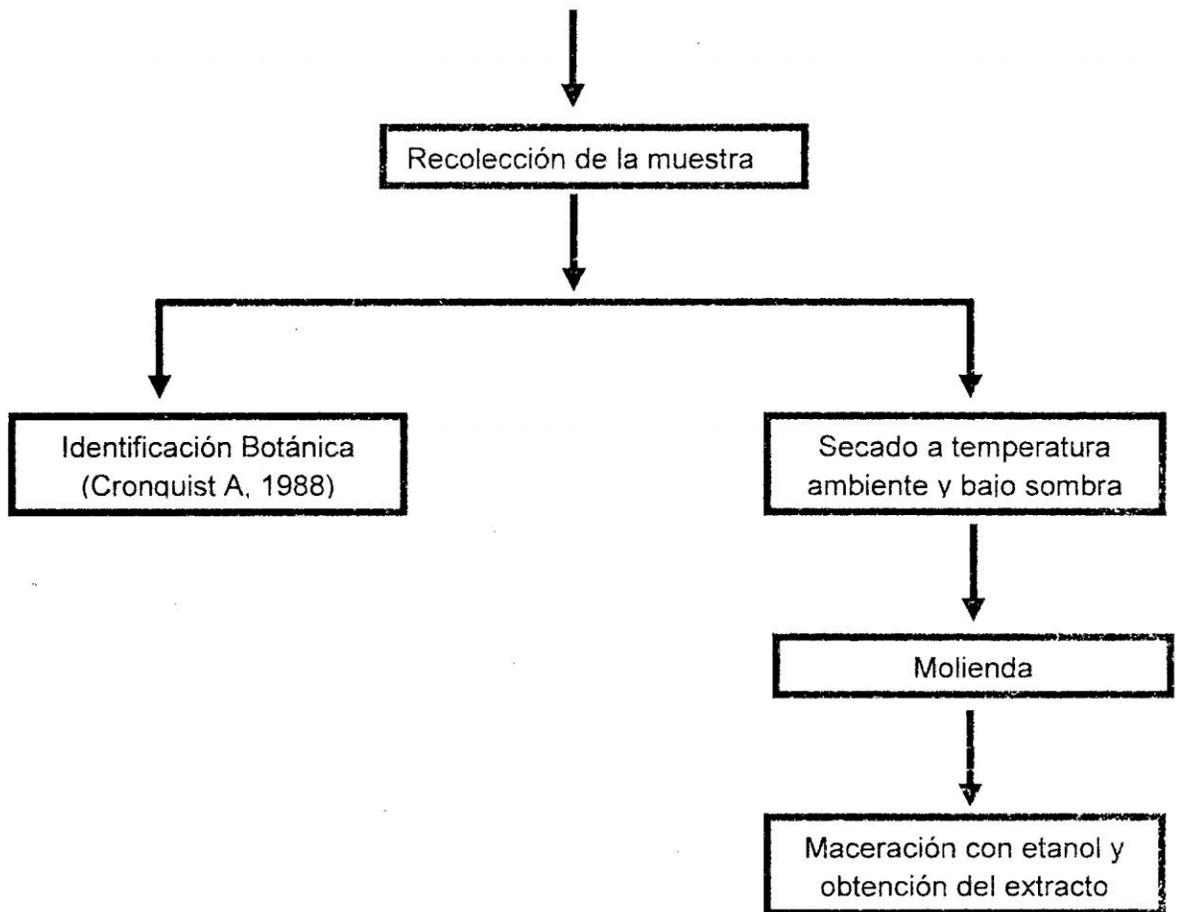
UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUAMANGENSIS

Blga. Laura Rocasolano Medina
JEFE

ANEXO 4

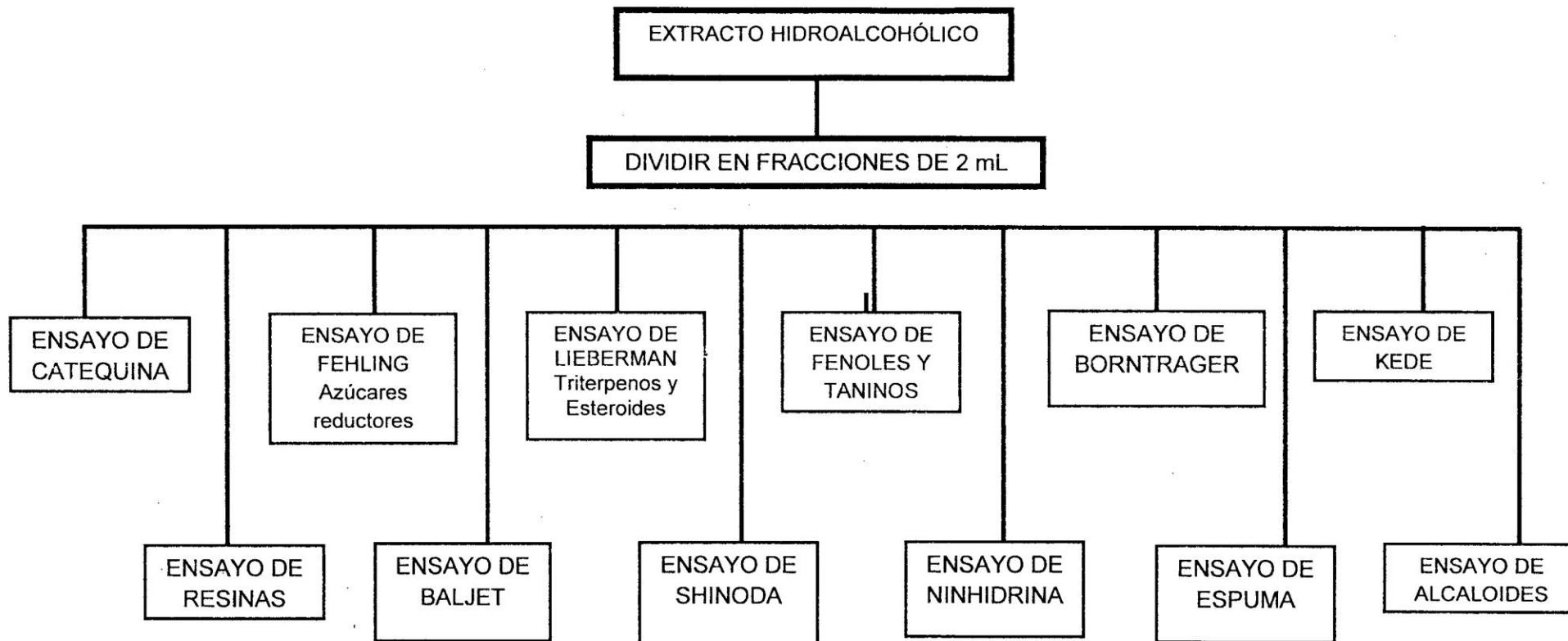
Protocolo de procedimiento muestral para la identificación y obtención de los extractos hidroalcohólicos de *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho 2013

(Hojas de *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco")

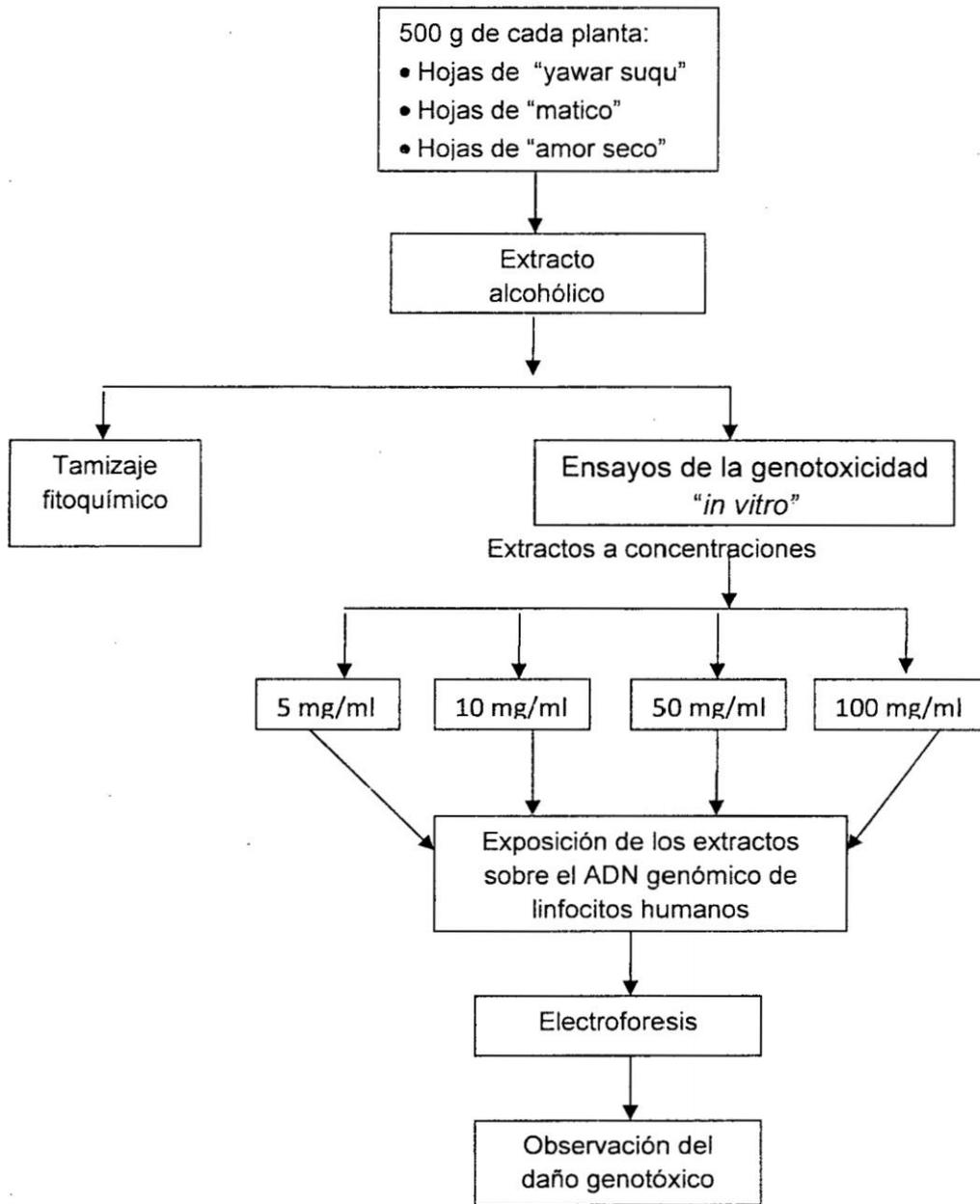


ANEXO 5

Tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos de las hojas de *Oenothera rosea* Ait “yawar suqu”, *Piper elongatum* Vahl “matico” y *Xanthium catharticum* HBK “amor seco”. Ayacucho 2013



Anexo 6



Flujograma del "Método Tomasevich" para determinar la actividad genotóxica "in vitro" de plantas medicinales propuesto por Miranda⁴¹. Ayacucho 2013

Anexo 7



Figura 10: Selección y secado de las muestras vegetales *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho 2013

Anexo 8

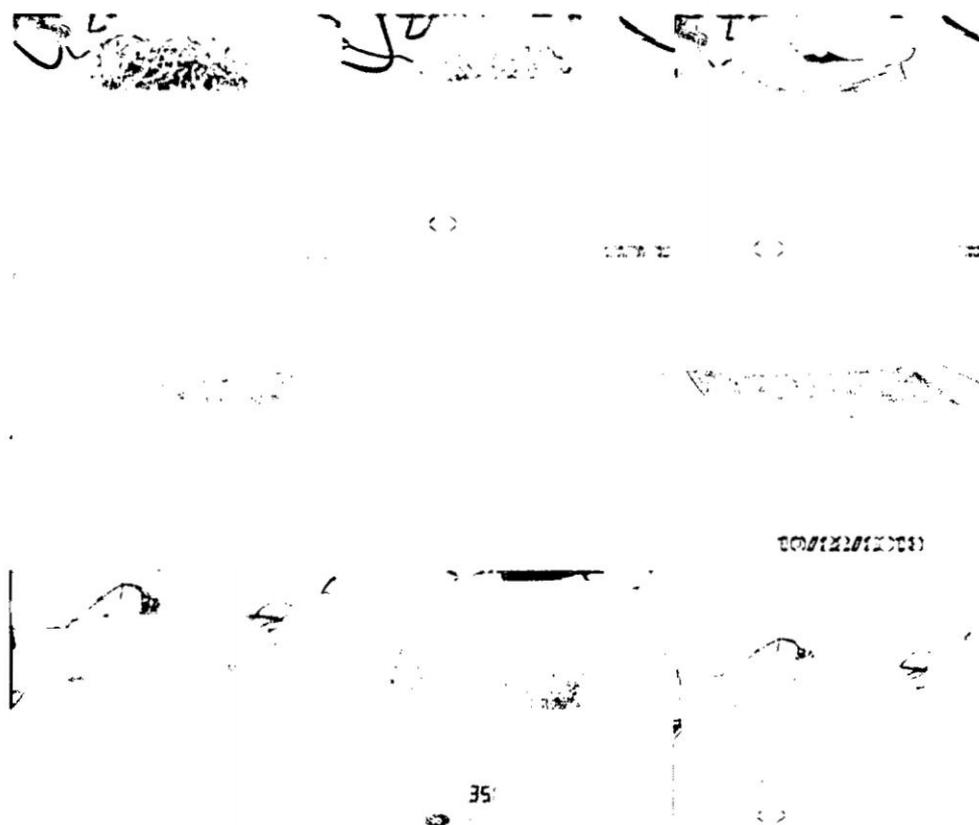


Figura 11: Molienda y pesado de las muestras vegetales *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho 2013.

Anexo 9



Figura 12: Preparación y maceración de las muestras alcohólicas *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho 2013.

Anexo 10



Figura 13: Filtrado y separación del etanol mediante el rotavapor de las muestras vegetales *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho 2013.

Anexo 11

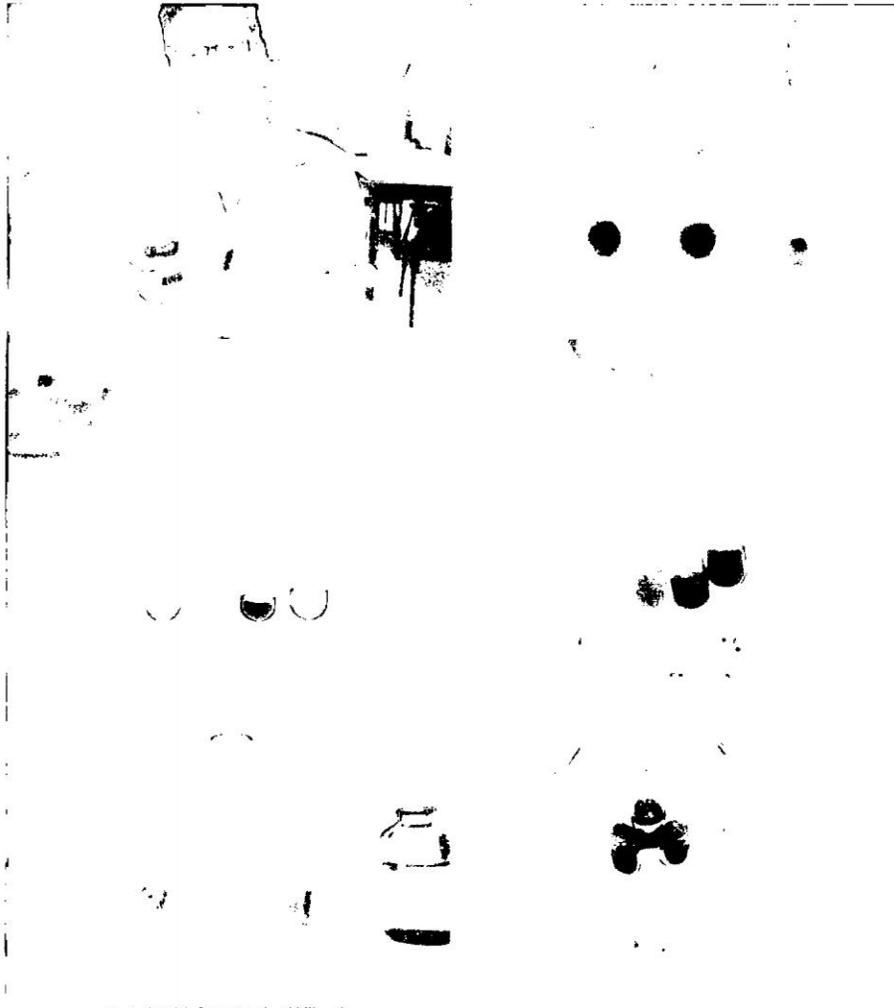


Figura 14: Tamizaje fitoquímico realizado a las tres especies vegetales en estudio *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho 2013.

Anexo12

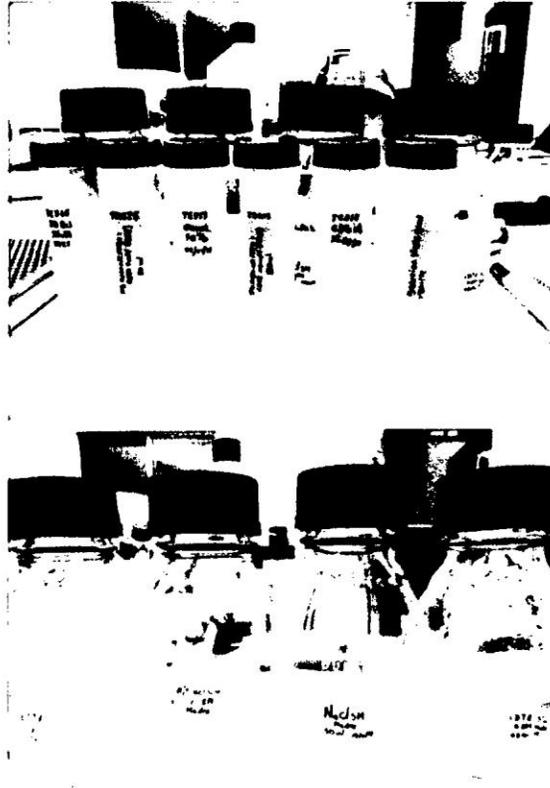


Figura 15: Reactivos empleados para la extracción de linfocitos humanos a partir de sangre. Ayacucho 2013.

Anexo13

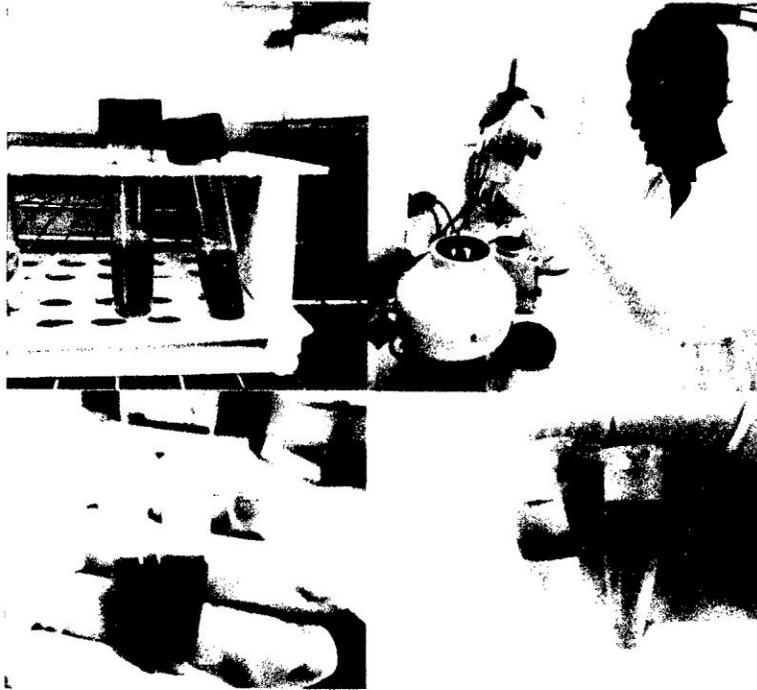


Figura 16: Extracción de ADN de linfocitos humanos a partir de sangre.
Ayacucho 2013.

Anexo 14

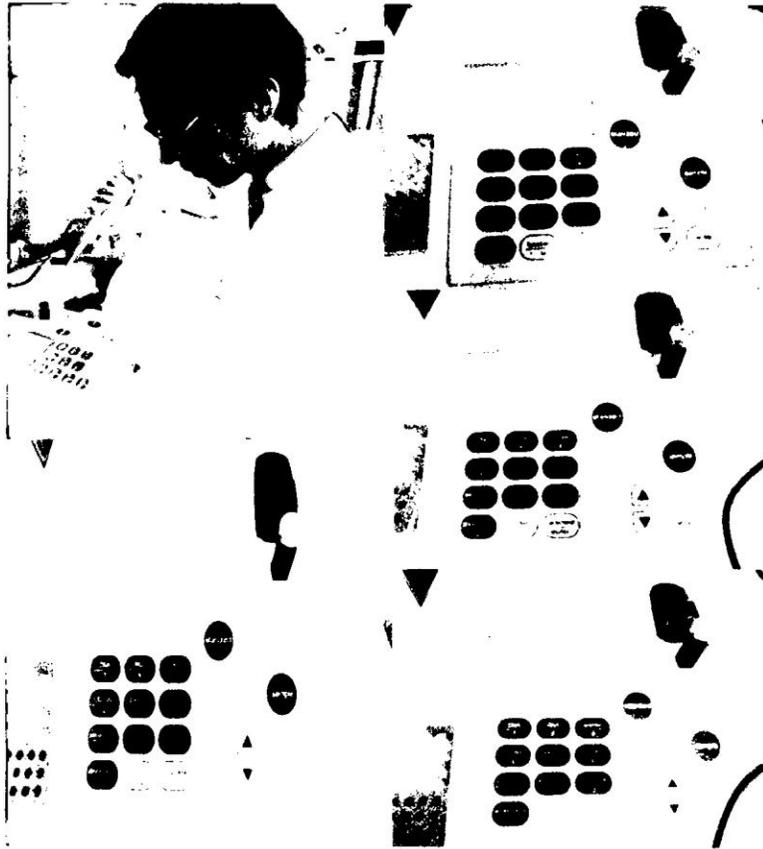


Figura 17: Cuantificación de ADN extraído de linfocitos humano. Ayacucho 2013.

Anexo 15



Figura 18: Preparación e incubación de la muestra para su sembrado respectivo en la cámara de electroforesis de gel de agarosa al 1%. Ayacucho 2013..

Anexo 16



Figura 19: Sembrado de las muestras en estudio en la cámara de electroforesis.
Ayacucho 2013.

Anexo 17

Tabla 8. Valores numéricos del grado de genotoxicidad de las plantas medicinales en estudio *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho 2013..

Tiempo de incubación (h)	Concentración del extracto hidroalcohólico (mg/ml)											
	"yawar suqu"				"matico"				"amor seco"			
	5	10	50	100	5	10	50	100	5	10	50	100
1	0	0	1	2	1	0	1	1	0	1	3	3
	0	0	0	3	0	1	1	1	1	0	3	3
	0	1	1	3	0	1	1	2	0	1	2	3
	1	0	1	3	1	1	1	1	0	0	3	2
4	0	0	1	3	1	1	2	2	0	0	3	2
	0	1	2	3	1	0	2	3	0	1	3	3
	1	0	2	3	0	1	2	2	1	0	2	3
	0	0	2	3	0	1	1	2	0	0	2	3

Anexo 18

Prueba de Mann-Whitney del tiempo de incubación de *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho 2013.

Estadísticos de prueba

	GENOTOXICIDAD DE "YAWAR SUQU"	GENOTOXICIDAD DE "MATICO"	GENOTOXICIDAD DE "AMOR SECO"
U de Mann-Whitney	111,000	88,500	120,000
W de Wilcoxon	247,000	224,500	256,000
Z	-,673	-1,659	-,316
Sig. asintótica (bilateral)	,501	,097	,752
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,539	,138	,780

- a. Variable de agrupación: tiempo (h)
- b. No corregido para empates

Anexo 19

Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración de *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho 2013

Estadísticos de prueba

	GENOTOXICIDAD DE "YAWAR SUQU"	GENOTOXICIDAD DE "MATICO"	GENOTOXICIDAD DE "AMOR SECO"
Chi-cuadrado	23,869	14,901	25,617
Gl	3	3	3
Sig. Asintótica	,000	,002	,000

- a. Prueba de Kruskal-Wallis
- b. Variable de agrupación: concentración (mg/mL)

Anexo 20

Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración en dos tiempos de incubación de *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho 2013.

Estadísticos de prueba

HORA		GENOTOXICIDAD DE "YAWAR SUQU"	GENOTOXICIDAD DE "MATICO"	GENOTOXICIDAD DE "AMOR SECO"
1	Chi-cuadrado	10,800	4,990	12,484
	Gl	3	3	3
	Sig. asintótica	,013	,173	,006
4	Chi-cuadrado	13,224	11,454	12,484
	Gl	3	3	3
	Sig. asintótica	,004	,010	,006

- a. Prueba de Kruskal-Wallis
- b. Variable de agrupación: concentración (mg/mL)

Anexo 21
MATRIZ DE CONSISTENCIA

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEORICO	HIPOTESIS	VARIABLES	METODOLOGIA
Efecto genotóxico <i>in vitro</i> de plantas medicinales antiinflamatorias <i>Oenothera rosea</i> Ait "yawar suqu", <i>Piper elongatum</i> Vahl "matico" y <i>Xanthium catharticum</i> HBK "amor seco". Ayacucho, 2013.	¿Cuál será el efecto genotóxico <i>in vitro</i> de las plantas medicinales antiinflamatorias <i>Oenothera rosea</i> Ait "yawar suqu", <i>Piper elongatum</i> Vahl "matico" y <i>Xanthium catharticum</i> HBK "amor seco". Ayacucho, 2013?	General: ▪ Determinar el efecto genotóxico <i>in vitro</i> de las plantas medicinales antiinflamatorias <i>Oenothera rosea</i> Ait "yawar suqu", <i>Piper elongatum</i> Vahl "matico" y <i>Xanthium catharticum</i> HBK "amor seco" Específicos: ▪ Obtener los metabolitos secundarios presentes en las plantas medicinales antiinflamatorias <i>Oenothera rosea</i> Ait "yawar suqu", <i>Piper elongatum</i> Vahl "matico" y <i>Xanthium catharticum</i> HBK "amor seco". ▪ Caracterizar el efecto de la genotoxicidad de las plantas medicinales antiinflamatorias en estudio, mediante ensayo <i>in vitro</i> sobre el ADN genómico de linfocitos humano, detectado mediante electroforesis.	Aspectos Botánicos de <i>Oenothera rosea</i> Ait "yawar suqu", <i>Piper elongatum</i> Vahl "matico" y <i>Xanthium catharticum</i> HBK "amor seco": Clasificación taxonómica, Descripción Botánica, Composición Química, Actividades Biológicas. Genotoxicidad.	Las plantas medicinales antiinflamatorias <i>Oenothera rosea</i> Ait "yawar suqu", <i>Piper elongatum</i> Vahl "matico" y <i>Xanthium catharticum</i> HBK "amor seco", presentan efecto genotóxico <i>in vitro</i> a determinadas concentraciones de los metabolitos secundarios	Variable Principal: Plantas medicinales antiinflamatorias <i>Oenothera rosea</i> Ait "yawar suqu", <i>Piper elongatum</i> Vahl "matico" y <i>Xanthium catharticum</i> HBK "amor seco". Indicador: Especies de plantas medicinales. Concentración miligramos por mililitros (mg/ ml) del extracto. Variable Secundaria: Efecto genotóxico <i>in vitro</i> de las plantas medicinales. Indicador: Fragmentación del Ácido desoxirribonucleico (ADN).	Tipo de investigación: Básica – descriptivo. Nivel de investigación: Básico Definición de la población y muestra: Procedimiento para la recolección de muestra. Preparación del extracto hidroalcohólico de <i>Oenothera rosea</i> Ait "yawar suqu", <i>Piper elongatum</i> Vahl "matico" y <i>Xanthium catharticum</i> HBK "amor seco". Diseño Experimental: Se desarrolló con el "Método Tomasevich" para determinar el efecto genotóxico de las plantas medicinales en estudio..

Efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antiinflamatorias *Oenothera rosea* Ait “yawar suqu”, *Piper elongatum* Vahl “matico” y *Xanthium catharticum* HBK “amor seco”. Ayacucho, 2013.

Gabriel Misael Alarcón Gómez¹, Tomás Miranda Tomasevich¹ y Enrique Aguilar Felices¹.
¹Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de setiembre de 2013 a mayo de 2014 en la ciudad de Ayacucho - Perú. Planteándose como objetivo: Determinar el efecto genotóxico *in vitro* de las plantas medicinales antiinflamatorias *Oenothera rosea* Ait “yawar suqu”, *Piper elongatum* Vahl “matico” y *Xanthium catharticum* HBK “amor seco”. Los extractos hidroalcohólicos fueron obtenidos con alcohol a 80^o, realizándose el tamizaje fitoquímico y la determinación genotóxica a diferentes concentraciones, exponiéndose éstos sobre el ADN genómico de linfocitos humano; la estimación del daño genotóxico “*in vitro*” fue determinado mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% y visualizado en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra UVsolo TS. Los metabolitos secundarios identificados en extractos hidroalcohólicos de: “yawar suqu” y “matico” fueron alcaloides, lactonas y/o cumarinas, fenoles y/o taninos, flavonoides, quinonas y glicósidos cardiotónicos; y en extracto hidroalcohólico de “amor seco” alcaloides, fenoles y/o taninos, flavonoides y quinonas; las tres plantas presentan las mismas características organolépticas y de solubilidad. Los extractos hidroalcohólico presentaron una importante actividad genotóxica sobre el ADN genómico de linfocitos humano, siendo los extractos de “amor seco” y “yawar suqu”, con mayor efecto genotóxico a concentraciones de 50 mg/ml y 100 mg/ml con respecto a “matico”. Se concluye que el daño genotóxico depende directamente de la concentración de los extractos hidroalcohólico; mas no así del tiempo de incubación.

Palabras clave: Genotoxicidad, *Oenothera rosea*, *Piper elongatum* y *Xanthium catharticum*.

SUMMARY

The present research work was carried out at the Centre for research in Molecular Biology and Bioinformatics of the Faculty of life sciences of the National University of San Cristóbal of Huamanga, during the months of September 2013 to may 2014 in the city of Ayacucho - Peru. Posing as objective: to determine the effect *in vitro* genotoxic of anti-inflammatory herbs *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" and *Xanthium catharticum* HBK "dry love". The hydroalcoholic extracts were obtained with alcohol to 80^o, making screening phytochemical and the determination of genotoxic at different concentrations, exposing himself on the genomic DNA of lymphocytes human; "in vitro" genotoxic damage estimate was determined by electrophoresis in agarose with ethidium bromide gel 1% and visualized in radiation of ultra violet light, within the recorder images Biometra UVsolo TS system. Secondary metabolites identified in of hydroalcoholic extracts: "yawar suqu" and "matico" were alkaloids, lactones or coumarins, phenols and/or tannins, flavonoids, Quinones and cardiac glycosides; and in "love dry" hydroalcoholic extract alkaloids, phenols, tannins, flavonoids and/or Quinones; the three plants have the same solubility and organoleptic characteristics. Hydroalcoholic extracts presented an important activity genotoxic on human genomic DNA of lymphocytes, being extracts from "dry amor" and "yawar suqu", with greater genotoxic effect at concentrations of 50 mg/ml and 100 mg/ml with respect to "matico". It is concluded that genotoxic damage is directly dependent on the concentration of hydroalcoholic extracts; but not so the incubation time..

Key words: genotoxicity, *Oenothera rosea*, *Piper elongatum* and *Xanthium catharticum*.

INTRODUCCIÓN

El paso del tiempo, el avance del saber, la tecnificación de los conocimientos y las industrias, ha llevado al hombre a beneficiarse más de las plantas medicinales, detallando en sus características, virtudes, formas de uso y aplicación.¹

Actualmente existe un gran interés por los complementos alimenticios de origen vegetal, se cree que dichos productos tienen la capacidad de disminuir los factores de riesgo para casi todas las enfermedades; esto permite una amplia acogida entre los consumidores que a menudo consideran que lo "natural" está libre de compuestos químicos nocivos y por lo tanto es "seguro" para la salud; premisa que debe reconsiderarse y controlarse conociendo de antemano que muchos compuestos de origen botánico también contienen toxinas, que incluso pueden tener efecto genotóxico, pues la integridad del ácido desoxirribonucleico (ADN) constituye un aspecto fundamental para la célula y el buen funcionamiento de los organismos vivos; así mismo, este material genético es susceptible a daños causados por numerosos agentes y/o procesos.²

El uso de las plantas medicinales en la terapéutica, requiere al igual que los productos sintéticos, de investigaciones previas y posteriores a su comercialización, donde sigan siendo observadas mediante estudios de farmacovigilancia.³

Las pruebas de toxicidad se realizan con el fin de identificar posibles daños para el ser humano ya que, se han detectado extractos de plantas medicinales que poseen actividad embriotóxica y/o teratogénica, y se ha reportado actividad mutagénica y carcinogénica en productos de origen vegetal (flavonoides y taninos), encontrándose que existe una correlación positiva entre la ocurrencia de enfermedades y tumores en la población.⁴

Estas plantas han sido usadas en la medicina tradicional en el tratamiento de diversas afecciones a la salud, entre ellas como antiinflamatorias, las mismas que fueron demostradas por trabajos de investigación. Se emplea un sistema de ensayo a corto plazo *in vitro* utilizando el ADN genómico de linfocitos humanos para detectar daño genético, como parte del estudio farmacológico y toxicológico de estas plantas, en el presente trabajo se pretende desarrollar los siguientes objetivos:

Objetivo general:

- Determinar el efecto genotóxico *in vitro* de las plantas medicinales antiinflamatorias *Oenothera rosea Ait* "yawar suqu", *Piper elongatum Vahl* "matico" y *Xanthium catharticum HBK* "amor seco".

Objetivos específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en las plantas medicinales antiinflamatorias *Oenothera rosea Ait* "yawar suqu", *Piper elongatum Vahl* "matico" y *Xanthium catharticum HBK* "amor seco".
- Caracterizar el efecto de la genotoxicidad de las plantas medicinales antiinflamatorias en estudio, mediante ensayo *in vitro* sobre el ADN genómico de linfocitos humano, detectado mediante electroforesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN Y MUESTRA

Población

Plantas de *Oenothera rosea Ait* "yawar suqu", *Piper elongatum Vahl* "matico" y *Xanthium catharticum HBK* "amor seco", que crece en la localidad de Ñahuinpuquio de la ciudad de Ayacucho.

Muestra

- 500 g de hojas frescas de *Oenothera rosea Ait* "yawar suqu".
- 500 g de hojas frescas de *Piper elongatum Vahl* "matico".
- 500 g de hojas frescas de *Xanthium catharticum HBK* "amor seco".

Tipo de muestreo

Muestreo por conveniencia.

Unidad muestral

Extracto hidroalcohólico de las plantas medicinales en estudio.

DISEÑO METODOLÓGICO

Metodología para la recolección de datos

Recolección de la muestra

Las muestras fueron recolectadas al azar, durante el mes de setiembre de la localidad de Ñahuinpuquio de la ciudad de Ayacucho; fueron transportadas al Laboratorio de Farmacognosia, donde fueron secadas al medio ambiente, previamente acondicionada, teniendo como base papel Kraft, fue cambiada constantemente y volteando la muestra para un secado uniforme, evitando el deterioro por la humedad y separando aquellas que cambien de color o muestren signos de alteración. Una vez secada la muestra, se trituró empleando un mortero, con la finalidad de reducir hasta un polvo fino y se procedió a realizar la preparación de los extractos hidroalcohólicos. Para la identificación taxonómica se emplearon muestras con flores, vainas y hojas lo que corresponde a cada planta, lo cual se realizó en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas, según el sistema de clasificación de Cronquist A. 1988, con certificación a cargo de la Blga. Laura Aucasime Medina.

Obtención del extracto hidroalcohólico:

Los 500 g de muestra seca y pulverizada de cada planta medicinal en estudio, se maceró en un frasco de vidrio color ámbar por siete días, para ello se utilizó 1 L de alcohol 80° y cubrir a la muestra por lo menos con 1 cm de diferencia; durante el proceso se agitó el frasco por 15 minutos dos veces al día para que el alcohol se distribuya homogéneamente en la muestra. Las muestras en maceración se mantuvieron en un lugar fresco y oscuro. Luego se procedió a filtrar con ayuda del papel filtro, finalmente se llevó a un evaporador rotatorio BUCHI-3000 a presión reducida y se concentró a sequedad en una estufa Memmert.

Tamizaje fitoquímico

Se realizó una marcha fitoquímica a los extractos obtenidos de las plantas medicinales en estudio, para determinar la presencia de los diferentes metabolitos secundarios siguiendo el procedimiento de Lock de Ugaz, Miranda y Cuellar.^{5,6}

Extracción de ADN genómico de linfocitos humano:

Se realizó a partir de una unidad de bolsa colectora de sangre "cuádruple" fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos, para descartar, que se consiguió en donación del Banco de Sangre del Hospital Regional de Ayacucho "Miguel Ángel Mariscal Llerena", y obtener el ADN genómico (Tabla 1). Preparación de las soluciones para la prueba de genotoxicidad "in vitro" de ADN genómico, por efecto del extracto hidroalcohólico de plantas medicinales.

mediante extracción orgánica, modificado por Miranda.⁷

Cuantificación de ADN genómico de linfocitos humano:

- Por espectrofotometría ultra violeta.
- Por electroforesis.

Ensayos de la genotoxicidad in vitro:

Se desarrolló siguiendo el "método Tomasevich" propuesto por Miranda⁷; con las siguientes fases:

• Fase I: Cuantificación y preparación de Stock de ADN genómico de linfocitos humano.

El ADN genómico de *linfocitos humano* obtenido, fue cuantificado por espectrofotometría UV marca Eppendorf BioPhotometer plus; luego se preparó un stock a concentración de 1000 ng/ μ L en volumen final de 150 μ L, para cada planta medicinal en estudio.

• Fase II: Prueba de genotoxicidad in vitro de ADN genómico de linfocitos humano.

Se preparó las soluciones del látex de cada planta medicinal, a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, con agua bidestilada estéril.

Se acondicionó las soluciones de genotoxicidad "in vitro" de ADN genómico, de acuerdo al detalle siguiente:

CONDICIONES		SOLUCIONES PARA PRUEBA DE GENOTOXICIDAD "in vitro"								
N° de tubo		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Stock de ADN (1 000 ng/ μ L)		14	14	14	14	14	14	14	14	14
Volumen en μ L										
Extracto hidroalcohólico	Concentración (mg/mL)	5	10	50	100	5	10	50	100	-
	Volumen (μ L)	6	6	6	6	6	6	6	6	-
Agua bidestilada estéril		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Volumen total (μ L)		20	20	20	20	20	20	20	20	20
Incubación a 37°C (h)		1				4				

Se realizaron cuatro repeticiones de las pruebas de genotoxicidad "in vitro", de cada planta medicinal en estudio.

• Fase III: Electroforesis para la detección de genotoxicidad.

Se preparó el gel de agarosa al 1% y se dispuso de una cámara de electroforesis Biometra.

Para el volumen de carga en gel de agarosa, de los productos de la reacción de genotoxicidad, se utilizó las siguientes cantidades: 1 μL de loading (colorante señalizador de migración de las bandas), 4 μL de la solución para la prueba de genotoxicidad “*in vitro*” y 2 μL de agua bidestilada estéril, volumen final 7 μL ; se mezcló y se cargó en el respectivo pozo del gel de agarosa para electroforesis.

Adicionalmente se preparó el ladder 100 pb (marcador de tamaño molecular de 100 pb) con: 1 μL de loading, 4 μL de ladder y 2 μL de agua bidestilada estéril, volumen final 7 μL ; se mezcló y se cargó en el respectivo pozo del gel de agarosa para electroforesis.

Se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se corrió a 30 voltios (V) por 5 horas.

• **Fase IV: Radiación UV para la visualización de genotoxicidad.**

Luego del tiempo de corrido electroforético, se sumergió el gel de agarosa en una solución de bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos aproximadamente, se enjuagó con abundante agua corriente dos veces y se hizo la lectura por radiación en UV en el sistema de registrador de imágenes marca Biometra UV solo TS, adicionalmente se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; para visualizar los fragmentos del ADN producto de la digestión.

• **Fase V: Interpretación y clasificación del registro visual de genotoxicidad.**

La escala de los valores numéricos correspondientes a los niveles de fragmentación del ADN como producto de la genotoxicidad, visualizados en el registro fotográfico, fueron basados en la clasificación del “ensayo cometa” propuesto por Speit (1995) y Collins (2004), en tesis de Mónica Marisol Larrea Poma.⁸

Tabla 2. Valoración numérica de la genotoxicidad.

Clase	Genotoxicidad
0	fragmentación de ADN < 5%
1	fragmentación de ADN entre 5 a 20%
2	fragmentación de ADN entre 20 a 40%
3	fragmentación de ADN entre 40 a 95%
4	fragmentación de ADN > 95%

Fuente: Larrea Poma M., 2007

Análisis de datos

Los datos fueron agrupados y presentados en tablas, expresados en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. El daño genotóxico se evaluó mediante el paquete estadístico SPSS, se utilizó la prueba de Mann-Whitney de comparación de máximos y mínimos para dos muestras independientes y Kruskal-Wallis para más de dos muestras independientes. El valor de $p \leq 0,05$, se consideró como el nivel estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Tabla 3. Metabolitos secundarios en los extractos látex de *Oenothera rosea* Ait “yawar suqu”, *Piper elongatum* Vahl “matico” y *Xanthium catharticum* HBK “amor seco”.

Metabolitos secundarios	Resultados		
	Yawar suqu	matico	amor seco
Alcaloides	+++	+++	+++
Lactonas y/o cumarinas	++	+++	+
Fenoles y/o taninos	+++	+++	+++
Flavonoides	+++	+++	++
Quinonas	+	++	
Glicósidos cardiotónicos	++	++	

Leyenda: Leve (+), Moderada (++), Abundante (+++)

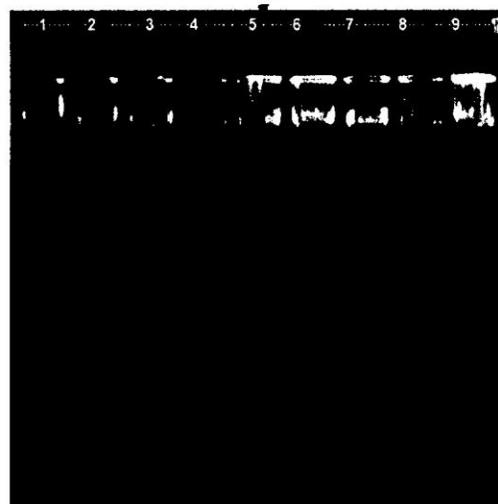


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, con extracto hidroalcohólico al 80% de *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu". Ayacucho 2013.

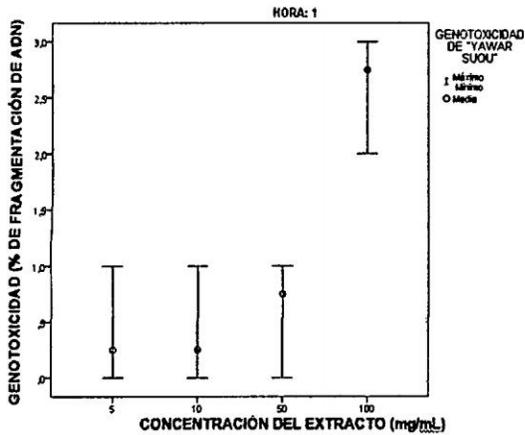


Figura 2. Genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, durante 1 hora de incubación a 37°C, con extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu". Ayacucho 2013.

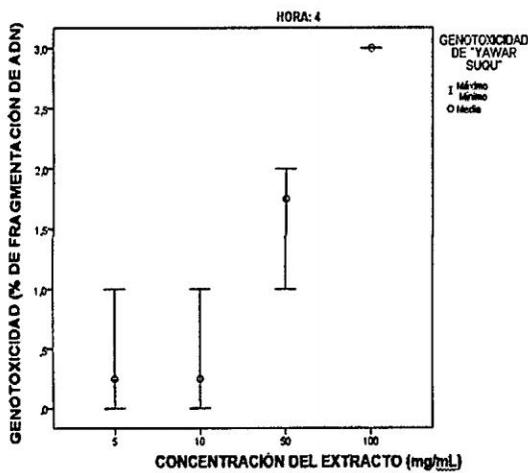


Figura 3. Genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, durante 4 horas de incubación a 37°C, con extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu". Ayacucho 2013.

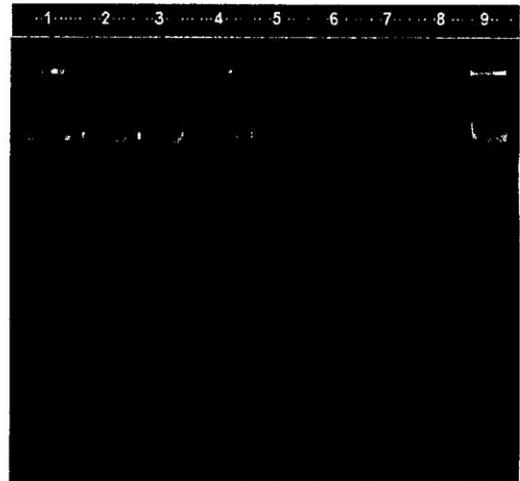


Figura N° 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, con extracto hidroalcohólico al 80% de *Piper elongatum* Vahl "matico". Ayacucho 2013.

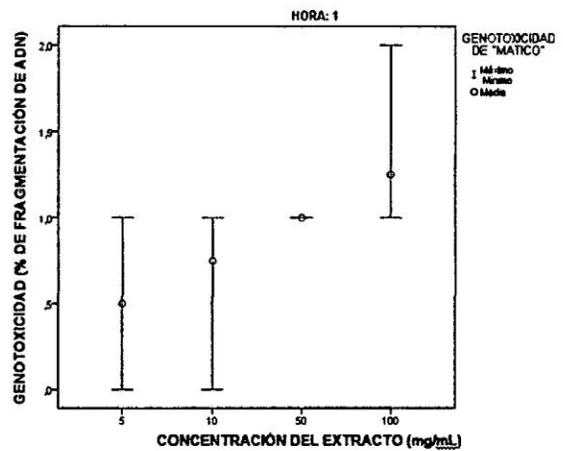


Figura 5. Genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, durante 1 hora de incubación a 37°C, con extracto hidroalcohólico de *Piper elongatum* Vahl "matico". Ayacucho 2013.

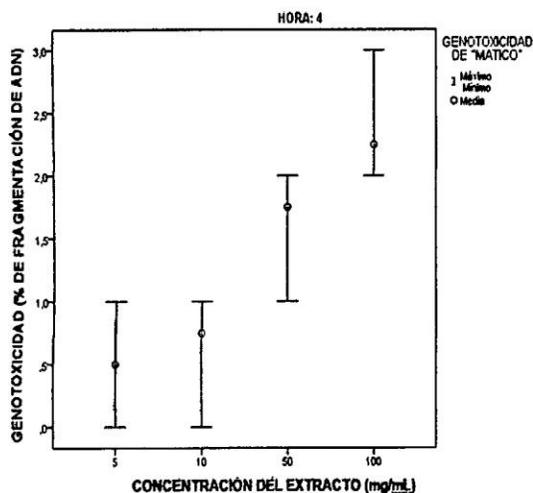


Figura 6. Genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, durante 4 horas de incubación a 37°C, con extracto hidroleológico de *Piper elongatum Vahl* "matico". Ayacucho 2013.

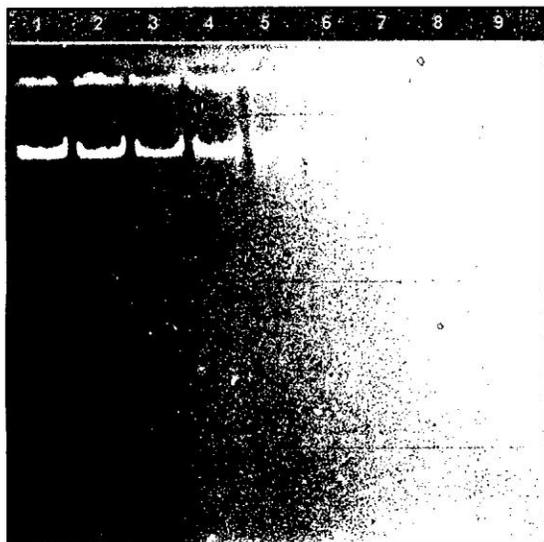


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, con extracto hidroleológico al 80% de *Xanthium catharticum HBK* "amor seco". Ayacucho 2013.

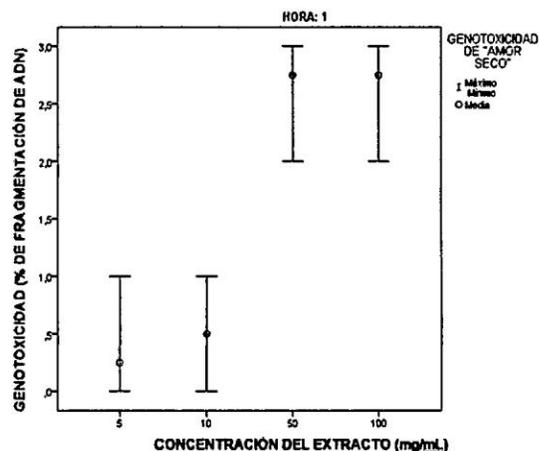


Figura 8: Genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, durante 1 hora de incubación a 37°C, con extracto hidroleológico de *Xanthium catharticum HBK* "amor seco". Ayacucho 2013.

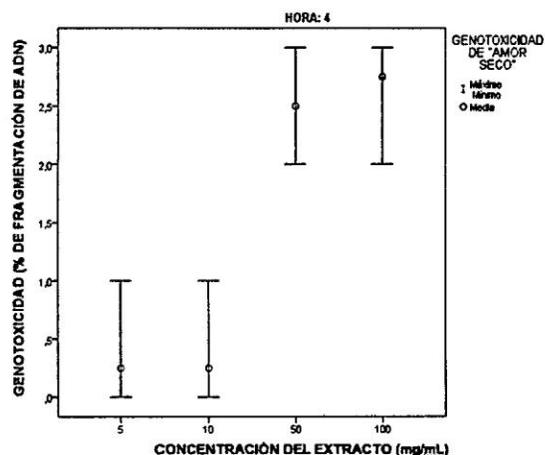


Figura 9: Genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos, durante 4 horas de incubación a 37°C, con extracto hidroleológico de *Xanthium catharticum HBK* "amor seco". Ayacucho 2013.

DISCUSIÓN

La evaluación genotóxica de plantas medicinales deben ser realizadas, en primera instancia, mediante ensayos "in vitro" si es que resultara negativo se prosigue con el ensayo "in vivo", para demostrar el daño a nivel del ADN.

En el tamizaje fitoquímico realizado a *Oenothera rosea Ait* "yawar suqu" se puede notar en la tabla 3, se observa presencia abundante de alcaloides, fenoles, taninos, flavonoides seguido de una moderada presencia de glicósidos cardiotónicos,

lactonas y cumarinas a su vez una leve cantidad de quinonas.

Al realizar el tamizaje fitoquímico de *Piper elongatum Vahl* "matico" se puede observar en la tabla 3 la abundante presencia de metabolitos secundarios tales como alcaloides, lactonas, taninos, flavonoides y moderada cantidad de quinonas y glicósidos cardiotónicos.

En el tamizaje fitoquímico realizado a *Xanthium catharticum HBK* "amor seco" se puede notar en la tabla 3 la presencia abundante de alcaloides y flavonoides seguido de la moderada cantidad de quinonas a su vez una leve cantidad de fenoles.

La figura 1 muestra los registros fotográficos de electroforesis en gel de agarosa al 1% de la genotoxicidad de ADN genómico de linfocitos humanos de 1000 ng/μL, por efecto del extracto hidroalcohólico obtenido de *Oenothera rosea Ait* "yawar suqu" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL con dos tiempos de incubación a 37 °C, cuanto menor es la concentración del extracto como en los carriles 1, 2 y 3 con 5 mg/mL, 10 mg/mL y 50 mg/mL la genotoxicidad es mínima (menor de 5%), mientras que con 100 mg/mL durante una hora, la fragmentación del ADN es entre 20% a 40%. Se puede observar además, con cuatro horas de incubación, la fragmentación es similar entre 5 mg/mL, 10 mg/mL y 50 mg/mL (menor a 5%), pero a concentración de 100 mg/ml la fragmentación del ADN es entre 20% a 40%, se puede apreciar que presenta ligeramente mayor degradación que a una hora de incubación. Se puede observar las "colas" con fragmentos tenues en cada carril dependiendo directamente de su cantidad, tamaño y referente a la concentración del extracto, el carril 9 muestra el corrido de ADN control a 1 000 ng/μL con el que se empezó a trabajar la genotoxicidad. Esta fotografía revela el efecto genotóxico visible a concentración de 100 mg/ml del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea Ait* "yawar suqu", siendo ligeramente mayor a cuatro horas de incubación respecto a una hora.

Al analizar de manera general los dos tiempos de incubación con la prueba de Mann-Whitney podemos corroborar que el tiempo no influye en el efecto genotóxico ($p=0,501$) del extracto de *Oenothera rosea Ait* "yawar suqu"; como se observa en las figuras 2 y 3, que a menor tiempo de incubación la genotoxicidad es muy notoria. Mientras que la concentración es muy influyente en el efecto genotóxico del "yawar suqu", ($p=0,000$).

La figura 4 muestra la gráfica de genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano, con extracto de *Oenothera rosea Ait* "yawar suqu" a diferentes

concentraciones, durante una hora y cuatro horas de incubación a 37 °C, que resulta ($p=0,013$) y ($p=0,004$), respectivamente, por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico.

Tobe⁹, en su estudio de la parte aérea de la especie *Oenothera rosea Ait*, se midió su actividad antibacteriana y su toxicidad frente a *Artemia salina*. Dentro de los grupos de metabolitos secundarios se determinó presencia de alcaloides, flavonoides, terpenos, esteroides y glicósidos. Detectaron alcaloides en el extracto hexánico de *Oenothera rosea Ait* la planta presentó actividad antibacteriana frente a las especies de prueba y toxicidad frente a *Artemia salina*.

Muriel¹⁰, en un estudio de *Oenothera rosea Ait* se reportó la presencia de flavonoides, y demostró la actividad antiinflamatoria de extractos acuosos encontrándose mayor eficacia antiinflamatoria a 250 mg/Kg. de peso en cobayos, respecto a la actividad hepatoprotectora contra el daño producido por el paracetamol, se concluye que se obtienen mejores resultados a la dosis de 250 mg/Kg del extracto acuoso liofilizado.

Everett¹¹, realizó un estudio sobre la bioactividad y toxicidad de las hojas y tallos de *Oenothera rosea Ait* en extractos acuosos y hidroalcohólico, concluyendo que son ligeramente tóxicos.

El registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1% de la figura 4, son productos de la genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos a 1 000 ng/μL por efectos del extracto hidroalcohólico de *Piper elongatum Vahl* "matico", a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL en dos tiempos de incubación a 37°C, podemos observar que la intensidad del color de las bandas de ADN se mantienen casi homogéneamente, pero de los carriles 1, 2, 3 y 4 muestran fragmentos de ADN que se expanden en la trayectoria de los carriles en forma de "colas", cada vez más largas en proporción a la cantidad, siendo éstas "colas" más notorias en los carriles 5, 6, 7 y 8 que gradualmente son más largas, directamente proporcional a la cantidad de ADN fragmentado dependiendo directamente de la concentración de los extractos; el carril 9 es el ADN control mostrando la concentración de 1 000 ng/μL, con la cual se inició el proceso de ensayo de genotoxicidad. Esta fotografía nos revela el débil efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico de *Piper elongatum Vahl* "matico" en las cuatro concentraciones con las que se desarrolló este ensayo.

Al analizar de manera general los dos tiempos de incubación con la prueba de Mann-Whitney

podemos corroborar que el tiempo no influye en el efecto genotóxico ($p=0,097$) del extracto hidroalcohólico de *Piper elongatum Vahl* "matico"; como se observa en las figuras 5 y 6, que a menor tiempo de incubación la genotoxicidad es muy notoria. Mientras que la concentración es muy influyente en el efecto genotóxico del "matico", ($p=0,002$).

La figura 4 muestra la gráfica de genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano, con extracto hidroalcohólico de *Piper elongatum Vahl* "matico" a diferentes concentraciones, durante una hora y cuatro horas de incubación a 37°C, que resulta ($p=0,173$) y ($p=0,010$), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico.

El registro fotográfico de la figura 7, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de linfocitos humanos a concentración inicial de 1 000 ng/ μ L, por efecto del extracto hidroalcohólico de *Xanthium catharticum HBK* "amor seco" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, que fueron realizados con dos tiempos de incubación a 37 °C; los carriles 1 y 2 muestran el producto de la genotoxicidad con fragmentación menor a 5%, los carriles 3 y 4 muestran fragmentación entre 20% a 40%, durante una hora de incubación. Los carriles 5, 6, 7 y 8 muestran productos de la genotoxicidad durante cuatro horas de incubación, podemos observar que existen una ligera disminución en la intensidad del color que va directamente proporcional a la concentración de ADN, igualmente los carriles 5 y 6 con fragmentación menores a 5%, los carriles 7 y 8 entre 20 a 40% de fragmentación, pero aparentemente con menor fragmentación que los carriles 3 y 4 que tienen la misma concentración de extractos y solo una hora de incubación, esto podría deberse a variaciones en el pulso cuando se manipula la micropipeta; el carril 9 muestra el corrido de ADN control a 1 000 ng/ μ L con el que se empezó a trabajar la genotoxicidad. Esta fotografía revela el efecto genotóxico visible a concentraciones de 50mg/mL y 100mg/mL del extracto hidroalcohólico de *Xanthium catharticum HBK* "amor seco".

Al analizar de manera general los dos tiempos de incubación con la prueba de Mann-Whitney (Anexo 18) podemos corroborar que el tiempo no influye en el efecto genotóxico ($p=0,752$) del extracto de *Xanthium catharticum HBK* "amor seco"; como se observa en las figuras 8 y 9, que a menor tiempo de incubación la genotoxicidad es muy notoria.

Mientras que la concentración es muy influyente en el efecto genotóxico de la "amor seco", ($p=0,000$). La figura 7 muestra la gráfica de genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano, con extracto de *Xanthium catharticum HBK* "amor seco" a diferentes concentraciones, durante una hora y cuatro horas de incubación a 37°C, que resulta ($p=0,006$) y ($p=0,006$), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cyted A, Manual de Técnicas de Investigación. Programa Iberoamericano de ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Sub programa X. Química Fina Farmacéutica. 1995.
2. Ángel A. Evaluación de la actividad genotóxica de propóleos recolectados en diferentes apiarios de Cundimarca y Boyacá. [tesis maestría]. Bogotá. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. 2012.
3. García A, Avila Y, Alonso L, López P, Ruiz A, y Morón F. Reacciones adversas reportadas por consumo de productos naturales en Cuba durante 2003 y 2007. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14, 1-11. 2009
4. Carballo M, Cortada C, y Galano A. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. *Theoria: Revista teoría, historia y fundamentos de la Ciencia*, 14, 95-108. 2005
5. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. 2ª ed. Lima: Fondo editorial; 1994.
6. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad De La Habana Instituto de Farmacia y Alimentos. Cuba; 2000.
7. Miranda T, Valer G. Protocolos de Biología Molecular-Guía de práctica. Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2013.
8. Larrea Poma M. Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay [tesis de grado]. La Paz. Universidad Mayor de San Andrés; 2007.
9. Tobe H, Wagner L y Chin H. Systematic and evolutionary studies of Oenothera (Onagraceae): Seed-coat anatomy. *Bot. Gaz. (Crawfordsville)* 148: 235-257. 1987.
10. Muriel P. and Suárez O. "El papel de la lipoperoxidación en el modelo de daño hepático inducido por la obstrucción biliar en

la rata". XVI Congreso Nacional de Farmacología. Guanajuato, Gto. November 14-18, 1993.

11. Averett E, Huang S, and Wagner L. Flavonoid analysis of *Oenothera speciosa* (Onagraceae). *Southw. Naturalist*. 32: 117-120. 1987.