

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Evaluación preliminar de la genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum* L. "ajo" frente a ADN de *Staphylococcus sp.* Ayacucho 2017

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA

Presentado por la:
Bach. MARCA YUPANQUI, Pamela

AYACUCHO - PERÚ
2018

A mis padres con todo cariño quienes me enseñaron el mejor camino a seguir, que con su apoyo y confianza logre culminar mi profesión.

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial a nuestra *Alma Mater* la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga forjador de excelentes profesionales al servicio de la comunidad Ayacuchana, dentro y fuera del país.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, así mismo a todos los docentes que me impartieron sus conocimientos y experiencias en el transcurso de mi vida estudiantil, gracias por prepararnos para un futuro competitivo no solo como los mejores profesionales sino también como mejores personas.

A mi asesor el Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich, quien accedió a brindarme toda su paciencia, capacidad y experiencia científica.

A mis padres y hermanas por su apoyo incondicional y confianza brindada en todo momento, a mis amigos que siempre estuvieron conmigo apoyándome en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	xi
INDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedente	3
2.2 Marco teórico	7
2.2.1 <i>Allium sativum</i> L. “ajo”	7
2.2.2 Staphylococcus	10
2.2.3 Toxicidad y genotoxicidad	11
2.2.4 Evaluación genotóxica	13
2.2.5 Electroforesis en gel	15
2.2.6 Ácido nucleico	16
2.2.7 Ácido desoxirribonucleico (ADN)	17
2.2.8 Método Tomasevich Evaluación de la genotoxicidad in vitro	18
2.2.9 Ensayo cometa	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Lugar de ejecución	21
3.2 Población y muestra	21
3.3 Unidad experimental	21
3.4 Metodología y recolección de datos	22
3.4.1 Recolección de la muestra	22
3.4.2 Obtención de la muestra	22
3.4.3 Identificación fitoquímica	23
3.4.4 Cultivo de <i>Staphylococcus sp.</i>	23
3.4.5 Ensayo de genotoxicidad in vitro	24
3.4.6 Fase de electroforesis	26
3.4.7 Fase de lectura por radiación UV	27
3.4.8 Fase de interpretación y clasificación de la genotoxicidad	27

3.5	Tipo de investigación	28
3.5.1	Diseño de investigación	28
3.6	Análisis de datos estadísticos	28
IV.	RESULTADOS	29
V.	DISCUSION	39
VI.	CONCLUSIONES	45
VII.	RECOMENDACIONES	47
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
	ANEXO	53

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.	
Tabla 1	Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> de extracto etanólico del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” sobre ADN genómico de <i>Staphylococcus sp.</i>	24
Tabla 2	Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> de extracto etanólico del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” sobre ADN genómico de <i>Staphylococcus sp.</i>	25
Tabla 3	Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> de zumo del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” sobre ADN genómico de <i>Staphylococcus sp.</i>	25
Tabla 4	Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN de grupo 1 para el ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto etanólico del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”. Ayacucho 2017.	26
Tabla 5	Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN de grupo 2 para el ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto etanólico del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”. Ayacucho 2017.	26
Tabla 6	Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN de grupo 3 para el ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> del zumo del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”. Ayacucho 2017.	27
Tabla 7	Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.	27
Tabla 8	Diseño de investigación.	28
Tabla 9	Metabolito secundario en el extracto etanólico del bulbo de <i>Allium sativum</i> L.	31
Tabla 10	Metabolitos secundarios en el zumo del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”. Ayacucho 2017.	32
Tabla 11	Valores numéricos del ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto etanólico del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” a concentraciones de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente a ADN genómico de <i>Staphylococcus sp.</i> incubado a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.	35

Tabla 12 Valores numéricos del ensayo genotóxico *in vitro* del zumo del 36
bulbo de *Allium sativum* L. “ajo” a concentraciones de 5, 10, 50 y
100%, frente a ADN genómico de *Staphylococcus sp.* incubado
a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 <i>Allium sativum</i> L. “ajo”	7
Figura 2 Estructura química del ADN.	17
Figura 3 Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico de <i>Staphylococcus sp.</i> obtenido de seis muestras y coloreado con bromuro de etidio. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.	33
Figura 4 Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto etanólico del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” a concentraciones de 5, 10, 50 y 100 mg/mL, frente a ADN genómico de <i>Staphylococcus sp.</i> incubado a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.	34
Figura 5 Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto etanólico del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” a concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente a ADN genómico de <i>Staphylococcus sp.</i> incubado a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.	35
Figura 6 Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del zumo del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” a concentraciones de 5, 10, 50 y 100%, frente a ADN genómico de <i>Staphylococcus sp.</i> incubado a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.	36

ÍNDICE DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1	Clasificación taxonómica de <i>Allium sativum</i> L. "ajo". Ayacucho 2017.	55
Anexo 2	Clasificación taxonómica de <i>Staphylococcus sp.</i> Ayacucho 2016.	55
Anexo 3	Diagrama para la obtención del extracto etanólico del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. "ajo". Ayacucho 2017.	57
Anexo 4	Diagrama para la obtención del zumo del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. "ajo". Ayacucho 2017.	59
Anexo 5	Recolección, molienda y obtención del extracto etanólico del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. "ajo". Ayacucho 2017.	59
Anexo 6	Obtención del zumo de <i>Allium sativum</i> L. "ajo". Ayacucho 2017.	60
Anexo 7	Metabolito secundario encontrado en el extracto etanólico del bulbo de <i>Allium sativum</i> L "ajo". Ayacucho 2017.	61
Anexo 8	Metabolitos secundarios encontrados en el zumo del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. "ajo". Ayacucho 2017.	62
Anexo 9	Proceso de cultivo de <i>Staphylococcus sp.</i> Ayacucho 2017.	63
Anexo 10	Control de calidad microbiológica del extracto etanólico de <i>Allium sativum</i> L. "ajo".	64
Anexo 11	Proceso de extracción de ADN genómico de <i>Staphylococcus sp.</i> Ayacucho 2017.	65
Anexo 12	Proceso de preparación a diferentes concentraciones del extracto etanólico del bulbo de <i>Allium sativum</i> L."ajo". Ayacucho 2017.	66
Anexo 13	Proceso de preparación a diferentes concentraciones del zumo del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. "ajo". Ayacucho 2017.	67
Anexo 14	Proceso para la determinación del efecto genotóxico del extracto etanólico y zumo del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. frente a <i>Staphylococcus sp.</i> Ayacucho 2017.	68
Anexo 15	Matriz de consistencia.	69

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la evaluación preliminar de la genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum* L. "ajo"; este trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y en el Centro de Investigación de Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en la ciudad de Ayacucho. El extracto etanólico a 96° fue obtenido luego de la maceración durante 5 días; la determinación genotóxica a diferentes concentraciones, exponiéndose éstos frente al ADN de *Staphylococcus sp.* y la estimación del daño genotóxico *in vitro* fue determinado con el "método Tomasevich", 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 el extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo", fueron fenoles y/o taninos en cantidad abundante; mientras que en el zumo, se detectó la presencia de fenoles y/o taninos y saponinas en cantidad abundante, y cardenólidos en escasa cantidad; el extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo" a concentraciones de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500mg/mL, no presentó efecto genotóxico frente al ADN genómico de *Staphylococcus sp.*; mientras que el zumo del bulbo del "ajo", a concentraciones de 5, 10, 50 y 100%, si presentó un potente efecto genotóxico. Se llegó a la conclusión, que el zumo del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo", presenta una potente actividad genotóxica frente al ADN genómico de *Staphylococcus sp.*

Palabras clave: Genotoxicidad, ADN genómico, *Allium sativum* L.

I. INTRODUCCIÓN

El empleo de las plantas medicinales con fines terapéuticos ha estado siempre presente en la vida del hombre, y mantiene una amplia validez a pesar del poderío y de la competencia de la química farmacéutica, basada fundamentalmente en principios activos de síntesis.¹

La población humana en general reconoce que las plantas medicinales poseen propiedades terapéuticas para diferentes males gracias a que estas contienen diferentes metabolitos secundarios, los mismos que constituyen el principio activo, la propiedad curativa, pero estas también pueden tener efectos secundarios, entre ellos aquel que puede causar daño a nivel del ADN de las células del organismo que está recibiendo el tratamiento directamente con estas plantas o con los productos procesados, por lo que es necesario conocer si estas pueden estar ejerciendo este efecto en el ADN y qué concentraciones se puede presentar.

También se ha podido comprobar el efecto antimicrobiano del *Allium sativum* “ajo” a través de diversos estudios *in vitro* llegando a determinar su componente antimicrobiano efectivo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas llamado alicina, muy útil para el sistema respiratorio, digestivo y afecciones de la piel.¹

Sin embargo, estudios de efectos genotóxico que los metabolitos secundarios de “ajo” pudieran ejercer sobre las células bacterianas o en organismos eucariotas, no han sido reportados; por lo que considerando que el estudio de esta actividad ha alcanzado gran importancia en los últimos años, se hace necesario realizar estas pruebas que permitan medir daño que pudiera estar causando a nivel del ADN.

El propósito del presente estudio es determinar la genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum* L. “ajo” frente a ADN de

Staphylococcus sp., con un sistema de ensayo a corto plazo *in vitro* utilizando ADN genómico de la bacteria, para detectar daño físico que pueda causar.

Uno de los ensayos que más claramente demuestra la genotoxicidad causada por diversos compuestos, es la fragmentación del ADN genómico, ésta ruptura de la macromolécula a nivel de los enlaces fosfodiéster y/o puentes de hidrógeno, hace que el ADN fragmentado adopte un patrón característico cuando es sometido a electroforesis en gel de agarosa. Al correr este ADN en el gel de agarosa, los fragmentos de distinto tamaño quedan separados de forma equidistante entre sí, adoptando el típico patrón de escalera. Si la fragmentación fuera con degradación hasta nucleótidos, entonces la concentración del ADN inicial, disminuirá proporcionalmente a la actividad degradadora del compuesto químico en ensayo; por último este ADN es coloreado con el agente intercalante bromuro de etidio, que puede ser visualizado por efecto de la luz ultravioleta y obtener un registro fotográfico.²

El ensayo que se realizó en el presente estudio es un método eficaz y eficiente que puede ser utilizado como un procedimiento primario para determinar genotoxicidad en trabajos de investigación científica, para la busca de plantas con este efecto, para advertir y prevenir el consumo indiscriminado de plantas medicinales y/o productos derivados de las mismas, o utilizarse para tratamiento anticancerígeno; así mismo en el control de calidad y vigilancia de los medicamentos de origen vegetal, sea en forma natural o productos semi-industrializados e industrializados, en resguardo de la salud de los consumidores.

Se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Determinar la genotoxicidad del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum L.* “ajo” en un ensayo preliminar *in vitro* frente a ADN de *Staphylococcus sp.*

Objetivos Específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico y zumo de *Allium sativum L.* “ajo”.
- Evaluar la genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum L.* “ajo” a través de la fragmentación de ADN de *Staphylococcus sp.*

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio.

Allium sativum L. “ajo” debido principalmente a la alicina y sus productos de transformación, produce un efecto ligeramente hipolipemiente (colesterol, triglicéridos), antiagregante plaquetario, activador de la fibrinólisis, vasodilatador periférico (con efecto antihipertensivo), antimicrobiano (antibacteriano, antifúngico) y antihelmíntico (especialmente frente a oxiuros) por su acción antimicrobiana es útil para combatir los catarros y otras infecciones del tracto respiratorio.³

En un estudio realizado por Munayco E. y Moromi H. cuyo objetivo fue determinar el efecto antimicrobiano y antifúngico del extracto de *Allium sativum* L. frente a las cepas ATCC de *Streptococcus mutans*, *Capnocytophaga sputigena*, *Lactobacillus casei* y *Candida albicans* a diversas concentraciones. Se utilizó el método de difusión mediante discos, ciprofloxacino y fluconazol como control positivo de las bacterias y hongo, respectivamente, y el alcohol de 70° como control negativo. Al realizar las pruebas de sensibilidad con el extracto a las concentraciones de 12 mg/mL, 18 mg/mL, 30 mg/mL, 60 mg/mL, 90 mg/mL y 120 mg/mL, se obtuvo los siguientes resultados: La concentración antimicrobiana frente al *Capnocytophaga sputigena*, *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*, fue de 120 mg/mL, teniendo como referencia de estándar al ciprofloxacino a una concentración de 4 mg/mL y al fluconazol a una concentración de 2 mg/mL. Se concluye que el extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* L. presentó efecto antimicrobiano frente a la cepa ATCC de *Streptococcus mutans*, *Capnocytophaga sputigena* y *Candida albicans* a excepción de *Lactobacillus casei* que presentó resistencia.¹

Un estudio de tipo prospectivo y descriptivo fue realizado en el laboratorio de Microbiología de la Clínica Universitaria UCEBOL-Bolivia con el fin de determinar

la actividad antibacteriana del ajo contra el *Streptococcus pyogenes*. Para obtener el macerado de ajo (*Allium sativum L.*) se utilizaron 3 tipos de solventes de distinta polaridad como son: agua destilada estéril, éter de petróleo 60° - 80° y etanol 96°. Se utilizó ajo (*Allium sativum L.*) de la variedad colorada y el antibiótico bacitracina para la verificación del *Streptococcus pyogenes* y su respectiva comparación con los extractos de ajo en los diferentes solventes. La actividad antibacteriana *in vitro* del ajo (*Allium sativum L.*) se realizó sobre la cepa ATCC 19615 de *Streptococcus pyogenes*. Se obtuvo óptimos resultados con el extracto etílico lo que demuestra que la concentración mínima inhibitoria que tiene el extracto etílico es de 12 mg/mL ya que a concentraciones menores existe desarrollo del *Streptococcus pyogenes*.⁴

Se ha comprobado que los principios activos de muchos productos naturales tienen efecto sobre diferentes tipos de bacterias, es por ello que se realizó un estudio del efecto inhibitorio que tienen los extractos de *Allium cepa* (cebolla) y *Allium sativum L.* (ajo) sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*, las cuales son bacterias asociadas a trastornos entéricos de muchos animales y que también pueden afectar al hombre. Mediante un análisis en microplaca se determinó que se requieren cantidades de por lo menos 12,5 mg/mL de ajo para inhibir el crecimiento de las bacterias mencionadas. La cebolla no presentó resultados favorables en el análisis en microplaca, pero mediante la determinación de la tasa porcentual de eliminación se observó que ejerce un efecto bactericida sobre las bacterias, concluyendo que se requieren al menos concentraciones mayores al 10% de su extracto para tener resultados favorables.⁵

El ajo posee varias virtudes tanto culinarias como farmacéuticas, que despierta gran interés en la medicina natural sobre todo por su actividad antimicrobiana. Por lo que evaluaron la capacidad antimicrobiana del ajo en cepas bacterianas como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Obtuvieron la alicina del ajo mediante un proceso de trituración para luego exponer a las tres cepas en tres diferentes concentraciones (0,5, 1,5 y 3 mL) y a partir de ello determinar su capacidad antimicrobiana. Los resultados evidenciaron que: *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* se inhibían totalmente a una concentración de 3 mililitros, mientras que *Escherichia coli* no se inhibió ante ninguna concentración.⁶

Mercado P. y Arévalo L.⁷ evaluaron la sensibilidad de los cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa* frente a la acción antibacteriana del extracto de *Allium sativum* L. "ajo" por el método de Kirby Bauer haciendo hoyos de 5mm de diámetro y 5mm de profundidad en agar Mueller Hinton; independientemente se realizó un control de susceptibilidad utilizando discos de cefalexina para *Staphylococcus aureus*, vancomicina para *Staphylococcus epidermidis* y Ciprofloxacino para *Pseudomonas aeruginosa*. En los resultados obtenidos se observa una mayor acción antibacteriana con los cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa* a la concentración del 100% extracto de *Allium sativum* L. Estos hallazgos coinciden con los publicados en otros trabajos y se confirma el efecto antibacteriano, pues las concentraciones utilizadas del extracto inhiben el crecimiento formando halos de gran tamaño y con una diferencia significativa elevada.

Los estudios de genotoxicidad, se realizan con el fin de identificar posibles daños para el ser humano, debido a que se ha detectado extractos de plantas medicinales que poseen actividad embriotóxica, teratogénica, mutagénica y carcinogénica, con una correlación positiva entre la ocurrencia de enfermedades y su consumo. Ayala⁸ realizó un estudio planteándose como objetivo determinar el efecto genotóxico *in vitro* de las plantas medicinales antibacterianas de flores de *Spartium junceum* L. "retama", vainas de *Caesalpinia spinosa* (Melina) Kuntze "tara" y hojas de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto". La determinación genotóxica a diferentes concentraciones, exponiéndose éstos sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*; la estimación del daño genotóxico *in vitro* fue determinado con el "método Tomasevich", 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 extractos hidroalcohólico presentaron una importante actividad genotóxica sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, siendo los extractos de "tara" y "eucalipto" con mayor efecto genotóxico a concentraciones de 50 mg/mL y 100 mg/mL con respecto a la "retama". Se concluye que el daño genotóxico depende directamente de la concentración de los extractos hidroalcohólico; mas no así del tiempo de incubación, a excepción del extracto de "retama" que depende de este tiempo.

Moreno M.⁹, reporta que *Carica papaya* L. “papaya” es un árbol con muchas propiedades nutritivas y medicinales; las flores, hojas, frutos y semillas son usadas para preparar remedios caseros en el tratamiento de diferentes males; el látex es usado en las regiones tropicales de Perú, para el tratamiento de las úlceras de piel producida por la leishmaniosis o uta. Se plantaron como objetivo evaluar de la genotoxicidad *in vitro* de látex fresco y cristalizado de *Carica papaya* L. “papaya”, frente a ADN genómico humano. El látex fue obtenido directamente del fruto no maduro, la cristalización de látex fue en incubadora a 37°C durante 7 días. La evaluación de la genotoxicidad *in vitro* por la fragmentación del ADN, fue determinado con el “método Tomasevich” preparando dos baterías de tubos: uno para látex fresco y otro para látex cristalizado a concentraciones de 1%, 2.5%, 5%, 10%, 25%, 50% y 100 %, 6 µL de cada uno de éstos se enfrentó sobre 14 µL de ADN genómico humano a concentración de 1,500 ng/µL, usaron como “blanco” el látex al 100%, como “control” 14 µL de ADN y un tubo que contenía el látex al 100%, proteinasa K y ADN; cada batería de tubos fueron incubados a 37°C durante una hora; estos productos, además de un marcador de tamaño molecular (50 pb), sometieron a electroforesis a 40 voltios durante tres horas en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1%, luego visualizó en radiación de luz ultra violeta y se tomó el registro fotográfico con Biometra *UVsolo TS*; realizaron cuatro repeticiones de estos ensayos. Todos los registros fotográficos de los corridos electroforéticos, revelan que las siete concentraciones ensayadas de 1% al 100% de látex fresco, fragmentaron totalmente al ADN genómico humano; mientras que las concentraciones de 10%, 25% y 50% de látex cristalizado, han fragmentado entre 20% al 40% del ADN y a concentración de 100% de látex cristalizado degradado entre el 40% al 95% del ADN genómico humano, demostrando que la genotoxicidad del látex cristalizado si depende de su concentración.

El tubo que contenía látex fresco al 100%, proteinasa K y ADN, también muestra fragmentación total del ADN, corroborando que este efecto fue por acción de los metabolitos secundarios, mas no por la actividad de nucleasas que podrían estar presentes en el látex, debido a que ellas serían destruidas por acción de la proteinasa K en el periodo de incubación. Se concluye que el látex fresco de *Carica papaya* L. “papaya” presentan una potente actividad genotóxica frente a ADN genómico humano, mientras que la de látex cristalizado, depende de su concentración.

2.2 Marco conceptual

2.2.1 *Allium sativum* L. “ajo”.

2.2.1.1 Clasificación Taxonómica

La identificación botánica se realizó según el sistema de clasificación de Cronquist A 1988 a cargo de la Blga. Laura AUCASIME MEDINA (Anexo N° 01), de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga:

División	: Magnoliophyta
Clase	: Liliopsida
Sub clase	: Liliidae
Orden	: Liliales
Familia	: Liliaceae
Género	: <i>Allium</i>
Especie	: <i>Allium sativum</i> L.
Nombre Vulgar:	: “ajo”

2.2.1.2 Descripción botánica

Planta herbácea, perenne, acaule, bulbosa, con bulbos secundarios de color blanco o cremoso, hinchados, ovales de ápice agudo, llamados dientes de ajo, muy olorosos, reunidos sobre un tallo discoide, recubiertos por escamas membranosas, translúcidas, blanco amarillosas, que forman la llamada cabeza de ajo, cada una con 8 a 14 dientes. Hojas de color verde azulado o verde rojizo, planas, con un canal central, ápice agudo, hasta de 50 cm de longitud y 3 cm de ancho. Flores rosadas o blanquecinas agrupadas en pequeñas umbelas densas, esféricas, localizadas entre pequeños bulbos.¹⁰



Figura 1: *Allium sativum* L. “ajo”

2.2.1.3 Composición química

Los bulbos pulverizados y secos contienen 1% de aliína como aminoácido sulfurado principal. En presencia de la enzima aliinasa, la aliína se convierte en alicina. La alicina es precursor de varios productos de transformación, incluidos ajoenos, vinilditiinos, oligosulfuros y polisulfuros. El ajo también contiene vitamina A, C, saponinas, esteroides y otras sustancias.⁴

El bulbo de ajo contiene agua (50-60%), materia minerales (2%), glúcidos (fructosanas), vitaminas (A, B₁, B₂, B₃ y C) y una pequeña cantidad de aceite esencial. Sus principios azufrados: la aliína que por acción de la enzima aliinasa se transforma en aliicina, compuesto muy inestable que ese descompone rápidamente produciendo sulfuros volátiles, principalmente disulfuro de dialilo, son sustancias oleosas bastante estables, responsable del olor y del sabor del ajo. Ajoenos, entre los que se encuentran E-ajoeno y sus derivados metil-ajoeno y dimetil-ajoeno.¹¹

2.2.1.4 Usos tradicionales

El ajo es considerado el mejor remedio vegetal. Se le atribuye un efecto especialmente fortificante y curativo del intestino, combate las bacterias en éste y se usa para aliviar personas con disenterías y cólera. Se dice que favorece el funcionamiento del aparato digestivo, evita el estreñimiento, calma el dolor de estómago y brinda protección contra intoxicación alimentaria e infecciones gastrointestinales. Se considera que actúa favorablemente sobre algunas glándulas endocrinas. Se le atribuye un efecto regulador del ácido úrico, con el cual se eliminan las molestias de las articulaciones en casos de reumatismo, gota y ciática. Se cree que es un excelente hipotensor, sedante nervioso, excitante, estimulante, eficaz medio de prevención contra contagios y enfermedades de toda clase; además de ser un antibiótico y estimulante del sistema inmunitario. Popularmente. Es el más importante depurador de la sangre, se considera que favorece el buen estado y funcionamiento del corazón, el cual es el órgano que más beneficia con su uso, pues reduce los peligros de ataque cardiaco, ya que purifica y fluidifica la sangre lo que facilita el riesgo hemostático de las coronarias; de ese modo evita la esclerosis, el envejecimiento arterial, la endocarditis, la pericarditis, deshace los coágulos, embolias y cristaloides, reduce el índice de colesterol y ayuda regular el nivel de azúcar en la sangre. Además, se emplea como antibiótico, antihelmíntico, antiasmático, antiflatulento, antidiabético, antitrombótico, fungicida, desinfectante, expectorante, diurético.¹⁰

2.2.1.5 Propiedades fitofarmacológicas

Allium sativum L. "ajo" es hipotensor suave, antiséptico (conservante de alimentos), antibacteriano (bactericida y bacteriostático), antiviral y antifúngica. Tiene propiedades diuréticas y es expectorante. Presenta efecto hipolipemiente, disminuyendo el nivel de colesterol LDL en sangre, y anticolesterolémico. El consumo de ajo y sustancias que producen un aumento del colesterol, conjuntamente, disminuye notablemente la absorción del colesterol por el organismo. Fluidifica la sangre, mejora sus propiedades reológicas porque actúa como antiagregante plaquetario y fibrinógeno. Es por lo tanto antitrombótico, tiene efecto hipoglucemiante, normaliza los niveles de glucosa en sangre. Tiene efecto antioxidante. Como principios activos actúan principalmente la aliína, los ajoenos y sulfuros. El ajo tiene también propiedades antitumorales por lo que su consumo habitual previene el desarrollo de determinados cánceres.¹²

Actividad antimicrobiana: El extracto acuoso de bulbo fue activo *in vitro* contra *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Proteus sp* y *Staphylococcus aureus* e inactivo contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*.¹³

Actividad antifúngica: En un ensayo *In vitro* se le encontró actividad particularmente sobre dermatofitos. El extracto hidroalcohólico (1:1) de bulbo fresco machacado (20 o 50% peso/ volumen), en concentraciones de 50 y 100 uL/pozo, mostró actividad significativa *in vitro* frente a *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton metagrophytes* y levaduras patógenas al hombre; lleva a la inhibición de la síntesis de macromoléculas de *Candida albicans*.¹³

Actividad hipoglucemiante: El extracto alcohólico de bulbo administrado por vía oral a conejo mostró actividad hipoglucemiante en el 59% de los animales tratados, en comparación con el grupo que recibió 500 mg de tolbutamida. Con el test de sobrecarga de glucosa en rata el extracto de bulbo seco disminuyó la hiperglucemia inicial; el polvo de ajo añejado, en ratas, aumentó los niveles de insulina en sangre. En un estudio aleatorizado y controlado, el extracto de polvo seco de ajo en pacientes diabéticos no insulino dependientes provocó un descenso del 11.6% de la glucemia contra 0% del grupo placebo.¹³

Antiagregante plaquetario: 25mg/mL provocaron *in vitro* inhibición de la agregación plaquetaria inducida por epinefrina, determinada por la mayor producción de óxido nítrico a nivel intracelular, el extracto acuoso al 0.01% mostró un efecto débil.¹³

2.2.2. Staphylococcus.

El término *Staphylococcus* (derivado del griego *staphylé*, que significa “racimo de uvas”) proviene del cirujano escocés Sir Alexander Ogston quien, en 1881, observó microscópicamente unas bacterias que estaban agrupadas en forma de racimo en el pus de un absceso cutáneo humano.¹⁴

2.2.2.1 Clasificación taxonómica

La identificación taxonómica se realizó según Rosenbach 1984 a cargo del Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich (Anexo N°2) responsable del Centro de Investigación de Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga:

Dominio	: Bacteria
Filo	: Firmicutes
Clase	: Bacilli
Orden	: bacillales
Familia	: Staphylococcaceae
Género	: Staphylococcus
Especie	: <i>Staphylococcus sp.</i>
Nombre común	: “estaphylococos”

2.2.2.2 Características microscópicas

Las especies del género *Staphylococcus* son cocos gram positivos de 0,5 a 1,5 µm de diámetro, que suelen agruparse formando racimos irregulares debido a la tendencia a dividirse en más de un plano. Menos frecuentemente aparecen solos, en parejas, tétradas, o cadenas cortas.¹⁴

2.2.2.3 Hábitat

Staphylococcus epidermidis es integrante de la flora normal de la superficie corporal donde sobrevive gracias a sus lipasas, mientras *Staphylococcus aureus* se encuentra habitualmente a nivel de la nasofaringe y de zonas húmedas como pliegues inguinales y axilas. A nivel del vestíbulo nasal anterior la adherencia parece estar mediada por el contenido en ácidos teicoicos. Se estima que el índice de portación nasal en los adultos es de alrededor del 20-30%. Expresado longitudinalmente, cerca del 30% de la población puede ser portador permanente, el 50% portador intermitente y el 20% no es colonizado. Algunas poblaciones pueden tener una tasa de colonización mayor como el personal de salud, los pacientes en hemodiálisis, diabéticos, adictos a drogas intravenosas, etc. A pesar que *S. aureus* posee numerosos factores de virulencia, puede

convivir con el huésped humano formando parte de su flora normal sin causar ningún daño.¹⁵

2.2.2.4 Metabolismo

En cuanto a su forma de obtener energía es tanto a través de la fermentación como de la respiración. En cuanto a los requerimientos de cultivo, son no exigentes desde el punto de vista nutricional, creciendo en medios pobres y simples. En su relación con el oxígeno son aerobios-anaerobios facultativos.¹⁵

2.2.2.5 Resistencia a agentes físicos y químicos:

Es muy resistente a las condiciones ambientales normales. Es capaz de sobrevivir hasta tres meses en un cultivo a temperatura ambiente. Muere expuesto a temperaturas mayores de 60°C por una hora. En cuanto a los agentes químicos, es sensible a la mayoría de los desinfectantes y antisépticos, que lo matan en pocos minutos.¹⁵

2.2.3 Toxicidad y genotoxicidad

2.2.3.1 Toxicidad

La toxicidad es la capacidad de una sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él. Tóxico es cualquier sustancia, artificial o natural, que posea toxicidad (es decir, cualquier sustancia que produzca un efecto dañino sobre los seres vivos al entrar en contacto con ellos).¹⁶

2.2.3.2 Genotoxicidad

La genotoxicidad es la capacidad relativa para causar daño al material genético por agentes físicos, químicos o biológicos. El daño 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 descondensación del ADN en los cromosomas u otras estructuras como el huso mitótico, responsable de la distribución de los cromosomas durante la división celular. Este daño puede ser de tipo mutágenos o carcinógeno.^{17, 18}

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 en 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.¹⁸

Las pruebas de genotoxicidad se puede definir como pruebas *in vitro* e *in vivo*, diseñadas para detectar compuestos que induzcan daño genético, directa o indirectamente, por diversos mecanismos; son necesarios antes de que se produzca la exposición en el ser humano.¹⁹

2.2.3.3 Mecanismo de genotoxicidad

Las sustancias genotóxicas pueden unirse directamente al ADN o actuar indirectamente mediante la afectación de las enzimas involucradas en la replicación del ADN y causando en consecuencia mutaciones que pueden o no desembocar en un proceso canceroso.¹⁷

Los mutágenos y carcinógenos genotóxicos son compuestos electrófilos muy reactivos y con gran afinidad por el ADN, como los derivados de compuestos orgánicos nitrogenados o halogenados, epóxidos, lactonas o compuestos inorgánicos de níquel, cromo, uranio, etc.

Los genotóxicos pueden provocar mutaciones por cambios en algunos nucleótidos debidos a:²⁰

- Sustituciones en las bases: purinas por otras purinas, pirimidinas por otras pirimidinas o purinas por pirimidinas o viceversa.²¹
- Sustitución de una base por una sustancia análoga originando un nucleótido inútil para la duplicación.
- Alteración química de las bases mediante oxidación, desaminación.
- Alquilación de la molécula del ADN incorporando grupos químicos a las bases, mediante enlaces covalentes, formando lo que se conocen como aductos.^{21,22}
- Desfases que consisten en la adición o deleción de bases, modificando la pauta de lectura.

También, pueden provocar aberraciones cromosómicas como:

- Lesiones cromosómicas por rotura, deleción, intercambio o reorganización del material cromosómico y translocaciones.
- Cambio en el número de cromosomas.²²

Tras la lesión producida en el ADN, la célula puede sufrir tres procesos:

- Impedimento de la replicación produciendo la muerte por apoptosis.

- Replicación con nucleótidos alterados, o con errores en la replicación del ADN, es decir, se transmite una mutación. Esta mutación puede ocurrir en una célula somática dando por ejemplo un proceso canceroso o malformaciones congénitas en el recién nacido; o en una célula germinal produciendo una enfermedad hereditaria o generando en el individuo una mayor susceptibilidad de contraer determinadas enfermedades.²¹
- Reparación del daño en la molécula de ADN evitándose la mutación.²³

En cuanto a los carcinógenos genotóxicos, actúan como iniciadores del proceso de carcinogénesis. Esta comienza con una mutación en una sola célula pudiendo ser a nivel del metabolismo del xenobiótico, haciendo que una sustancia procancerígena se convierta en cancerígena; en la reparación del ADN dificultándola o impidiéndola y/o estimulando la proliferación celular.²¹ Este proceso se conoce como iniciación.²³

Suelen ser sustancias químicas, como compuestos alquilantes (mostazas nitrogenadas), especies reactivas de oxígeno, aflatoxinas, productos de combustión, nitrosaminas, etc.²⁴ Su mecanismo de acción está basado en la formación de enlaces covalentes con el nitrógeno 7 de la guanina (aductos), produciéndose una mutación irreversible. Algunas características de ellos son:

- Activos a todas las dosis, no hay una dosis mínima umbral a partir de la cual se aprecie un efecto.
- Presentan una correlación estructura, actividad, pudiéndose detectar mediante ensayos experimentales.^{20,25}
- La mayoría se clasifican como procarcinógenos, es decir, requieren una biotransformación para reaccionar con el ADN, la cual se puede producir tanto en la Fase I como en la Fase II del metabolismo. Aquí podemos encontrar hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas, micotoxinas, etc.²⁵

2.2.4 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.²⁶

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.²⁷

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.³⁷ En los últimos años las pruebas para medir daño a nivel primario del ADN, han alcanzado gran importancia entre los análisis de genotoxicidad.²⁷

Si los resultados *in vitro* son negativos, debe continuarse, en segunda instancia, con ensayos *in vivo* que respondan a los mismos niveles de daño genético que se evaluaron *in vitro*. Una vez evaluados los niveles génico y cromosómico, con ensayos *in vitro* e *in vivo*, se deben incluir ensayos que midan daño primario al ADN y de acuerdo con el resultado obtenido, se debe tomar la decisión de realizar ensayos que midan otras alteraciones y carcinogenicidad. En cualquiera de los ensayos y niveles de daño evaluados se deben emplear protocolos estandarizados (validados internacionalmente) que tomen en consideración las dosis, el tipo de exposición y la vía de administración propuesta para el fármaco.²⁶

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 el campo de la investigación científica para detectar genotoxicidad inicial: aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas; micronúcleos, síntesis de ADN no programada y electroforesis de una célula (ensayo del cometa).²⁶

2.2.5 Electroforesis en gel

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas en una mezcla por aplicación de un campo eléctrico. Las moléculas disueltas se desplazan o migran en un campo eléctrico a una velocidad determinada por su relación carga y masa, si dos moléculas tienen masa y formas iguales, la de mayor carga neta se desplazará más rápido hacia un electrodo.²⁶

Cuando se dirige una molécula de ADN con una enzima de restricción apropiada, se corta en fragmentos específicos. Estos fragmentos se pueden separar en función de su tamaño, por medio de una electroforesis en gel. Para ello, el ADN cortado se coloca en un gel de agarosa o poliacrilamida. Cuando pasa una corriente eléctrica a través del gel, cada fragmento se desplaza hacia abajo con una velocidad proporcional al logaritmo de su peso molecular. El desplazamiento produce una serie de bandas. Cada banda corresponde a un fragmento de tamaño definido, que es de menor cuando más abajo está en el gel. La longitud de cualquier fragmento concreto se puede determinar calibrando el gel. Para ello, en otro carril del mismo gel se hace correr un control paralelo. El control es una mezcla de fragmentos patrón, que tiene tamaños conocidos y se llaman marcadores. La migración de los marcadores define la relación entre la longitud de fragmento y la distancia recorrida en el gel.²⁸

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. 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) migraran hacia el cátodo y las cargadas negativamente (aniones) hacia el ánodo.²⁹

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. El método consiste en inmovilizar las muestras en estudio en un material gelatinoso (gel). El gel se somete a una corriente eléctrica durante un período 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.²⁹

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. 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 migrarán 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 (6X loading dye) que nos permita detener la electroforesis en el momento que lo creamos oportuno. 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.²⁹

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. 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.²⁹

2.2.6 Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son macromoléculas, incluso mayores que las proteínas y así tienen una amplia posibilidad para transmitir información en la forma de agrupamiento de grupos químicos con una complejidad comparable a la disposición de los aminoácidos en las proteínas.³⁰

Los ácidos nucleicos se forman cuando los nucleótidos se unen entre sí por medio de puentes diéster entre átomos de C3 de un nucleótido y el C5. La secuencia lineal de los nucleótidos generalmente se expresa en dirección 5' a 3'.³¹

2.2.7 Ácido desoxirribonucleico (ADN o DNA)

El ADN o ácido desoxirribonucleico es el componente químico primario de los cromosomas y el material del que los genes están formados, es el almacén de la información” que cada individuo posee y que necesita para llevar a cabo todas sus funciones vitales.³²

La molécula de ADN está formada por dos largas cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una estructura en doble hélice. Las dos cadenas de nucleótidos que constituyen una molécula de ADN, se mantienen unidas entre sí por enlaces entre las bases nitrogenadas de ambas cadenas que quedan enfrentadas.³²

Los componentes del ADN (polímero) son los nucleótidos (monómeros); cada nucleótido está formado por un grupo de fosfato, una desoxirribosa y una base nitrogenada. Existen cuatro bases: dos purínicas denominadas adenina (A) y guanina (G) y dos pirimidicas denominadas citosina (C) y timina (T). La estructura en doble hélice del ADN, con el apareamiento de bases limitado (adenina con timina y guanina con citosina), implica que el orden o secuencia de bases de una de las cadenas delimita automáticamente el orden de la otra, por eso se dice que la cadenas son complementarias.³²

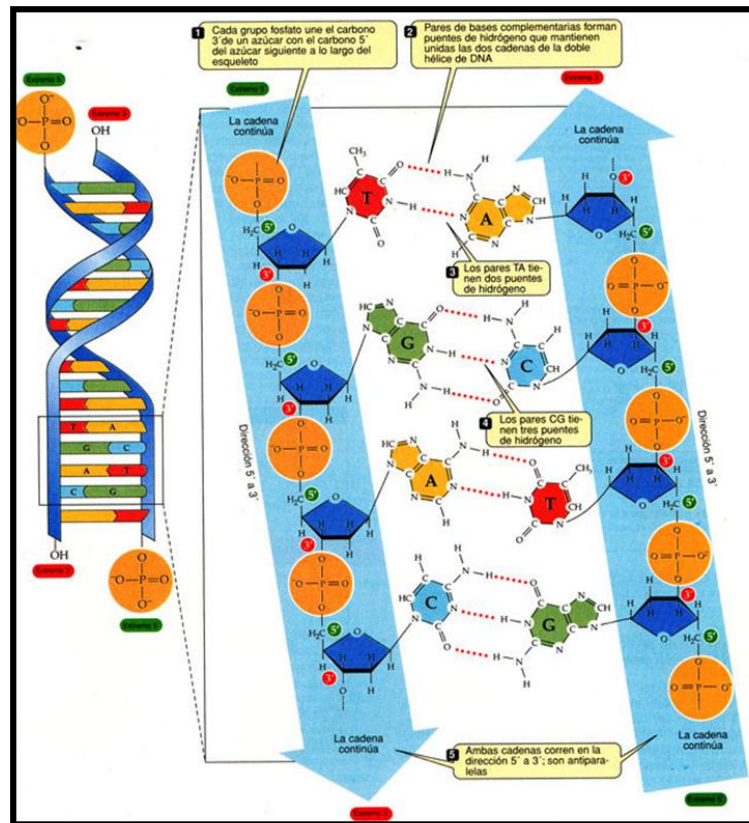


Figura 2. Estructura química de ADN

2.2.8 Método Tomasevich Evaluación de la genotoxicidad *in vitro*.

Miranda³³, formuló un método para determinar el efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales y/o productos fitoterapéuticos frente a ADN genómico. Es necesario conocer ¿qué órgano de la planta? tallos, flores, hojas, frutos y/o semillas son usadas para preparar los remedios caseros y obtener el extracto de la misma, que puede ser acuoso, hidroalcohólico o con otro solvente orgánico; si se va estudiar el látex, se recomienda obtenerla directamente de la planta.

Preparar soluciones del extracto a diferentes concentraciones: 1 mg/mL, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL; en caso del látex preparar diluciones a concentraciones de 1%, 2.5%, 5%, 10%, 25%, 50% y 100 %. Por otro lado, obtener ADN genómico del organismo en estudio: humano, animal o microbiano, mediante extracción orgánica o kit comercial, procurando que el ADN sea íntegro, no fragmentado; seguidamente preparar un stock de 200 µL a concentración de 1,500 ng/µL.

Para la evaluación de la genotoxicidad *in vitro* mediante la fragmentación del ADN, etiquetar una batería de 10 tubos de 500 µL; depositar 14 µL de ADN del stock en los tubos N° 1 al 7, luego agregar 6 µL de cada una de las concentraciones del extracto o látex a los tubos correspondientes de 1 al 7; el tubo N° 8 se usa como “blanco”, depositando 14 µL de extracto a 100% o látex a 100% más 6 µL de agua bidestilada; el tubo N° 9 se usa como “control”, colocando 14 µL de ADN más 6 µL de agua bidestilada; el tubo N° 10 se usa como “descarte de nucleasas”, colocando 14 µL de ADN más 6 µL de extracto a 100% o látex a 100%, más 6 µL de la enzima proteinasa K. Cada batería de tubos incubar en baño María a 37°C durante una hora y de ser necesario hasta cuatro horas. Estos productos del ensayo, además de un marcador de tamaño molecular (50 pb), se someten a electroforesis a 40 voltios durante tres horas en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1%, luego se visualizará en radiación de luz ultra violeta y se tomar el registro fotográfico. Estos registros fotográficos, revelan la actividad genotóxica mediante fragmentación del ADN de las siete concentraciones ensayadas; el “blanco” sirve para verificar que no exista ADN contaminante en el extracto o látex; el “control” se usa para comparar la cantidad de ADN sin tratamiento, respecto a los siete tubos que recibieron tratamiento; y el “descarte de nucleasas” para corroborar el efecto por acción de los metabolitos secundarios, mas no por la actividad de nucleasas, debido a que ellas serían destruidas por acción de la proteinasa K en el periodo de incubación.

El grado de fragmentación se compara por porcentaje, llevando a una escala numérica de cero a cuatro. Se concluye que el método Tomasevich, es eficaz y eficiente para determinar genotoxicidad de las plantas medicinales mediante fragmentación de ADN.

2.2.9 Ensayo cometa (EC)

Es un biomarcador rápido, simple, visual y sensible, conocido como electroforesis unicelular alcalina, que se utiliza para medir y analizar rupturas en el ADN. Detecta diferencias intracelulares y daño en los procesos de reparación de virtualmente todas las células. La capacidad de migración del ADN depende de la cantidad de rompimientos producidos por el agente en cuestión de esta manera cada célula lesionada tiene la apariencia de un cometa con una cabeza y una cola brillante y fluorescente; las células que no han sido dañadas aparecen con núcleos intactos, sin cola.³⁴

Existen muchas versiones del ensayo cometa que se aplican constantemente en diferentes laboratorios a nivel mundial; la metodología general y estándar fue descrita por Ostling y Johanson en 1984 y luego reformada por Singh *et al.* En 1988, sin embargo, actualmente, se han dado a conocer distintas modificaciones a la técnica dependiendo de los intereses de estudio de algunos grupos de investigación.³⁵

2.2.9.1 Ventajas del Ensayo Cometa

El ensayo cometa o electroforesis de una sola célula provee ciertas ventajas ante otras pruebas que evalúan el daño genotóxico por efecto. En este test los datos son colectados a nivel de células individuales, proveyendo información de la distribución intercelular del daño y de la reparación. Así mismo se requiere sólo pequeños números de células para ser llevado a cabo y virtualmente cualquier población de células eucariotas puede ser utilizada en el proceso.³¹ Por medio de este ensayo es posible evaluar el daño en células no proliferativas, lo que representa también un gran beneficio sobre otras técnicas que si lo requieren.³⁶

En la electroforesis de una sola célula además se ha reportado mayor sensibilidad de detección de daño con respecto a otras pruebas de citogenética clásica. Estudios comparativos en donde se evalúan los efectos genotóxicos de la radiación por rayos X en linfocitos humanos, establecen que el daño se incrementa con las dosis de radiación proporcionadas a la muestra tanto en el test de micronúcleos como en el ensayo cometa, sin embargo, la sensibilidad del

ensayo cometa es significativamente superior, puesto que el daño es detectado incluso a bajas exposiciones. El ensayo del cometa alcalino es considerado también en otros estudios comparativos de carácter farmacéutico para la evaluación de nuevas drogas, junto con la prueba de aberraciones cromosómicas, mostrando un alto grado de valor predictivo.³⁷

A nivel general este test de genotoxicidad es bastante flexible permitiendo la detección de un amplio rango de daños que pueden ocasionarse en el ADN y consta de un proceso sencillo y de rápida ejecución, por lo que es posible la obtención de resultados el mismo día en que se ha tomado la muestra y se ha realizado el protocolo.³⁷

2.2.9.2 Desventajas del Ensayo Cometa

A pesar de que la técnica ha sido ampliamente empleada y aceptada a nivel mundial, existen algunas desventajas en su proceso de evaluación. La primera de ellas hace referencia al estricto manejo y preparación de los reactivos y el número de variables que pueden afectar un óptimo desarrollo, pues cualquier alteración en la concentración de la agarosa, el estado de las distintas soluciones de trabajo, el pH, la temperatura y los tiempos de cada paso, pueden cambiar drásticamente el resultado a analizar debido a la alta sensibilidad de la técnica. La segunda desventaja y la más nombrada, hace referencia a la falta de estandarización en el análisis de las muestras y la representación de los datos que se obtienen en los estudios, ya que, aunque muchos investigadores abarcan el tema, proponen constantemente nuevas formas de valoración, sin definir un único proceso de evaluación que permita la comparación entre laboratorios.³⁸

2.2.9.3 Aplicaciones

El ensayo cometa es una de las técnicas más empleadas en la actualidad dentro del área de la genética toxicológica. Por su método económico, rápido y efectivo, es empleado en el estudio de seguimiento a exposiciones medio ambientales y ocupacionales de poblaciones humanas. En las disciplinas medioambientales, por ejemplo, se han realizado estudios del impacto de genotóxicos en medios acuáticos usando como modelo biológico distintas especies de peces. Así mismo en el área clínica, se han adelantado estudios de Farmacovigilancia de distintas drogas de genotoxicidad de productos químicos de los que hacen parte incluso el empleo de determinados tipos de resina en la salud oral;³⁴ y estudios sobre mutágenos de línea germinal.³⁹

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo entre los meses de diciembre de 2016 a junio de 2017, la identificación taxonómica fue realizada por la Blga Laura Aucasime (Anexo N° 1); la obtención del extracto etanólico de *Allium sativum* L. “ajo” y ensayos fitoquímicos se realizaron en el laboratorio de Farmacognosia de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; la obtención de ADN de *Staphylococcus sp.* y los ensayos de genotoxicidad se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática (C.I.B.M.B.) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH).

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

Allium sativum L. “ajo”, que crece en los pisos ecológicos del distrito de Chuschi, provincia de Cangallo de la región Ayacucho.

3.2.2 Muestra

Un kilogramo de bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”.

3.2.3 Muestreo

El tipo de muestreo fue no probabilístico o dirigido, obteniéndose un sub grupo de la población en la que la elección de los elementos, no depende de la probabilidad sino de las características de la investigación.^{40,41}

Criterios de inclusión:

- Bulbos de *Allium sativum* L. “ajo” maduro, fresco y en buenas condiciones.

Criterios de exclusión:

- Bulbos de *Allium sativum* L. “ajo”, inmaduro, secos y en malas condiciones,

3.3 Unidad experimental

ADN genómico de *Staphylococcus sp.* a concentración de 1500 ng/ μ L por cada ensayo.

3.4 Metodología y recolección de datos

3.4.1 Recolección de la muestra

Las muestras fueron recolectadas en el distrito de Chuschi, provincia de Cangallo de la región Ayacucho, luego se transportó al Laboratorio de Farmacognosia, para el correspondiente estudio, separando aquellas que cambiaron de color o muestren signos de alteración.

3.4.2 Obtención del extracto etanólico y zumo

Se procedió a realizar la preparación del extracto etanólico⁴² con aproximadamente 500 g de bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”, maduro, fresco y en buenas condiciones, que fueron molidas en un mortero de porcelana previamente esterilizado, con la finalidad de reducir hasta una masa homogénea, ésta muestra molidas de la planta medicinal en estudio, se maceró en un frasco de vidrio color ámbar por cinco días, para ello se agregó 1 L de etanol de 96°, cubriendo a la muestra por más de 1 cm de diferencia. En este proceso se agitó el frasco por 15 minutos dos veces al día, durante los 5 días de la maceración, para que el etanol se distribuya homogéneamente en la muestra, este frasco de maceración se mantuvo en un lugar fresco y oscuro. Luego se procedió a filtrar con ayuda de una bomba al vacío y papel filtro, posteriormente se llevó a un evaporador rotatorio BUCHI–3000 a presión reducida y finalmente se concentró a sequedad en una estufa MEMMERT. A partir de las cuales se realizó la determinación cualitativa fitoquímica y se prepararon las diferentes concentraciones para el ensayo preliminar del efecto genotóxico.⁴³

Para obtener el zumo, se utilizó 100 g de bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”, maduro, fresco y en buenas condiciones, fueron molidas en un mortero de porcelana previamente esterilizado en autoclave, con la finalidad de reducir hasta una masa homogénea y se procedió a filtrar en gaza estéril y luego en papel filtro estéril, ejerciendo cierta presión, para obtener el filtrado, con el cual se realizó la determinación cualitativa fitoquímica y también se prepararon las variadas concentraciones para los ensayos genotóxicos.

Las muestras del extracto etanólico y del zumo del “ajo” obtenidos, se sometieron a un control de calidad de esterilidad, siendo sembradas en placas de Petri con agar Mueller Hinton, e incubadas a 37°C durante 24 horas, verificándose que no exista desarrollo de colonias microbianas, para certificar que los extractos no están contaminados.

3.4.3 Identificación fitoquímica del extracto etanólico y zumo del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”

Se realizó una marcha fitoquímica cualitativa al extracto etanólico y zumo obtenido de *Allium sativum* L. “ajo”, para identificar los diferentes metabolitos secundarios. Las reacciones de identificación se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Lock⁴²

3.4.4 Cultivo de *Staphylococcus sp* y extracción de ADN genómico

Se realizó la reactivación de la cepa de *Staphylococcus sp*, en caldo Trypticase soya y luego se sembró en Agar Trypticase soya, con la finalidad de obtener una masa celular bacteriana y extraer el ADN genómico con el siguiente protocolo:

1. Se colocó 400 µL de buffer TE 1X a un tubo eppendorf de 2 mL y en ella se transfirió con un asa de kolle aproximadamente 100 mg de masa celular del cultivo joven de *Staphylococcus sp*, luego se procedió a la inactivación de las bacterias a 85°C por 25 minutos.
2. Se añadió 60 µL de Lisozima (10 mg/mL) e incubó a 37°C por 2 horas en baño María.
3. Luego se añadió SDS/proteinasa K (75 µL SDS 10% + 5 µL PK 10 mg/mL) e incubó a 65°C por 15 minutos.
4. Se aumentó 100 µL NaCl 5M más 5 µL de CTAB (N-cetil-N,N,N-Trimetil bromuro de amonio) e incubó a 65°C por 15 minutos.
5. Se agregó 750 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó agitando suavemente con la mano durante cinco minutos y se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos.
6. Luego de la formación de dos capas en el tubo eppendorf, se trasvasó cuidadosamente el sobrenadante a otro tubo eppendorf.
7. Se agregó 600 µL isopropanol helado al 100%, luego se llevó a incubación a – 20 °C por una noche.
8. Se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante.
9. Se añadió 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min.
10. Se descartó el sobrenadante y se rehidrató el sedimento con 50 µL de agua bidestilada estéril.
11. Se agregó 1 µL ARNasa de 20 mg/ µL y se incubó a 37°C durante 1 hora.
12. Luego se guardó a – 20 °C hasta su posterior análisis.

3.4.5 Ensayo de genotoxicidad *in vitro*

Se desarrolló siguiendo los protocolos descritos en Miranda^{8,9,33}, con las siguientes fases:

3.4.5.1 Fase de cuantificación y preparación de stock de ADN genómico obtenido para el ensayo

El ADN genómico obtenido de *Staphylococcus sp*, se cuantificó por espectrofotometría UV marca Eppendorf BioPhotometer plus; luego se preparó un stock a concentración de 1 500 ng/μL en volumen final de 200 μL, para cada planta medicinal en estudio.

3.4.5.2 Fase de ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico y zumo del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”, sobre el ADN genómico del organismo en estudio

A partir del extracto etanólico obtenido del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”, se procedió a preparar las soluciones a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL; posteriormente a 200 mg/mL, 300 mg/mL, 400 mg/mL y 500 mg/mL, utilizando agua bidestilada estéril como solvente.

Se acondicionó las mezclas para los ensayos de genotoxicidad *in vitro* de ADN genómico, de acuerdo al detalle siguiente:

Tabla 1. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad *in vitro* de extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo” sobre ADN genómico de *Staphylococcus sp*

Condiciones	Mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>						
	1	2	3	4	5	6	7
Tubo (N°)					Blanco	Control	PK
Stock de ADN (1 500 ng/μL)	14	14	14	14	-	14	14
Volumen en μL							
Extracto etanólico (mg/mL)	5	10	50	100	100	-	100
(μL)	6	6	6	6	20	-	3
Proteinasa K	-	-	-	-	-	-	3
Agua bidestilada estéril	-	-	-	-	-	6	3
Volumen total (μL)	20	20	20	20	20	20	23
Incubación en baño María a 37 °C					1 hora		

Tabla 2. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad *in vitro* de extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo” sobre ADN genómico de *Staphylococcus sp.*

Condiciones	Mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>							
	Tubo (N°)	1	2	3	4	5	6	7
						Blanco	Control	PK
Stock de ADN (1 500 ng/μL)	14	14	14	14	-	14	14	14
Volumen en μL								
Extracto etanólico (mg/ml)	200	300	400	500	500	-	-	500
(μL)	6	6	6	6	20	-	-	3
Proteinasa K	-	-	-	-	-	-	-	3
Agua bidestilada esteril	-	-	-	-	-	-	6	3
Volumen total (μL)	20	20	20	20	20	20	20	23
Incubación en baño María a 37 °C					1 hora			

A partir del zumo obtenido del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”, se procedió a preparar las soluciones a concentraciones de 5%, 10%, 50% y 100%, utilizando agua bidestilada estéril como solvente.

Se acondicionó las mezclas para los ensayos de genotoxicidad *in vitro* de ADN genómico, de acuerdo al detalle siguiente:

Tabla 3. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad *in vitro* de zumo del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo” sobre ADN genómico de *Staphylococcus sp.*

Condiciones	Mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>							
	Tubo (N°)	1	2	3	4	5	6	7
						Blanco	Control	PK
Stock de AND (1 500 ng/μL)	14	14	14	14	-	14	14	14
Volumen en μL								
Zumo (%)	5	10	50	100	100	-	-	100
(μL)	6	6	6	6	20	-	-	3
Proteinasa K	-	-	-	-	-	-	-	3
Agua bidestilada esteril	-	-	-	-	-	-	6	3
Volumen total (μL)	20	20	20	20	20	20	20	23
Incubación en baño María a 37 °C					1 hora			

3.4.6 Fase de electroforesis

3.4.6.1 Procedimiento

- Se preparó el gel de agarosa a 1.5% y se dispuso en una cámara de electroforesis Biometra.
- Para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa, se utilizó las cantidades descritas en la siguiente tabla:

Tabla 4. Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN de grupo 1 para el ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo". Ayacucho 2017.

Condiciones	Volúmenes de carga para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>							
Nº de carril del gel	1	2	3	4	5	6	7	8
(mg/mL)	Marcador	5	10	50	100	Blanco	Control	PK
Muestra	molecular							
(µL)	4	7	7	7	7	7	7	7
H ₂ O _d (µL)	2	2	2	2	2	2	2	2
Loading (µL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Volumen total (µL)	7	10	10	10	10	10	10	10

Tabla 5. Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN de grupo 2 para el ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo". Ayacucho 2017.

Condiciones	Volúmenes de carga para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>							
Nº de carril del gel	1	2	3	4	5	6	7	8
(mg/mL)	Marcador	200	300	400	500	Blanco	Control	PK
Muestra	molecular							
(µL)	4	7	7	7	7	7	7	7
H ₂ O _d (µL)	2	2	2	2	2	2	2	2
Loading (µL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Volumen total (µL)	7	10	10	10	10	10	10	10

Tabla 6. Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN de grupo 3 para el ensayo de genotoxicidad *in vitro* del zumo del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”. Ayacucho 2017.

Condiciones	Volúmenes de carga para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>							
Nº de carril del gel	1	2	3	4	5	6	7	8
(%)	Marcador	5	10	50	100	Blanco	Control	PK
Muestra	molecular							
(μ L)	4	7	7	7	7	7	7	7
H ₂ O _d (μ L)	2	2	2	2	2	2	2	2
Loading (μ L)	1	1	1	1	1	1	1	1
Volumen total (μ L)	7	10	10	10	10	10	10	10

- Luego se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se programó a 40 voltios (V) por tres horas de corrida.

3.4.7 Fase de lectura por radiación UV

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

3.4.8 Fase de 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.⁴⁴

Tabla 7. Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.

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%

3.5 Tipo de investigación

Experimental. Porque éste estudio reúne los dos requisitos para lograr el control y la validez interna: a) grupos de comparación (manipulación de la variable independiente), y b) equivalencia de los grupos.⁴¹

3.5.1 Diseño de investigación

La investigación que realizamos fue un diseño con posprueba únicamente y grupo de control, que incluye dos grupos: uno recibe el tratamiento experimental y el otro no (grupo de control). Es decir, la manipulación de la variable independiente alcanza solo dos niveles: presencia y ausencia. Cuando concluye la manipulación a ambos grupos se les administra una medición sobre la variable dependiente en estudio.⁴¹

Tabla 8. Diseño de investigación con posprueba únicamente y grupo de control.

GRUPOS	TRATAMIENTO	OBSERVACIÓN
G ₁	X	O ₁
G ₂	-	O ₂

Se realizaron cuatro repeticiones de cada ensayo.

3.6 Análisis de datos estadísticos

Los datos obtenidos fueron agrupados y presentados en tablas, expresado en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. Los valores que expresan el daño genotóxico se evaluó mediante el paquete estadístico SPSS versión 23, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis para muestras no paramétricas. El valor de $p < 0,05$ será considerado como el nivel estadísticamente significativo.⁴¹

Para lo cual se planteó la siguiente hipótesis:

H₀ = No presenta efecto genotóxico.

H_i = Presenta efecto genotóxico.

IV. RESULTADOS

Tabla 9. Metabolito secundario en el extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo". Ayacucho 2017.

Muestra	Reactivo	Metabolitos ensayados	Observación	Resultado
Extracto etanólico	FeCl ₃	Fenoles y/o taninos	Coloración rojo naranja	+++

Leyenda:

- +++ : Abundante
- ++ : Regular
- + : Escaso

Tabla 10. Metabolitos secundarios en el zumo del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo". Ayacucho 2017.

Muestra	Reactivo	Metabolitos ensayados	Observación	Resultado
Zumo	FeCl ₃	Fenoles y/o taninos	Coloración rojo naranja	+++
Zumo	Ácido 3,5 nitrobenzoico + Hidróxido de potasio	Cardenólidos	Coloración púrpura tenue	+
Zumo	Ensayo de espuma	Saponinas	Formación de espuma	+++

Leyenda:

- +++ : Abundante
- ++ : Regular
- + : Escaso

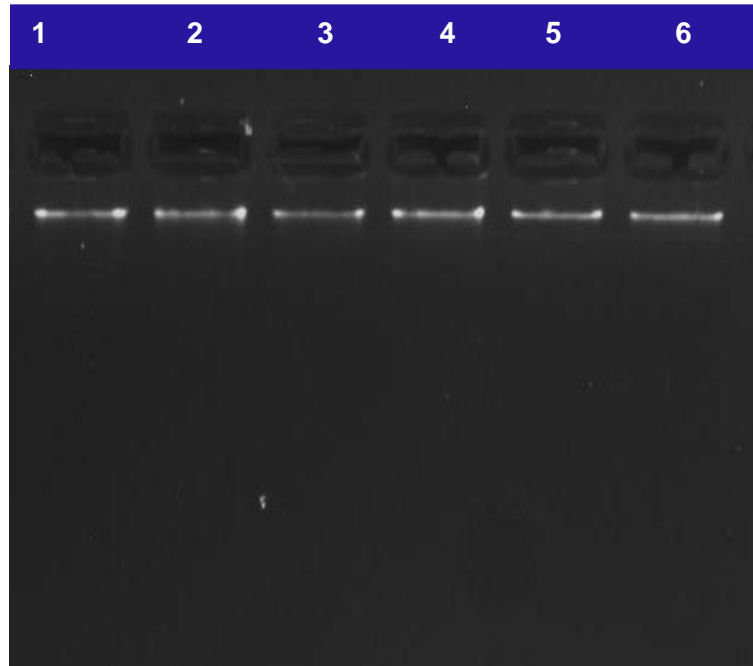


Figura N° 3. Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico de *Staphylococcus sp.* obtenido de seis muestras y coloreado con bromuro de etidio. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.

Leyenda:

Volumen de carga: Muestra 4 μ L + loading 6X 1 μ L + 7 μ L agua PCR.

Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante una hora.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante diez minutos.

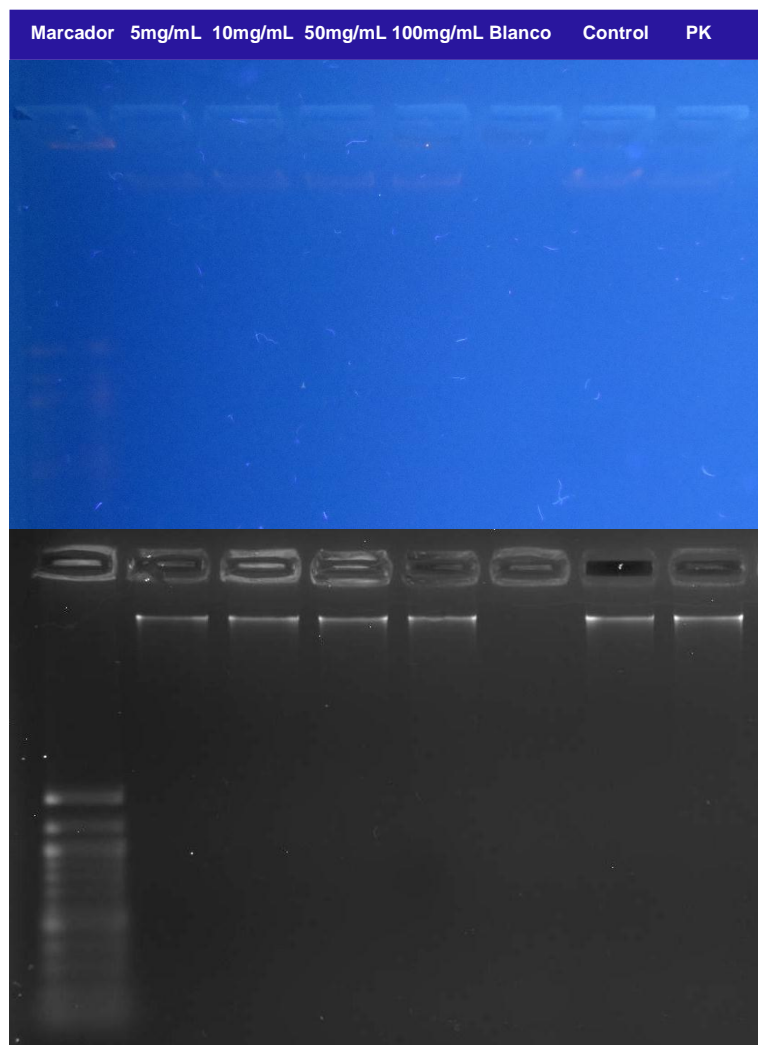


Figura 4: Ensayo genotóxico *in vitro* del extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo” a concentraciones de 5, 10, 50 y 100 mg/mL, frente a ADN genómico de *Staphylococcus sp.* incubado a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.

Leyenda:

Carril N° 1: Marcador de Peso molecular

Carril N° 2: Con 5mg/mL

Carril N° 3: Con 10mg/mL

Carril N° 4: Con 50mg/mL

Carril N° 5: Con 100mg/mL

Carril N°6: Con 100mg/mL extracto etanólico (blanco)

Carril N° 7: Con 100% de ADN puro (control).

Carril N°8: Con 100mg/mL extracto etanólico + proteinasa K

Volumen de carga: Muestra (7 µL) + loading (1 µL) + agua PCR (2 µL) = 10 µL.

Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 3 horas.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos



Figura 5: Ensayo genotóxico *in vitro* del extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo” a concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente a ADN genómico de *Staphylococcus sp.* incubado a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.- UNSCH. Ayacucho 2017.

Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de peso molecular

Carril Nº 2: Con 200 mg/mL

Carril Nº 3: Con 300 mg/mL

Carril Nº 4: Con 400 mg/mL

Carril Nº 5: Con 500 mg/mL

Carril Nº 6: Con 500 mg/mL de extracto etanólico (blanco).

Carril Nº 7: Con 100% de ADN puro (control).

Carril Nº 8: Con 500 mg/mL extracto etanólico + proteinasa K

Volumen de carga: Muestra (7 μ L) + loading (1 μ L) + agua PCR (2 μ L) = 10 μ L.

Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 3 horas.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos.

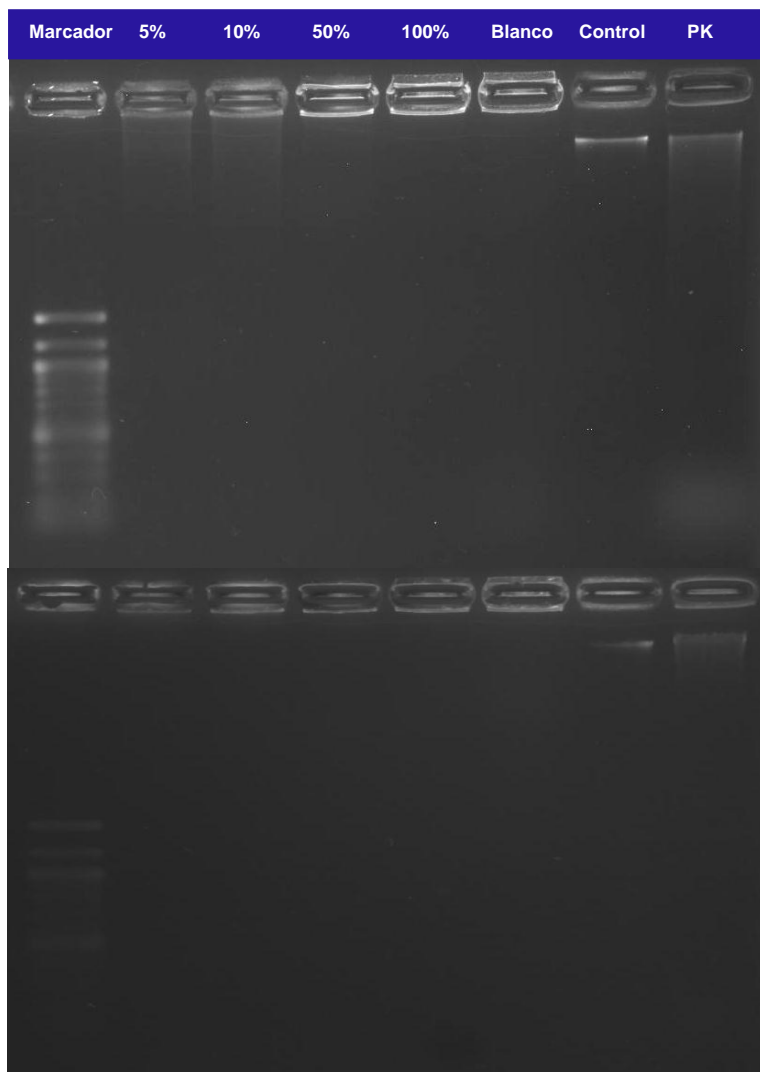


Figura 6: Ensayo genotóxico *in vitro* del zumo del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo” a concentraciones de 5, 10, 50 y 100%, frente a ADN genómico de *Staphylococcus sp.* incubado a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.

Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de peso molecular

Carril Nº 2: Con 5%

Carril Nº 3: Con 10%

Carril Nº 4: Con 50%

Carril Nº 5: Con 100%

Carril Nº 6: Con 100% de zumo (blanco).

Carril Nº 7: Con 100% de ADN puro (control).

Carril Nº 8: Con 100% de zumo + proteinasa K

Volumen de carga: Muestra (7 µL) + loading (1 µL) + agua PCR (2 µL) = 10 µL.

Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 3 horas.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos.

Tabla 11. Valores numéricos del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo" a concentraciones de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente a ADN genómico de *Staphylococcus sp.* incubado a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.

Condiciones de la incubación		<i>Allium sativum</i> L. "ajo" Extracto etanólico del bulbo.							
Temperatura	Tiempo	Concentración en mg/mL.							
°C	Hora	5	10	50	100	200	300	400	500
37	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 12. Valores numéricos del ensayo genotóxico *in vitro* del zumo del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo” a concentraciones de 5, 10, 50 y 100%, frente a ADN genómico de *Staphylococcus sp.* incubado a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.

Condiciones de la incubación		<i>Allium sativum</i> L. “ajo” Zumo del bulbo.			
Temperatura	Tiempo	Concentración en %			
°C	Hora	5	10	50	100
37	1	4	4	4	4
		4	4	4	4
		3	4	4	4
		4	4	4	4

Prueba de Kruskal-Wallis ($H = 0,53$; $GL = 3$; $p = 0,912$): para determinar el grado de genotoxicidad *in vitro* del zumo de *Allium sativum* L. “ajo” según la concentración de 5, 10, 50 y 100%, frente al ADN genómico de *Staphylococcus sp.* en una hora de incubación en baño maría a 37 °C. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación permite interpretar los resultados, teniendo como propósito determinar el efecto genotóxico “*in vitro*” del extracto etanólico y el zumo de bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”. La tabla 9, es el resultado de la identificación fitoquímica de los metabolitos secundarios en el extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”, reportando solo la presencia de fenoles y/o taninos en cantidad abundante; mientras que en la tabla 10 están los resultados del zumo, reportando la presencia de fenoles y/o taninos y saponinas en cantidad abundante, y cardenólidos en escasa cantidad.

Estos resultados son diferentes a los reportados por Pava⁴⁵, que en extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo”, detectó la presencia de cardiotónicos en regular cantidad, taninos y esteroides en escasa cantidad, y ausencia de alcaloides, flavonoides y cumarinas; mientras que en el extracto etanólico, detectó cumarina en regular cantidad, taninos y esteroides en escasa cantidad y ausencia de alcaloides y flavonoides. Esta diferencia de presencia/ausencia de los metabolitos secundarios, seguramente obedece al hecho de que estas muestras corresponden a plantas que se desarrollaron en diferentes nichos ecológicos, los mismos que determinan la presencia o ausencia de los distintos metabolitos secundarios, aun siendo la misma especie.

La figura 3, es el registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1%, mostrando los ADN genómicos obtenidos de seis cultivos de *Staphylococcus sp.*, la fluorescencia del bromuro de etidio nos revela la concentración y la nitidez de las bandas, que muestran la integridad del ADN genómico, es decir no está fragmentado; quedando aptas para la realización de los ensayos de genotoxicidad “*in vitro*”.

La fotografía de la figura 4, corresponde al ensayo genotóxico *in vitro* del extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”, frente a ADN genómico de

Staphylococcus sp., incubado a 37°C durante una hora, observándose que a concentraciones de 5, 10, 50 y 100 mg/mL (carriles 2, 3, 4, y 5, respectivamente), el ADN no ha sido fragmentado, manteniendo igual aspecto que el ADN del carril 7 que funciona como “control” y también comparado con el carril 1, que corresponde al marcador de tamaño molecular. El carril 6 corresponde al “blanco” no se observa ninguna banda, para revelarnos que, en el extracto puro, no hay presencia de ADN; el carril 8 corresponde al tratamiento del extracto con proteinasa K, la presencia de la banda de ADN, indica que en el extracto no hay presencia de nucleasas que la fragmenten, motivo por el que el ADN se encuentra íntegro, y corroborando que no hay metabolitos secundarios que pueda ejercer la función de la fragmentación.

Así mismo, la fotografía de la figura 5, del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”, a concentraciones de 200, 300, 400 y 500mg/mL en los carriles 2, 3, 4, y 5 respectivamente, frente al ADN genómico de *Staphylococcus sp.*, reflejan bandas de aspecto íntegro, similar al observado en el ADN “control” del carril 7, y el ADN del carril 8 que corresponde al tratamiento del extracto con proteinasa K, demostrando que en el citado extracto no hay enzimas nucleasas, tampoco hay metabolitos secundarios que puedan ejercer fragmentación en el ADN de la bacteria en estudio, comparándose igualmente con las bandas del marcador de tamaño molecular que ha corrido en el carril 1. En el carril 6 no hay banda, indicando que, en el extracto puro, no hay presencia de ADN.

Por otro lado, Ayala⁸ realizó un estudio planteándose como objetivo determinar el efecto genotóxico *in vitro* de las plantas medicinales antibacterianas de flores de *Spartium junceum* L. "retama", vainas de *Caesalpinia spinosa* (Melina) *Kuntze* "tara" y hojas de *Eucalyptus globulus Labill* "eucalipto". La determinación genotóxica a diferentes concentraciones, exponiéndose éstos sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*; la estimación del daño genotóxico *in vitro* fue determinado con el "método Tomasevich", 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 extractos hidroalcohólico presentaron una importante actividad genotóxica sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, siendo los extractos de "tara" y "eucalipto" con mayor efecto genotóxico a concentraciones de 50 mg/mL y 100 mg/mL con respecto a la "retama". Concluyó que el daño genotóxico depende

directamente de la concentración de los extractos hidroalcohólico; mas no así del tiempo de incubación, a excepción del extracto de "retama" que depende de este tiempo.

Sin embargo, estos efectos genotóxicos pueden obedecer a la presencia de una mixtura de metabolitos secundarios que reporta Ayala⁸, en retama se encuentran alcaloides, fenoles y/o taninos, flavonoides, quinonas en cantidad abundante y lactonas y/o cumarinas en regular cantidad; en la tara se encontró alcaloides, fenoles y/o taninos, flavonoides, quinonas y lactonas y/o cumarinas en cantidad abundante y en el eucalipto alcaloides, fenoles y/o taninos, flavonoides en cantidad abundante, mientras quinonas y lactonas y/o cumarinas en regular cantidad.

Esto explicaría que en el extracto etanólico del ajo solo se identificó fenoles y/o taninos, que no ejerce la función genotóxica, mientras que la presencia de diferente metabolitos secundarios de la retama, tara y eucalipto podría estar ejerciendo el efecto genotóxico por sinergismo. Este caso podría ser dilucidado al realizar posteriores estudios con fraccionamiento de los extractos.

El registro fotográfico de la figura 6, corresponde al ensayo genotóxico *in vitro* del zumo del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo", frente a ADN genómico de *Staphylococcus sp.* incubado a 37°C durante una hora; se observa que a concentraciones de 5, 10, 50 y 100% del zumo de "ajo", en los carriles 2, 3, 4 y 5, respectivamente, ha generado la fragmentación total del ADN bacteriano en estudio, comparándose éstos con el ADN "control" presente en el carril 7; en el carril 6 no hay presencia de ADN, en ella se sembró el zumo puro (100%) que funciona como "blanco", también comparamos con el marcador de tamaño molecular mostrado en el carril 1; el carril 8, que corresponde al tratamiento del zumo de ajo con proteinasa K, se observa un "barrido" que corresponde al ADN genómico en estudio, que ha sido fragmentado, no tiene igual aspecto que el ADN "control".

La presencia del "barrido" de ADN en el carril 8, nos induce a pensar que en el zumo del "ajo", además de la presencia de los metabolitos secundarios se encuentran las enzimas nucleasas, las mismas que fueron liberadas junto con el contenido celular del tejido del bulbo, por la acción mecánica de ruptura debido a la presión ejercida en el mortero durante la molienda. En este sentido, la fragmentación del ADN con 100% de zumo tratado con proteinasa K, se debe solo a la acción de los metabolitos secundarios presentes, puesto que las

enzimas nucleasas, habrían sido degradadas por acción de la proteinasa K, resultando esta fragmentación parcial del ADN. Por otro lado, la fragmentación total del ADN con el zumo de “ajo” a concentraciones de 5, 10, 50 y 100%, estaría dada por la acción simultánea de los metabolitos secundarios y de las enzimas nucleasas, ambas provenientes de las células del “ajo”;

Los resultados de los ensayos de genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”, frente a ADN genómico de *Staphylococcus sp.* revelados en las figuras 4 y 5, son llevadas a valores numéricos, tomando en cuenta la escala citada en la tabla 7 de clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual, a concentraciones de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL del extracto, que en la tabla 11, se designa el valor de cero, en todas las repeticiones, porque no hubo fragmentación de ADN en ninguno de los casos.

Así mismo, los resultados de los ensayos de genotoxicidad *in vitro* del zumo del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”, frente a ADN genómico de *Staphylococcus sp.* revelado en la figura 6, son llevadas a valores numéricos, tomando en cuenta la escala citada en la tabla 7 de clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual, a concentraciones de 5, 10, 50, 100% del zumo, que en la tabla 12, se designa el valor de cuatro, en todas las repeticiones, porque hubo fragmentación total de ADN, con una excepción de degradación entre el 40 al 95% que se le designa el valor de tres, en una de las cuatro repeticiones realizadas con 5% del zumo de “ajo”.

Estos resultados, estarían corroborando en demostrar que el extracto de *Allium sativum* L. “ajo”, presenta actividad antibacteriana, a los reportes de estudios realizados por Mercado P. y Arévalo L.⁷ que evaluaron la sensibilidad de los cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomona aeruginosa* frente a la acción antibacteriana del extracto de *Allium sativum* L. “ajo” por el método de Kirby Bauer haciendo hoyos de 5mm de diámetro y 5mm de profundidad en agar Mueller Hinton; independientemente se realizó un control de susceptibilidad utilizando discos de cefalexina para *Staphylococcus aureus*, vancomicina para *Staphylococcus epidermidis* y Ciprofloxacino para *Pseudomonas aeruginosa*. En los resultados obtenidos se observa una mayor acción antibacteriana con los cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomona aeruginosa* a la concentración del 100% extracto de *Allium sativum* L.

Así mismo, Chalar y col⁶, evaluaron la capacidad antimicrobiana del ajo en cepas bacterianas como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Obtuvieron la alicina del ajo mediante un proceso de trituración para luego exponer a las tres cepas en tres diferentes concentraciones (0,5; 1,5 y 3 mL) y a partir de ello determinar su capacidad antimicrobiana. Los resultados evidenciaron que: *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* se inhibían totalmente a una concentración de 3 mililitros, mientras que *Escherichia coli* no se inhibió ante ninguna concentración.

La figura 7, muestra los resultados estadísticos de la Prueba de Kruskal-Wallis ($H = 0,53$; $GL = 3$; $P = 0,912$): para determinar el grado de genotoxicidad *in vitro* del zumo de *Allium sativum* L. "ajo" según la concentración de 5, 10, 50 y 100%, frente al ADN genómico de *Staphylococcus sp*, en una hora de incubación en baño maría a 37 °C; donde $P = 0,912$, siendo éste mayor que 0,05; por tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna enunciando que las concentraciones del zumo ensayadas (5, 10, 50 y 100%), no influyen en el efecto genotóxico frente a ADN genómico de *Staphylococcus sp*.

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo" no presenta efecto genotóxico *in vitro* sobre el ADN genómico de *Staphylococcus sp*, a diferencia del zumo, que sí presenta el efecto genotóxico.
2. Los metabolitos secundarios identificados en el extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo", fueron fenoles y/o taninos en cantidad abundante; mientras que, en el zumo, se detectó la presencia de fenoles y/o taninos y saponinas en cantidad abundante, y cardenólidos en escasa cantidad.
3. El extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo" a concentraciones de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500mg/mL, no presentó efecto genotóxico frente al ADN genómico de *Staphylococcus sp.*; mientras que el zumo del bulbo del "ajo", a concentraciones de 5, 10, 50 y 100%, si presentó un potente efecto genotóxico.

VII. RECOMENDACIONES

1. Impulsar trabajos de investigación sobre genotoxicidad en la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, ya que en los últimos años ha retornado el interés por las plantas medicinales en búsqueda de nuevas estructuras bioactivas para el tratamiento de las enfermedades.
2. Ampliar estudios de genotoxicidad *in vitro* de *Allium sativum* L. “ajo” con extractos de otros solventes, así como con extractos fraccionados y otras técnicas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Munayco E, Moromi H. Efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* sobre cepas estándares de la cavidad bucal. *Odontología Sanmarquina*. 2013, 16(2):21-24.
2. Carballo A, Cortada C, Gadano A. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. *Citogenética humana y genética toxicológica*. Departamento de Bioquímica clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Argentina. 2005, 14 (2): 95-108
3. Vanaclocha B, Cañiguera, S. *Fitoterapia: vademécum de prescripción*. 4^{ta} ed. Barcelona: Elsevier.2003.
4. Rojas P, Villca R. Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del ajo (*Allium sativum* L.) contra *Streptococcus pyogenes* mediante el método por dilución. *Univ. Cienc. Soc: Santa Cruz de la Sierra:Bolivia [Revista en internet]* 2011. [Acceso setiembre 2016]. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S88888888201100020003&script=sci_arttext&lng=es
5. Sánchez A. Efecto inhibitorio de *Allium cepa* y *Allium sativum* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*. [Tesis para obtener el título de médico veterinario zootecnista]. Universidad de Veracruz, 2013.
6. Chalar R, Moya J, Vargas E. Función Antimicrobiana de la Alicina de Ajo en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Universidad Mayor de San Simón. Facultad de Medicina Aurélio Melean Cochabamba. Bolivia. [Revista en internet]. 2014. [Acceso mayo 2017]. Disponible en: Http://www.scielo.org.bo/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S1817-74332014000100008
7. Mercado P, Arévalo L. Sensibilidad de cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomona aeruginosa* frente a la acción antibacteriana del extracto de *Allium sativum* L. "Ajo". Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Ciencias Biológicas. REBIOL 2013, 33 (1): 1-13
8. Ayala E. efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antibacterianas *Spartium junceum* L. "retama", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto" [Tesis para obtener el título de Químico farmacéutico]. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.2013.
9. Moreno M, Miranda T, Quispe C, Rivera J y Ango H. Evaluación de la genotoxicidad *in vitro* de látex fresco y cristalizado de *Carica papaya* L. "papaya" frente a ADN genómico humano. 2^{do} Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. Durango: México.2017.
10. Jiménez S, Fonnegra R. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2^{da} edición. Colombia: Universidad de Antioquia. 2007.
11. Bravo L. *Farmacognosia*. España: Editorial Elsevier: 2006.
12. Kuklinski C. *Farmacognosia: aceites esenciales*. 1^{ra} reimpresión. Barcelona: ediciones Omega, S.A. 2003.
13. Cáceres A, Giron L, Alvarado S, Torres M. Screening de antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermtomucosal diseases. *Ethnopharmacol*. 1987.
14. Ruiz E. Epidemiología molecular y resistencia a los antimicrobianos en *staphylococcus* sp. en centros sanitarios de mallorca durante los últimos 15 años 1999-2013. [TESIS DOCTORAL]. Universitat de les Illes Balears.2015
15. Prieto J, Gomez L. Género *Staphylococcus*. *Microbiología Médica*. Editorial Doyma.1996. Pág. 179-191.

16. Repetto M, Repetto G. Toxicología fundamental. 4^{ta} Edición. Madrid: Díaz de Santos; 2009.
17. Glosario de términos Toxicológicos. _Asociación Española de Toxicología (AETOX).
18. Klaassen C, Watkins J, Casarett, Doull. Fundamentos de toxicología. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España; 2005.
19. Hernández, Moreno, Zaragoza, Porres. Tratado de medicina Farmacéutica. España: Médica panamericana, S.A. 2011.
20. Bello J, López A. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Madrid: Díaz de Santos; 2001.
21. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD).Curso de Toxicología Ambiental. Bogotá (Colombia); 2011.
22. Carballo M. Centro de Análisis Programares Sanitaris (CAPS). Biomarcadores de genotoxicidad. Barcelona Universidad de Buenos Aires, 2011.
23. Klaassen C, Watkins J, Casarett, Doull. Fundamentos de toxicología. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, 2005.
24. Bello J, López A. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Madrid: Díaz de Santos; 2001.
25. Herrera F, De La Peña E. Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Evolución de mutagenicidad y genotoxicidad. Madrid, 2004.
26. Lodish, Berk, Matsudaria, Káiser. Biología celular y molecular. 5^{ta} edición. Argentina: Médica panamericana. 2005
27. Sanchez A, Fonseca G, capiro N, fernandez D. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en cuba. Revista cubana en farmacia. 34, 34-43.2000.
28. Benjamín L. Genes. 2^{da} edición. España: Reverte, S.A.1996.
29. Carranza Z. Selección e identificación de especies de hongos ectomico rrizógenos del estado de Hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido [tesis pregrado]. Tulancingo de Bravo: Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2006.
30. Primo E. Química orgánica básica y aplicada de la molécula a la industria. Tomo II. España: Reverte, 2007.
31. Voet, D. Bioquímica.3^{ra} Edición. Argentina: Medica panamericana, 2006.
32. Romero, E. Determinación de genotoxicidad en neonatos mediante métodos de diagnóstico no invasivo. [Tesis doctoral]. universidad de granada, 2012.
33. Miranda T. "Método Tomasevich": para determinar el Efecto Genotóxico *in vitro* de plantas medicinales y/o productos fitoterapéuticos. 2^{do} Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. Clave: TXG808. Durango: México. 2017.
34. Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A. Endogenous RNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes, 2008.
35. Arrebola D.; Fernández L. Actualización Sobre el Ensayo Cometa y de Micronúcleos *In vitro*, 2003.
36. Fairbairn D, Olive P, O'Neill K. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*; 1995
37. Hwang E, Bowen P. DNA Damage, a Biomarker of Carcinogenesis: Its Measurement and Modulation by Diet and Environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 2007.
38. Zúñiga L. Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Departamento de genética y microbiología. Grupo de Mutagénesis; 2009.

39. Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research*; 2009.
40. Vivanco M. Muestreo estadístico, diseño y aplicación. 1^{ra} edición. Santiago de Chile: Editorial universitaria.2005.
41. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. 5^a edición. Perú: Editorial Mc Graw Hill. 2010.
42. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Perú: Edit. Pontificia Universidad Católica del Perú. 1994.
43. Sharapin N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Edit. Ciencia y tecnología para el desarrollo. Colombia, 2000.
44. Larrea M, Tirado N, Ascarrunz E. Daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del Municipio de Luribay. *BIOFARBO* [Revista en la Internet]. 2010 [Acceso septiembre2016]; 18(2): 31-43. Disponible en:http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1813-53632010000200004&lng=es.
45. Pava T. Actividad antimicrobiana de extractos de *Allium sativum* y *Zingiber officinale* sobre microorganismos de impotancia en patologías infecciosas de cavidad oral. [Tesis para optar título en Bacteriología]. Facultad de Ciencias Bacteriología. Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá 2016.
46. Gil O, Carmona A, Rodríguez A. Estudio Etnobotánico de especies tóxicas, ornamentales y medicinales de uso popular, presentes en el Jardín de Plantas Medicinales “Dr. Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Los Andes. 2006
47. Aucasime L. Herbario Huamangensis. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.2013.

ANEXOS

Anexo 1. Clasificación taxonómica de *Allium sativum* L. "ajo" Ayacucho 2017.



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, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, **Srta. Pamela, MARCA YUPANQUI**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	LILIOPSIDA
SUB CLASE	:	LILIIDAE
ORDEN	:	LILIALES
FAMILIA	:	LILIACEAE
GENERO	:	<i>Allium</i>
ESPECIE	:	<i>Allium sativum</i> L..
N.V.	:	"ajo "

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 20 de Setiembre del 2016

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

D^{ña}. Laura Agustina Medina
JEFE

Anexo 2. Clasificación taxonómica de *Staphylococcus sp.*



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTOBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOINFORMÁTICA

EL QUE SUCRIBE:

RESPONSABLE DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOINFORMÁTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA,

DA CONSTANCIA:

Que, la señorita **Pamela MARCA YUPANQUI**, egresada de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de ésta Casa Superior de Estudios, ha solicitado la dación de una cepa bacteriana, para efectos de realizar su trabajo de tesis.

Tomada la muestra del cepario de éste Centro de Investigación y realizado las pruebas bioquímicas, se ratifica en la identificación, que corresponde a la siguiente determinación taxonómica según Rosenbach (1984):

TAXONOMIA DE *Staphylococcus sp*

Dominio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Staphylococcaceae
Género	Staphylococcus
Especie	<i>Staphylococcus sp.</i>
Nombre común	"estaphylococos"

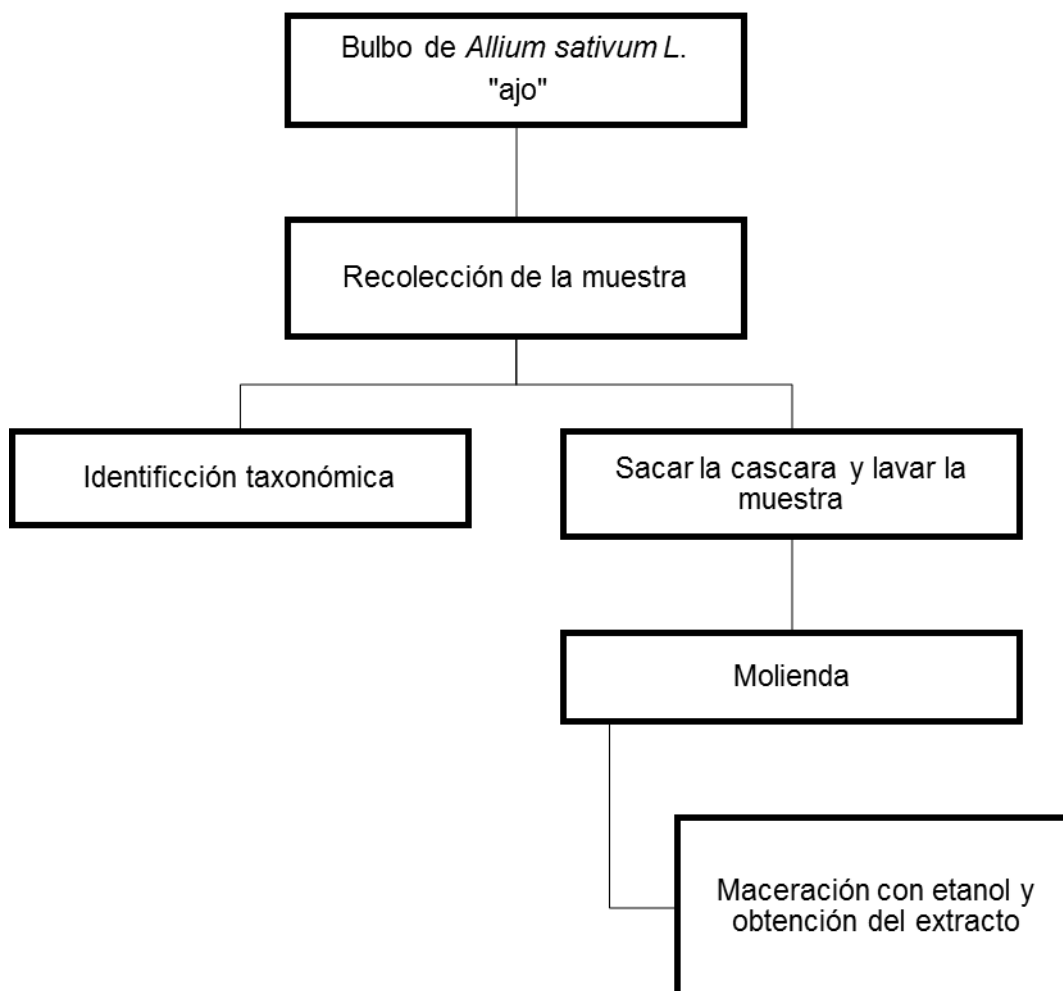
Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines pertinentes.

Ayacucho, 06 de febrero de 2017.

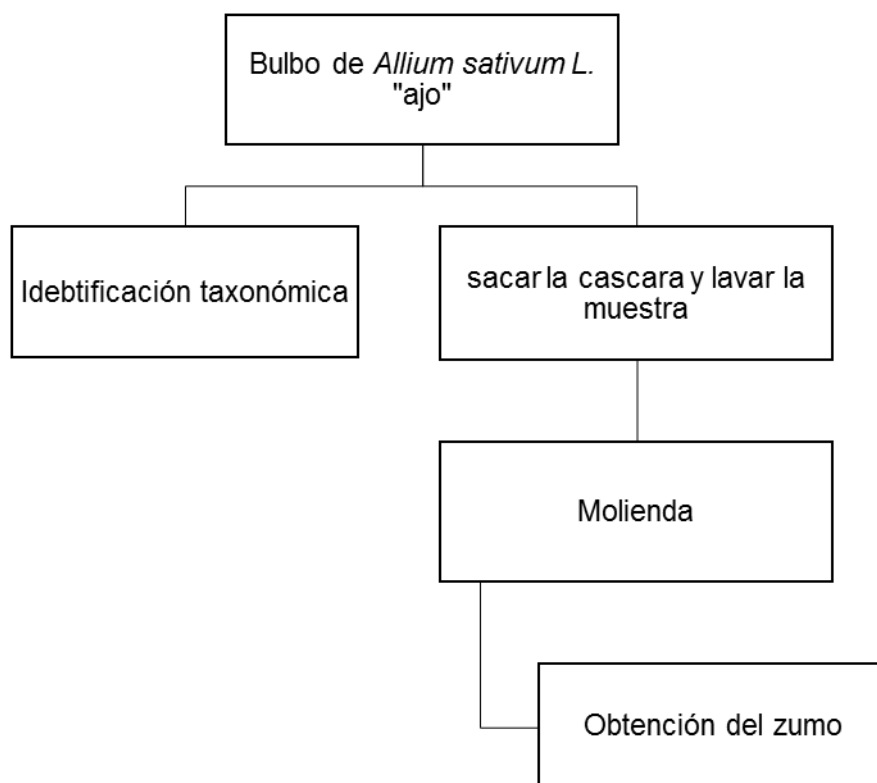


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTOBAL DE HUAMANGA
Facultad de Ciencias Biológicas
Tomás Turco Alvarado Tomasevich
Biólogo-Microbiólogo
C.B.P. 1969

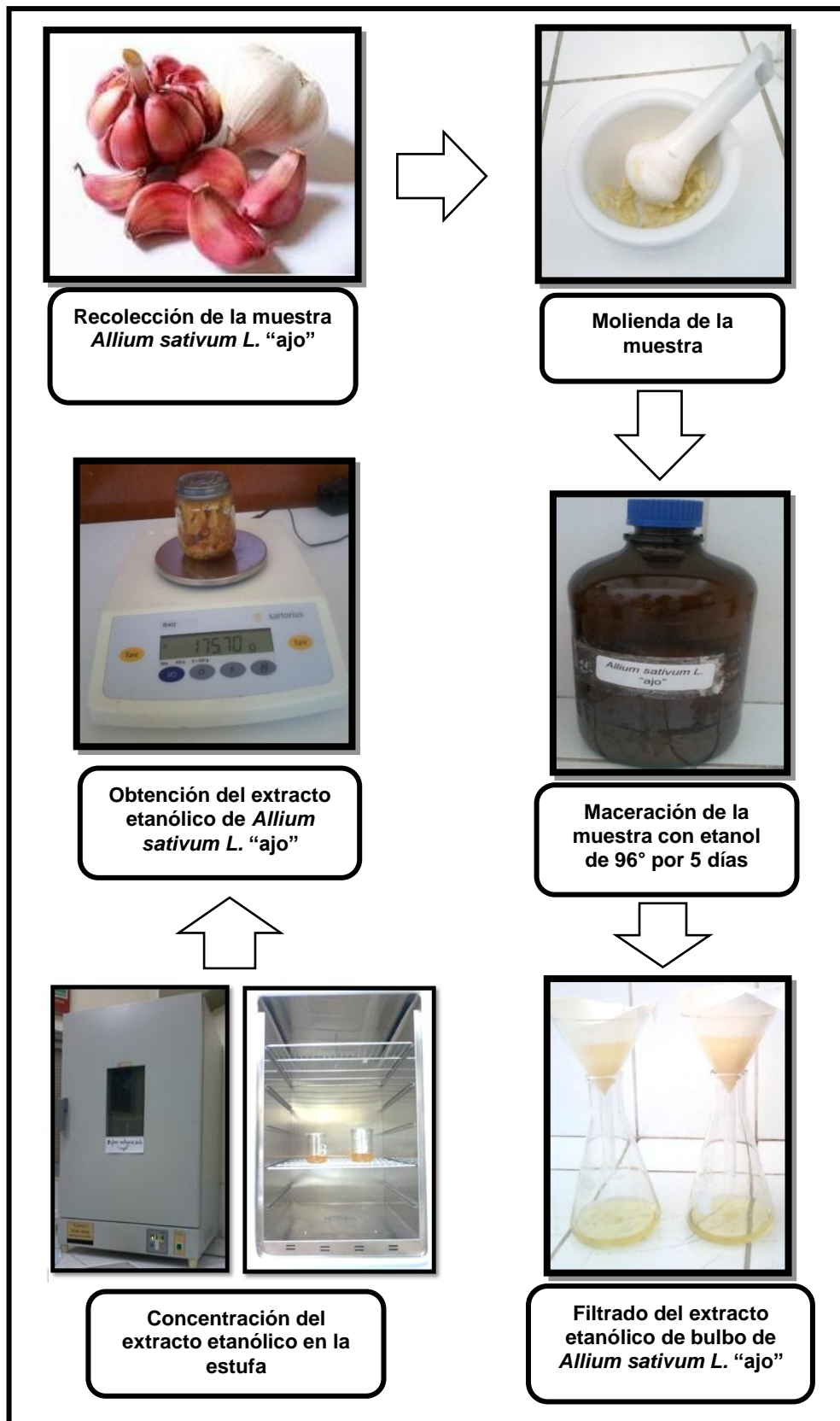
Anexo 3. Diagrama para la obtención del extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo". Ayacucho 2017.



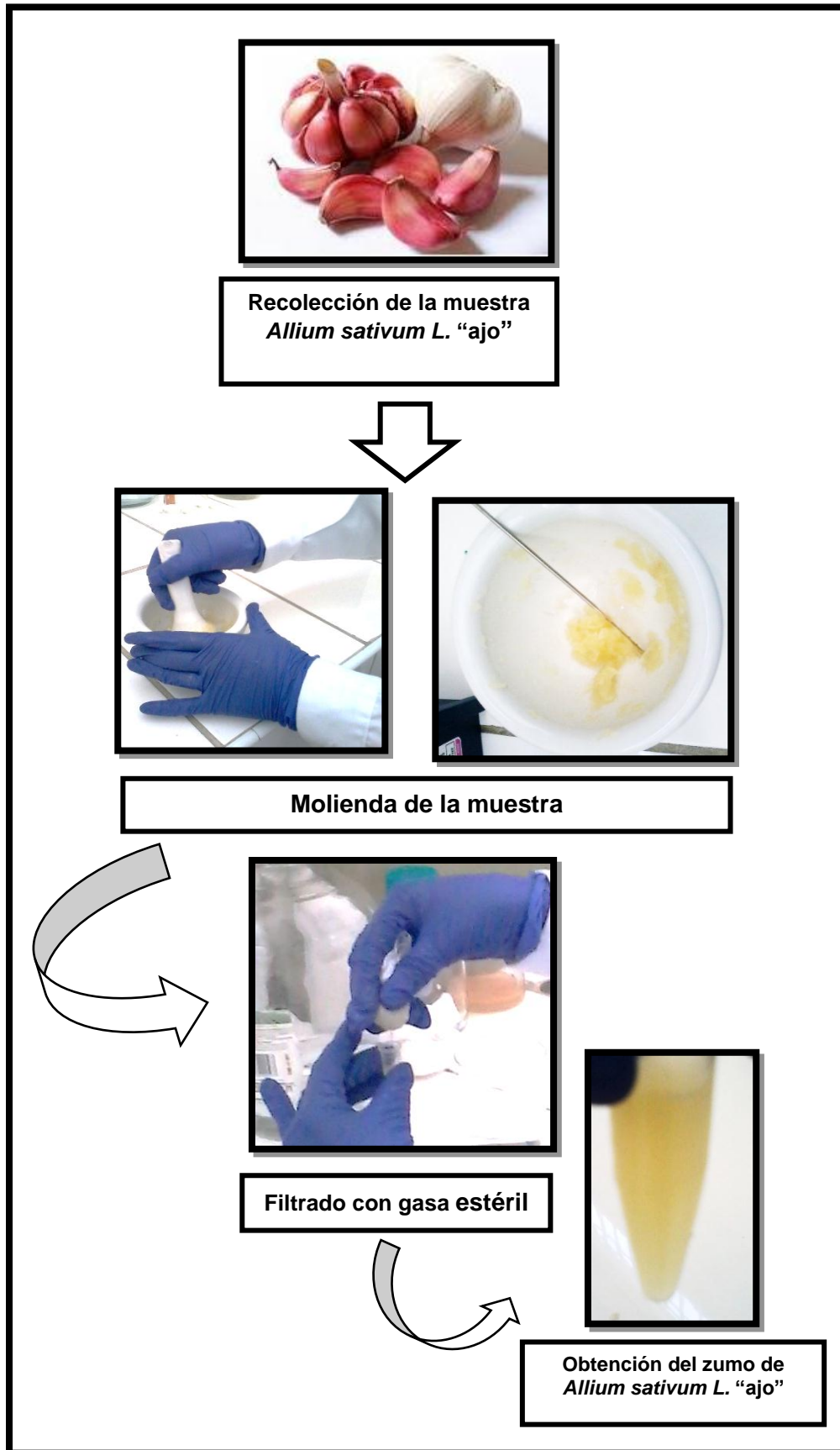
Anexo 4. Diagrama para la obtención del zumo del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo". Ayacucho 2017.



Anexo 5: Recolección, molienda y obtención del extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo". Ayacucho 2017.

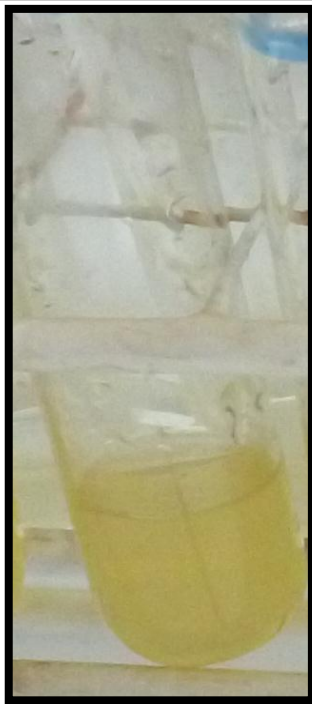


Anexo 6: Obtención del zumo de *Allium sativum* L. "ajo". Ayacucho 2017.



Anexo 7: Metabolito secundario encontrado en el extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo". Ayacucho 2017.

Ensayo de cloruro férrico para determinar la presencia de fenoles y/o taninos (Resultado positivo)

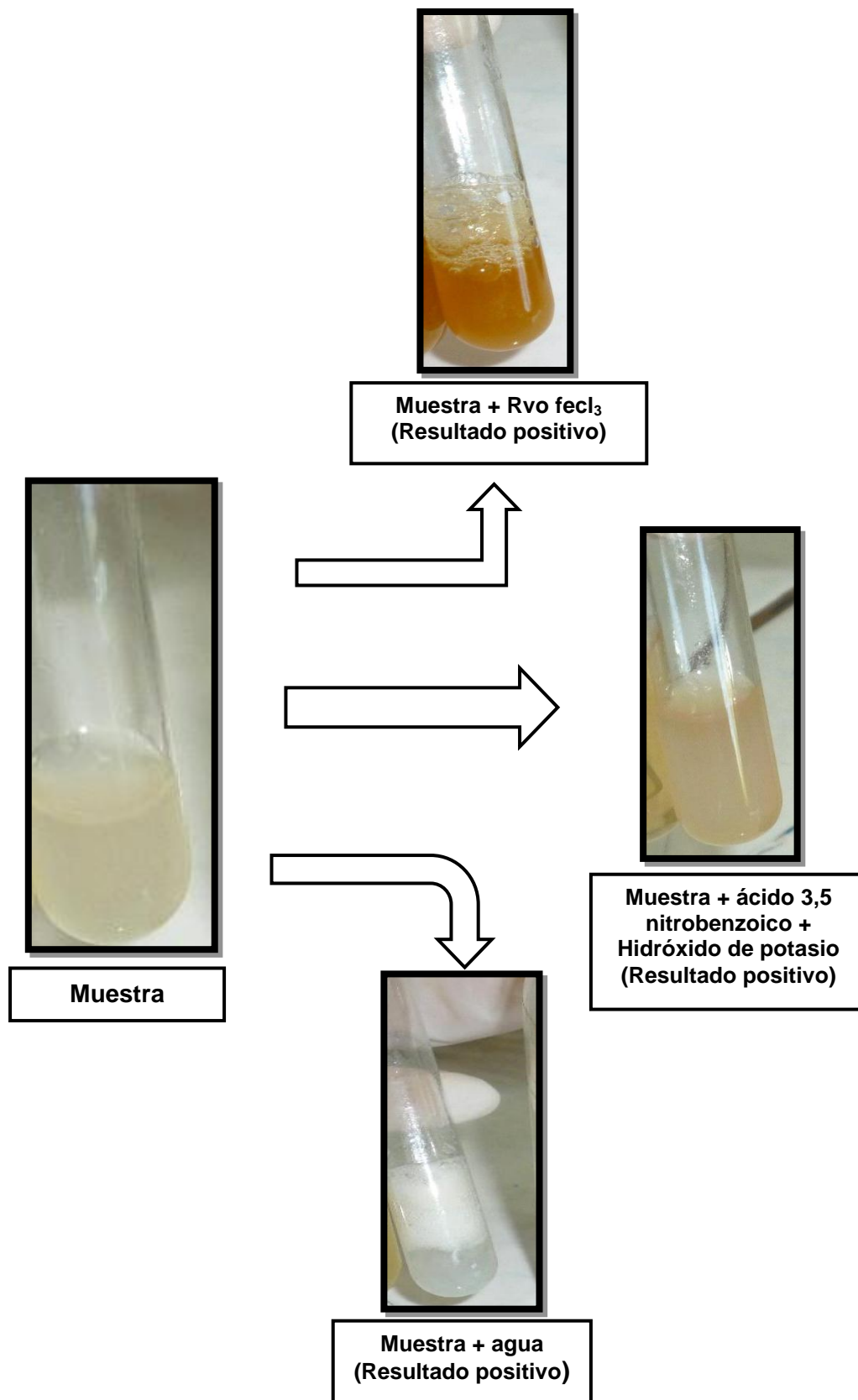


Muestra

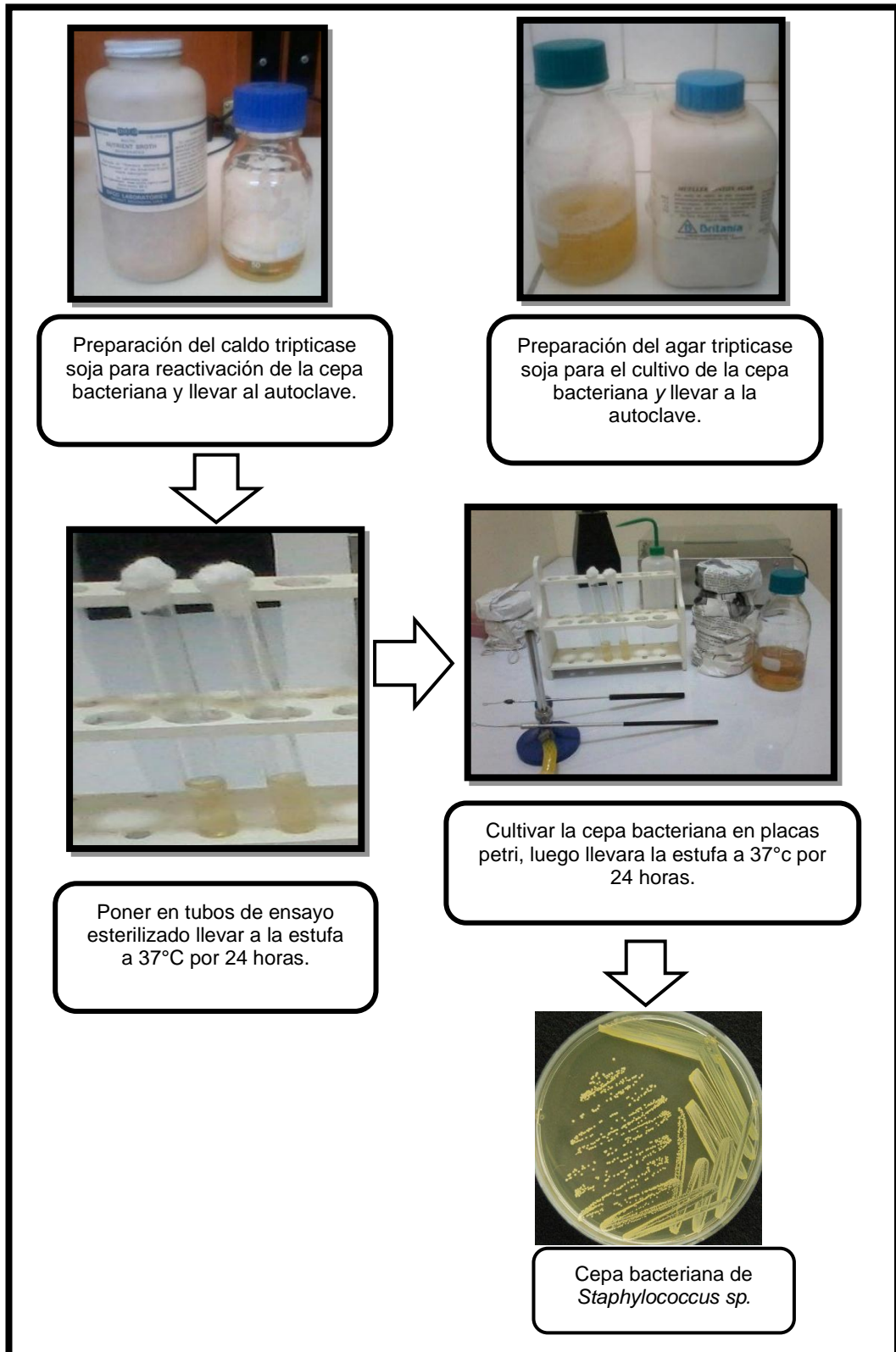


Muestra +Rvo FeCl₃

Anexo 8: Metabolitos secundarios encontrados en el zumo de *Allium sativum* L.
"ajo". Ayacucho 2017.



Anexo 9: Proceso de cultivo de *Staphylococcus sp.* Ayacucho 2017.



Anexo 10: Control de calidad microbiológica del extracto etanólico de *Allium sativum* L. "ajo". Ayacucho 2017.



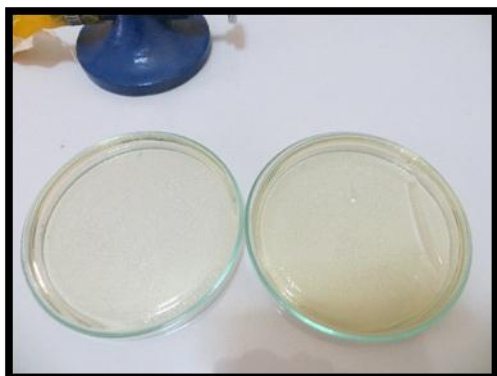
Placas de Petri con agar Mueller Hinton.



Siembra del extracto de "ajo"

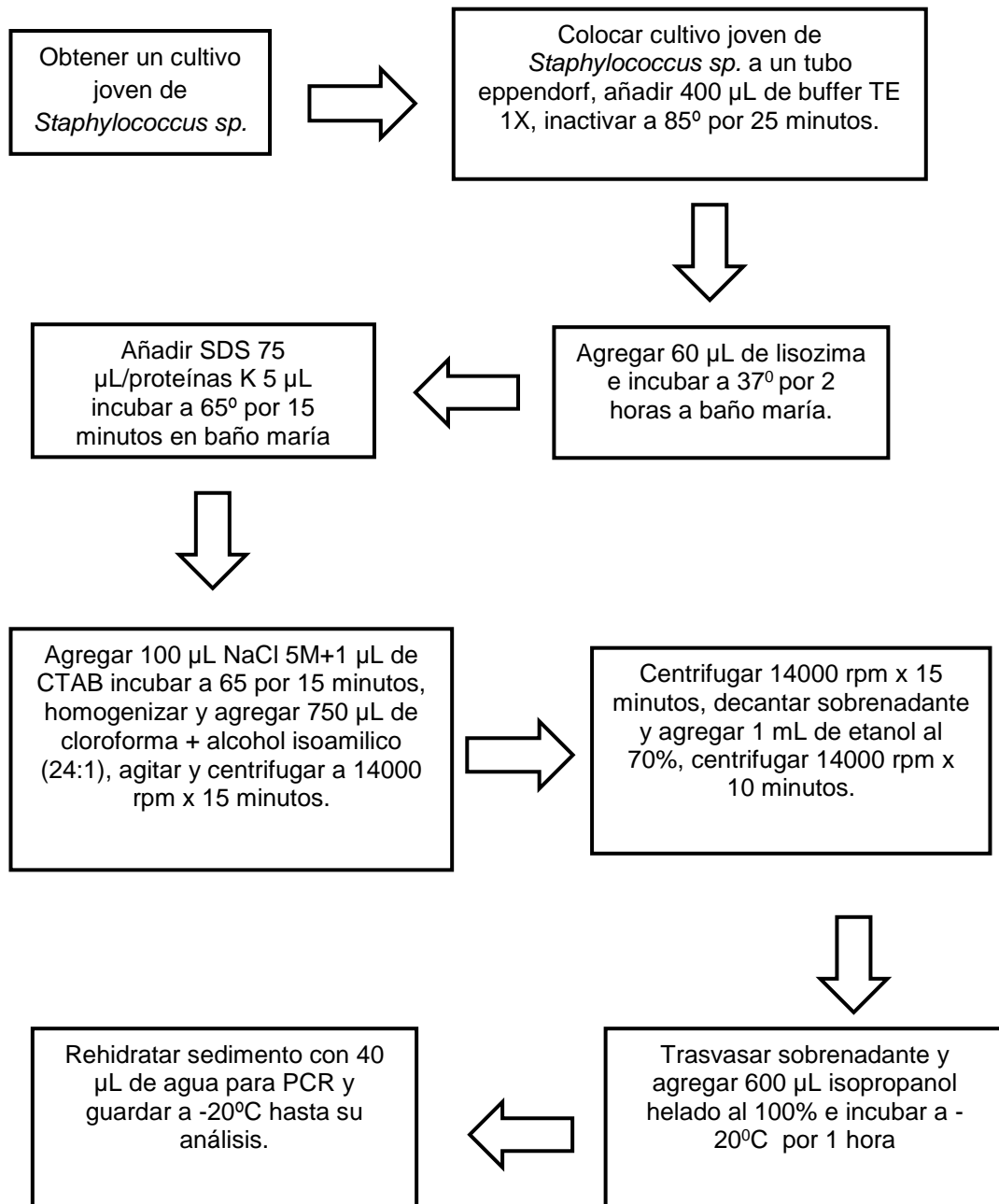


Incubación a 37°C durante 24 horas.



Lectura de resultados:
No hubo crecimiento microbiano

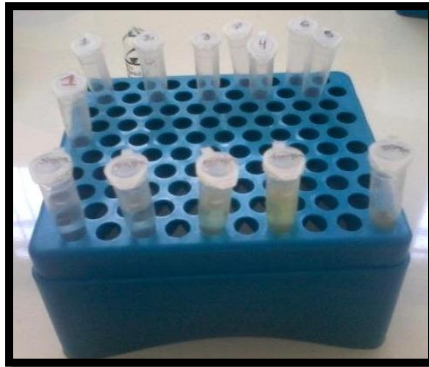
Anexo 11: Proceso de extracción de ADN genómico de *Staphylococcus sp.* Ayacucho 2017.



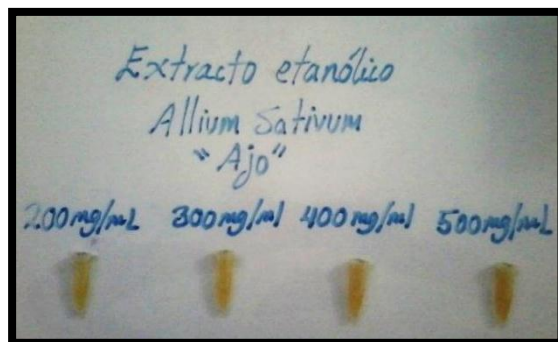
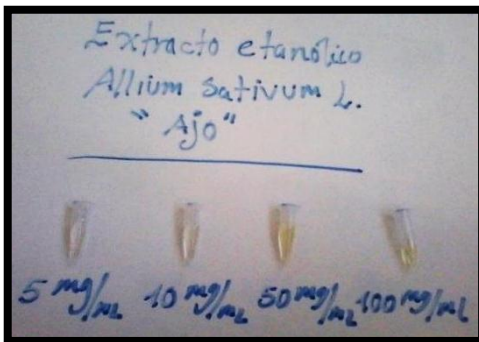
Anexo 12: Proceso de preparación a diferentes concentraciones del extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo". Ayacucho 2017.



Pesado del extracto etanólico seco en un tubo eppendorf



Proceso de dilución con $\text{H}_2\text{O(d)}$



Concentraciones del extracto etanólico *Allium sativum* L. "ajo"

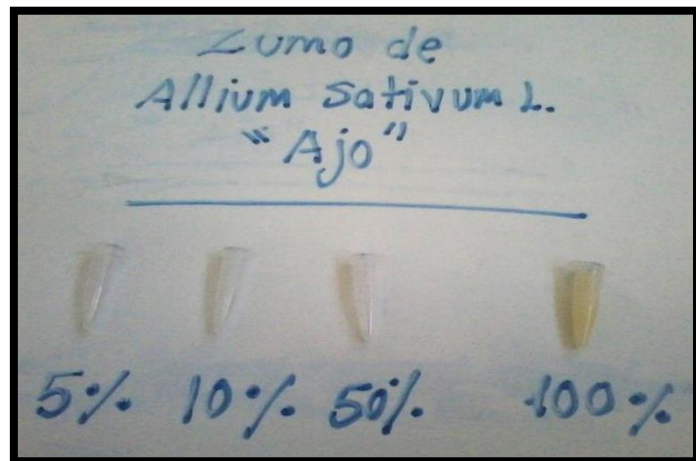
Anexo 13: Proceso de preparación a diferentes concentraciones del zumo del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo". Ayacucho 2017.



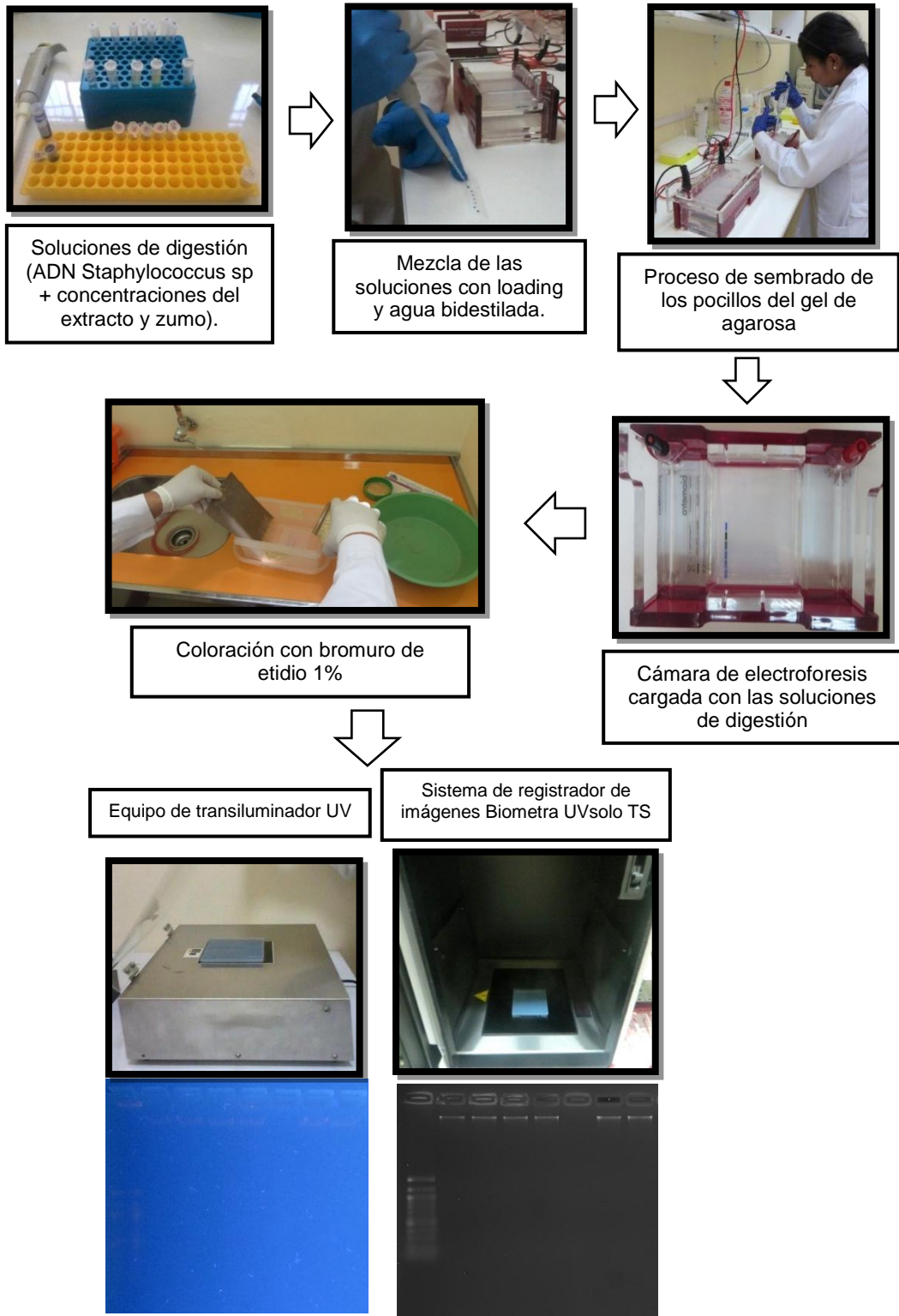
Triturar *Allium sativum* L.
"ajo" fresco



Filtrar en gasa estéril para obtener el zumo



Anexo 14: Proceso para la determinación del efecto genotóxico del extracto etanólico y zumo del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo" frente a ADN genómico de *Staphylococcus* sp. Ayacucho 2017.



Anexo 15: Matriz de consistencia

TÍTULO: Evaluación preliminar de la genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum* L. “ajo” frente a ADN de *Staphylococcus* sp. Ayacucho, 2017

PERSONAL INVESTIGADOR: Bach. Pamela MARCA YUPANQUI

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	MARCO TEÓRICO	VARIABLES	METODOLOGÍA
Evaluación preliminar de la genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto etanólico y zumo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” frente a ADN de <i>Staphylococcus</i> sp. Ayacucho, 2017.	¿Tendrá efecto genotóxico el extracto etanólico y zumo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” en un ensayo preliminar <i>in vitro</i> frente a ADN de <i>Staphylococcus</i> sp?	<p>GENERAL</p> <p>Determinar la genotoxicidad del extracto etanólico y zumo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” en un ensayo preliminar <i>in vitro</i> frente a ADN de <i>Staphylococcus</i> sp.</p> <p>ESPECÍFICOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico y zumo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”. Evaluar la genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto etanólico y zumo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” a través de la fragmentación de ADN de <i>Staphylococcus</i> sp. 	El extracto etanólico y zumo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” presenta efecto genotóxico en un ensayo preliminar <i>in vitro</i> frente a ADN de <i>Staphylococcus</i> sp.	<p>Aspectos Botánicos</p> <p><i>Allium sativum</i> L. “ajo”</p> <p>Genotoxicidad</p> <p>Las pruebas de genotoxicidad se pueden definir como pruebas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>, diseñadas para detectar compuestos que induzcan daño genético, directa o indirectamente, por diversos mecanismos.</p>	<p>Variable Independiente:</p> <p>Extracto etanólico y zumo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”.</p> <p>Indicador:</p> <p>Concentración miligramos por mililitro (mg/ ml) del extracto etanólico y zumo.</p> <p>Variables Dependientes:</p> <p>Efecto genotóxico frente a ADN de <i>Staphylococcus</i> sp.</p> <p>Indicador:</p> <p>Grado de fragmentación del Ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico de <i>Staphylococcus</i> sp.</p>	<p>Tipo de investigación:</p> <p>Experimental.</p> <p>Diseño Experimental:</p> <p>El experimento se realizará bajo la guía del modelo <i>in vitro</i> para estudiar la actividad genotóxica.</p> <p>Población: <i>Allium sativum</i> L. “ajo”, que crece en los diferentes pisos ecológicos de la provincia de Chuschi, provincia de Cangallo de la región de Ayacucho.</p> <p>Muestra: Bulbo de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”, en cantidad de dos Kg, obtenidos en el Distrito de Chuschi.</p> <p>Unidad experimental:</p> <p>ADN genómico de <i>Staphylococcus</i> sp. A concentración de 1500 ng/ µL por cada ensayo.</p> <p>Análisis estadístico:</p> <p>paquete estadístico SPSS, Pruebas de Kruskal-Wallis</p>