

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Efecto genotóxico *in vitro* del látex de plantas
medicinales de uso dérmico *Argemone mexicana* L.
“cardo santo” y *Taraxacum officinale* “diente de león”.
Ayacucho, 2017.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICA

Presentado por la:

Bach. MONTES ENCISO, Mary Elizabett

AYACUCHO - PERÚ

2017

En primer lugar, agradezco a **Dios** por permitirme realizar esta tesis, brindándome la fortaleza y perseverancia para poder concretar con uno de mis sueños anhelados, nunca me abandona y siempre está conmigo. A mi familia fuente de apoyo emocional constante durante toda mi vida, en especial a mi madre **Pelagia** y mi hermana **Sandra** por su apoyo incondicional en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

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

A la Facultad de Ciencias de la Salud, en especial a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, así mismo a todos los docentes catedráticos de nuestra gloriosa y prestigiosa casa superior por haber contribuido con 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, por dedicarme el tiempo y disponibilidad necesaria para la elaboración del proyecto durante la ejecución y culminación.

Así mismo un agradecimiento especial a mi familia, por su apoyo y confianza brindada hacia mi persona en todo momento y así poder concretar con la presente tesis.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Aspectos botánicos de <i>Argemone mexicana</i> L. “cardo santo”	8
2.3. Aspectos botánicos de <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león”	11
2.4. Afecciones dérmicas	13
2.4.1. Acné	14
2.4.2. Verruga de la piel	14
2.5. Toxicidad y genotoxicidad	15
2.5.1 Toxicidad	15
2.5.2 Genotoxicidad	15
2.6 Evaluación genotóxica	16
2.7. Ensayo cometa (EC)	17
2.8. Ácido desoxirribonucleico (ADN)	17
2.9. Electroforesis en gel	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Ubicación del trabajo de investigación	21
3.2. Definición de población y muestra	21
3.2.1 Población	21
3.2.2 Muestra	21
3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos	21
3.3.1 Tipo de Estudio	21
3.3.2. Recolección de la muestra	21
3.3.3. Obtención del látex	22
3.3.4. Tamizaje fitoquímico del látex de <i>Argemone mexicana</i> L. “cardo santo” y <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león”	22

3.4.Extracción de ADN de linfocito humano	22
3.5. Cuantificación de ADN genómico de linfocitos humano por espectrofotometría.	24
3.6. Ensayos de la genotoxicidad <i>in vitro</i> , “	24
3.6.1 Fase I: Cuantificación y preparación de stock de ADN genómico de linfocito humano.	24
3.6.2 Fase II: Prueba de genotoxicidad “ <i>in vitro</i> ” de ADN genómico de linfocito humano.	25
3.6.3 Fase III: Electroforesis para la detección de genotoxicidad	25
3.6.4 Fase IV: Radiación UV para la visualización de genotoxicidad	26
3.6.5. Fase V: Interpretación y clasificación del registro visual de genotoxicidad.	26
3.7 Análisis de datos	
IV. RESULTADOS	27
V. DISCUSIÓN	41
VI. CONCLUSIONES	47
VII. RECOMENDACIONES	49
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	55

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> de látex de plantas medicinales de uso dérmico <i>Argemone mexicana</i> L. “cardo santo” y <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león” sobre ADN genómico humano.	25
Tabla 2 Valoración numérica de la genotoxicidad según la fragmentación del ADN por registro visual.	26
Tabla 3 Tamizaje fitoquímico para la identificación de los metabolitos secundarios presentes en el látex de <i>Argemone mexicana</i> L. “cardo santo”. Ayacucho 2017.	27
Tabla 4 Tamizaje fitoquímico para la identificación de los metabolitos secundarios presentes en el látex de <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león”. Ayacucho 2017.	28
Tabla 5 Cuantificación mediante espectrofotometría ultra violeta de ADN genómico extraído de linfocito humano.	29
Tabla 6 Valores numéricos del grado de genotoxicidad de <i>Argemone mexicana</i> L. “cardo santo”, a las concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100% del látex, frente a ADN genómico humano, incubado a 37°C durante una hora. Ayacucho, 2017.	59
Tabla 7 Valores numéricos del grado de genotoxicidad de <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león”, a las concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100% del látex, frente a ADN genómico humano, incubado a 37°C durante una hora. Ayacucho, 2017.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Estructura del nucleótido y la doble hélice del ADN. 18
Figura 2	Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % del ADN genómico humano obtenido de seis muestras de sangre y coloreado con bromuro de etidio al 1%. 30
Figura 3	Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de <i>Argemone mexicana</i> L. “cardo santo” a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del primer ensayo. 31
Figura 4	Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de <i>Argemone mexicana</i> L. “cardo santo” a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del segundo ensayo. 32
Figura 5	Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de <i>Argemone mexicana</i> L. “cardo santo” a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del tercer ensayo. 33
Figura 6	Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de <i>Argemone mexicana</i> L. “cardo santo” a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del cuarto ensayo. 34
Figura 7	Prueba de Kruskal Wallis para evaluar el grado de genotoxicidad mediante fragmentación del ADN genómico de linfocito humano, por efecto del látex de <i>Argemone mexicana</i> L. “cardo santo” a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación a 37°C. 35
Figura 8	Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león” a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocitos 36

	humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del primer ensayo.	
Figura 9	Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león” a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del segundo ensayo.	37
Figura 10	Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león” a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del tercer ensayo.	38
Figura 11	Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león” a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del cuarto ensayo.	39
Figura 12	Prueba de Kruskal Wallis para evaluar el grado de genotoxicidad mediante fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, por efecto del látex de <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león” a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación a 37°C.	40

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1 Certificado de identificación taxonómica de <i>Argemone mexicana</i> L. “cardo santo”.	56
Anexo 2 Certificado de identificación taxonómica de <i>Taraxacum officinale</i> Wiggers. “diente de león”.	57
Anexo 3 Flujograma para determinar la actividad genotóxica “ <i>in vitro</i> ” de plantas medicinales propuesto por Miranda.	58
Anexo 4 Valores numéricos del grado de genotoxicidad de <i>Argemone mexicana</i> L. “cardo santo”, a las concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100% del látex, frente a ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante una hora. Ayacucho, 2017.	59
Anexo 5 Valores numéricos del grado de genotoxicidad de <i>Taraxacum officinale</i> . “diente de león”, a las concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100% del látex, frente a ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante una hora. Ayacucho, 2017.	60
Anexo 6 Fotografía de la recolección del látex de <i>Argemone mexicana</i> L. “cardo santo”	61
Anexo 7 Fotografía de la recolección del látex de <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león”.	62
Anexo 8 Tamizaje fitoquímico obtenido del látex de <i>Argemone mexicana</i> L. “cardo santo”.	63
Anexo 9 Tamizaje fitoquímico obtenido del látex de <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león”.	64
Anexo 10 Protocolo de extracción de ADN genómico de linfocito humano.	65
Anexo 11 Protocolo para la determinación del efecto genotóxico <i>in vitro</i> mediante electroforesis.	68
Anexo 12 Matriz de consistencia.	69

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivos determinar el efecto genotóxico *in vitro* del látex de plantas medicinales de uso dérmico *Argemone mexicana* L. “cardo santo” y *Taraxacum officinale* “diente de león” e identificar los metabolitos secundarios presentes. El tamizaje fitoquímico se realizó mediante el método de Lock y Miranda, la estimación del daño genotóxico “*in vitro*” fue determinado mediante electroforesis en gel de agarosa. El látex de las plantas medicinales de uso dérmico de *Argemone mexicana* L. “cardo santo” y *Taraxacum officinale* “diente de león” presentan una importante actividad genotóxica frente al ADN genómico humano. Los metabolitos secundarios identificados en el látex *Argemone mexicana* L. “cardo santo” fueron: alcaloides, compuestos fenólicos y taninos (+++), mientras que en el látex de *Taraxacum officinale* “diente de león” los metabolitos secundarios identificados fueron: compuestos fenólicos y taninos (+++), alcaloides (+), cardenólidos (+). El látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo” desde 10% al 100% de concentración, presenta un potente efecto genotóxico frente al ADN genómico humano, fragmentándolo en 100%; mientras que el látex de *Taraxacum officinale* “diente de león” muestra que las concentraciones de 50% y 100% de látex presentan fragmentación del ADN en 100%, y las de 10% y 25%, fragmentan el ADN genómico humano entre 40% a 95%, siendo esta la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). En conclusión el látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo” y *Taraxacum officinale* “diente de león” son genotóxicas.

Palabras claves: Genotoxicidad, *Argemone mexicana* L, *Taraxacum officinale*

I. INTRODUCCIÓN

La actual predisposición a consumir productos naturales y, en muchas regiones, la difícil disponibilidad y accesibilidad a los medicamentos han llevado a las poblaciones del mundo a buscar otras alternativas para aliviar sus dolencias. Una de las más difundidas ha sido el regreso a la medicina ancestral, lo cual ha provocado un aumento en el consumo de fitoterapéuticos, existe además una creciente inclinación por el uso de extractos naturales como parte de la dieta o en aplicaciones benéficas como ungüentos o lociones.^{1,2}

El Perú presenta una riqueza y mega diversidad de plantas medicinales nativas, desde la época pre incaica hasta la actualidad. Siendo estas últimas utilizadas en forma empírica por sus bondades terapéuticas en el cuidado y restauración de la salud debido a la actividad farmacológica que poseen pero a la vez pudiendo ocasionar toxicidad de las mismas, dependiendo de la dosis consumida. Por esto resulta importante estudiar las plantas tóxicas como fuente de productos activos, una de las formas de evaluación de toxicidad está dada por su efecto sobre el patrimonio genético, nivel de análisis propio de la "genética toxicológica".^{3,4} El ensayo cometa, también denominado electroforesis de células individuales, es una técnica rápida, sensible y relativamente simple, que detecta daños en el ADN a nivel de células individuales. El ensayo cometa ha sido ampliamente estudiado con el fin de conocer sus ventajas y limitaciones en estudios de toxicidad genómica, ecológica y biomonitorización, este método se basa en la capacidad del ADN, de carga negativa, para migrar a través de un gel de agarosa en respuesta a un campo eléctrico hacia la carga positiva. El grado de migración de la molécula depende directamente de los daños en el ADN presente en las células.⁵

Uno de los problemas que la humanidad ha enfrentado durante su existencia viene a ser las infecciones de la piel, las enfermedades de la piel son muy frecuentes. Sin embargo, es probable que incluso las personas que consideran su piel "sana"

hayan tenido cierto grado de acné y tal vez uno u otro de los múltiples trastornos cutáneos comunes. El eccema atópico y las otras formas de eccema afectan a cerca del 15% de la población menor de 12 años, la psoriasis afecta al 1-2%, y las verrugas virales, verrugas seborreicas y queratosis solar afectan a grandes segmentos de la población. No es frecuente que los trastornos de la piel sean graves, pero causan molestia considerable y una gran discapacidad. La discapacidad causada es física, emocional y socioeconómica. La piel es una estructura extraordinaria. Las personas dependen por completo de esta barrera, que separa el ambiente externo potencialmente dañino del interior vulnerable del cuerpo.⁶ El uso de las plantas medicinales en la terapéutica requiere, al igual que los productos sintéticos, de investigaciones previas y posteriores a su comercialización, donde sigan siendo observadas mediante estudios de farmacovigilancia.⁷

En el presente estudio, la estimación del daño genotóxico *in vitro* fue determinado con la metodología propuesta por Miranda, que consiste en exponer al ADN genómico humano a diferentes concentraciones del látex de la planta medicinal a 37°C, luego sometido a 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 *UV solo TS*, constituyendo un método eficaz y eficiente para determinar la genotoxicidad de las plantas medicinales.⁸

Se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Determinar el efecto genotóxico *in vitro* del látex de plantas medicinales de uso dérmico *Argemone mexicana* L. “cardo santo” y *Taraxacum officinale* “diente de león”.

Objetivos Específicos:

1. Determinar la presencia de metabolitos secundarios del látex de plantas medicinales de uso dérmico *Argemone mexicana* L. “cardo santo” y *Taraxacum officinale* “diente de león”.
2. Caracterizar el efecto de la genotoxicidad del látex de las plantas medicinales de uso dérmico en estudio, con ensayos *in vitro* frente al ADN genómico de linfocitos humano, detectado mediante electroforesis.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio.

La utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa, especialmente en aquellas dolencias para las que no existe un remedio adecuado. Un número creciente de personas recurren a sus propiedades curativas basándose en su uso tradicional. No obstante, ciertas plantas medicinales no han mostrado las propiedades que les atribuye la medicina popular, e incluso han resultado peligrosas.⁹

Esto ha ocasionado un vacío en el conocimiento de las propiedades medicinales de numerosas plantas, pero éstas también pueden tener efectos secundarios, entre ellos aquel que puede causar daño a nivel del ADN del organismo patógeno como en las células de la persona 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 al ADN y a qué concentraciones se puede presentar.¹⁰ Desde hace varias décadas el ensayo Cometa, o electroforesis alcalina de células individuales, se ha convertido en un método establecido para el estudio del daño de ácido desoxirribonucleico, con múltiples aplicaciones en ensayos de genotoxicidad, estudios de biomonitorio en humanos, epidemiología molecular y ecotoxicología; así como una herramienta fundamental para investigaciones sobre daño y reparación del ácido desoxirribonucleico.¹¹

En cuanto a los trabajos de investigación realizados referente a las plantas en estudio, podemos mencionar:

Ángel evaluó la actividad genotóxica de propóleos recolectados en diferentes apiarios de Cundinamarca y Boyacá (Colombia)". La metodología utilizada para alcanzar su objetivo, incluyó el montaje de una batería de dos pruebas de genotoxicidad en linfocitos de sangre periférica humana: ensayo de micronúcleos (MN) y la prueba de cometa (SCEG). Se utilizaron dos muestras de propóleo: Universidad Nacional de Colombia y San Mateo – Boyacá; se realizaron

extracciones etanólicas de cada muestra y se evaluaron cuatro concentraciones (0,0156; 0,0312; 0,0468 y 0,0624 µg/µL). Los resultados más relevantes de cada una de las pruebas demuestran que existe una diferencia entre los propóleos que provienen de regiones geográficas distintas, tanto en la composición química como en su actividad biológica, se observaron efectos citotóxicos y genotóxicos para ambos tipos de propóleo que se relacionaron con el incremento de las concentraciones y con el tipo de propóleo. El análisis estadístico fue a través de la prueba de Chi-cuadrada para el ensayo de MN y ANOVA con prueba Tukey para el ensayo cometa, determinando que hay diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas y respecto al control. Finalmente se concluyó que la muestra (UN) produce más daño en todas las concentraciones evaluadas que la muestra (SM) sobre linfocitos de sangre periférica humana y que pueden ser evaluadas con los ensayos de MN y Cometa.¹²

Brugés y col., (2007) en el estudio que realizaron sobre la evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. donde Los extractos etanólicos presentaron una importante actividad genotóxica sobre los linfocitos en el ensayo Cometa, siendo el extracto etanólico de raíces el que presenta mayor genotoxicidad (CL50 35 ppm). Es importante señalar que el extracto acuoso de hojas presenta una baja genotoxicidad (CL50 900 ppm), lo cual es relevante si se toma en consideración que es la parte de la planta tradicionalmente utilizada por las comunidades indígenas ubicadas en la Sierra Nevada de Santa Marta.¹

Remigio y col., (2001) realizaron el estudio genotóxico *in vivo* de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores, los extractos fueron administrados por vía oral. Como controles negativo y positivo se utilizaron agua y ciclofosfamida (40 mg/kg) respectivamente. Al final del tratamiento los animales fueron sacrificados y procesada la médula ósea para obtener las preparaciones. Solo uno de los seis extractos ensayados indujo micronúcleos en las células somáticas de los animales tratados.¹³

Palacio evaluó la actividad anti-genotóxica mediante ensayo cometa de la horchata expandida en los mercados de Loja, en este trabajo se evaluó la actividad genotóxica y anti-genotóxica de 9 tipos distintos de horchata sobre la línea celular de Ovario de Hámster Chino (CHO-K1) mediante ensayo cometa y la producción e inhibición de especies reactivas de oxígeno mediante fluometría. Los resultados

indican que las horchatas producen efectos genotóxicos en el ADN de las células, así como la producción de ROS.¹⁴

Vizoso y col., (2005) realizaron el estudio genotóxico *in vitro* del extracto fluido de *Cassia grandis* L. y el gel de *Aloe vera* L. con el objetivo de conocer la posible actividad mutagénica del extracto fluido de *Cassia grandis* L. y el gel de *Aloe vera* L., se llevó a cabo un estudio toxicogenético empleando dos sistemas de ensayo a corto plazo uno *in vitro* y otro *in vivo*; el modelo *Aspergillus nidulans* D-30 que detecta daño primario al ADN y el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón el cual determina daño clastogénico y aneugénico. En el ensayo *in vitro* con el hongo *Aspergillus nidulans* D-30 (segregación mitótica) se evaluaron con concentraciones del extracto fluido de *Cassia grandis* L., desde 0,067 a 1,675 mg de sólidos totales/mL y para el gel de *Aloe vera* L., concentraciones de 0,09 a 1,00 mg de sólidos totales/mL. En la prueba *in vivo* de inducción de micronúcleos se ensayaron para la *Cassia grandis* L. y para el gel de *Aloe vera* L., dosis de 500, 1000 y 2000 mg/kg de peso corporal (pc). En ambas baterías de ensayos genotóxicos ninguno de los 2 fitofármacos mostró ni daño celular ni actividad genotóxica.¹⁵

Gadano y col., (2004) realizaron un estudio del Screening genotóxico de hierbas medicinales utilizadas en la medicina tradicional Argentina, en el screening genotóxico realizado sobre seis especies diferentes de plantas medicinales argentinas mediante la electroforesis de una sola célula, se determinó que cuatro de ellas indujeron daño al ADN. Las plantas que indujeron roturas doble y simple cadena fueron: *Chenopodium multifidum* (paico); *Schkuhria pinnata* (canchalagua); *Solanum sisymbriifolium* (espino colorado) y *Lithraea molleoides* (molle de beber).¹⁶

Juárez evaluó la posible actividad genotóxica de alfa-asarona en células gaméticas y somáticas de vegetales, en esta investigación se utilizó el sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* clon 4430 y en células meristemáticas de *Allium cepa*, sistemas que son altamente eficientes, sensibles y útiles para evaluar genotoxicidad. Se estudiaron siete concentraciones: 30, 60, 90, 150, 180, 210 y 250 µg/ml para cada uno de los sistemas, por triplicado; se utilizó etanol al 1% como disolvente. Para *Tradescantia* se obtuvo un efecto genotóxico ($p < 0.05$) a las concentraciones de 180, 210 y 250 µg/ml. Con el sistema de *Allium cepa* los resultados muestran un efecto genotóxico a la concentración de 210 µg/ml, sin alteraciones en su índice mitótico (9,0%), mientras

que a 250 µg/ml se observa un efecto tóxico ($p < 0.05$) con inhibición de la división mitótica (0.12%). Es conveniente restringir el uso de *Guatteria gaumeri* en tanto no se cuenten con otros datos de evaluación.¹⁷

Chang y col., (2003) evaluaron la Cytotoxic Benzophenanthridine and Benzylisoquinoline Alkaloids from *Argemone mexicana*. El fraccionamiento del extracto clorofórmico de la parte aérea de *Argemone mexicana* se utilizó para el aislamiento de dos alcaloides de tipo benzofenantridina, N-dimetiloxisanguinarina y pancorina; tres alcaloides de tipo bencilisoquinolina, (+)-1,2,3,4-tetrahidro-1-(2-hidroximetil-3,4-dimetoxifenilmetil)-6,7-metilendioxiisoquinolina, (+) - higenamine y (+) - Reticulina. Entre ellos, N-dimetiloxisanguinarina es un nuevo compuesto, y (+)-1,2,3,4-tetrahidro-1-(2-hidroximetil-3,4-dimetoxifenilmetil)-6,7-metilendioxiisoquinolina fue aislado por primera vez de una fuente natural, a la que se asignó un trivial nombre, (+) –argenaxina. Además, se aislaron también seis compuestos no alcaloides conocidos e identificados. Todos los compuestos se caracterizaron sobre la base de sus datos espectrales y evidencias químicas. Algunos alcaloides aislados de esta especie fueron evaluados por su citotoxicidad al carcinoma nasofaríngeo humano (HONE-1) y el cáncer gástrico humano (NUGC) líneas celulares. Se encontró que la queleritrina exhibe una actividad significativa contra la línea celular NUGC, mientras angoline inhibe ambos tipos. (+) – Argenaxine, mostró una actividad moderada contra la línea celular NUGC.¹⁸

Brahmachari y col., (2013) Realizaron un estudio sobre el extracto metanólico de las hojas de *Argemone mexicana* L, donde presentan actividad citotóxica contra fibroblastos de ratón sano (NIH3T3) y tres líneas de células cancerosas humanas (AGS, HT-29 y MDA-MB-435S) utilizando el MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio] según lo informado por Uddin (2011). El resultado mostró que el extracto es muy activo contra MDAMB-435S línea celular de cáncer (IC₅₀ 1,82 mg / ml). Chang (2003) aisló varios alcaloides de *Argemone mexicana* L. y evaluó la actividad citotóxica de alguno de ellos. N-demethyloxysanguinarine, pancorine, (+) - argenaxine, (+) –higenamine, (+) - reticulina, angoline y queleritrina para el carcinoma nasofaríngeo humano (HONE-1) y cáncer gástrico (NUGC) líneas celulares humanas. Queleritrina se encontró que era el más activo entre la serie contra líneas celulares NUGC, mientras que (+) – argenaxine sólo mostró una actividad moderada. Por otra parte, angoline inhibe tanto el cáncer HONE-1 y NUGC líneas de células.¹⁹

Huaman y col., (2014) realizaron un estudio genotóxico de una bebida experimental de quinua, kiwicha y kañiwa, evaluaron el potencial genotóxico de esta bebida experimental mediante dos pruebas *in vitro* validadas por agencias internacionales. En la prueba de Ames se utilizaron las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*, con y sin fracción microsomal (S9). Se evaluaron 4 dosis de bebida y además un posible efecto antimutagénico. Para la prueba de micronúcleos se usó cultivos de linfocitos con células binucleadas en presencia de cinco dosis de la bebida. Ambas pruebas indican que la bebida estudiada en sus distintas dosis no presenta efecto genotóxico. Sin embargo, en la evaluación del posible efecto protector de la bebida se evidenciaría que por el contrario se potencia el efecto mutagénico de los mutágenos empleados para cada cepa. Por lo tanto, es importante que esta bebida experimental sea sometida a pruebas adicionales *in vitro* e *in vivo* para evaluar el potencial genotóxico antes de su consumo.²⁰

Zafar y col., (2014) evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos (metanol, cloroformo y agua destilada) de *Taraxacum officinale*. El resultado del extracto de *Taraxacum officinale* en metanol y cloroformo se mostró que es eficaz contra todos los patógenos bacterianos ensayados *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*, mientras que los extractos en agua destilada no mostraron ninguna actividad. La concentración mínima inhibitoria (MIC), de los extractos contra estas cepas bacterianas estaba en el rango de 0,30 mg / ml. Los diferentes resultados del análisis fitoquímico indica la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, taninos y flavonoides que pueden ser responsables del ensayo antibacteriano.²¹

Remigio y col., (2007) estudiaron el efecto genotóxico de un extracto de *Indigofera suffruticosa* Mill. mediante el ensayo *Salmonella*/microsomas con las líneas TA 1535, TA 1537, TA 98 y TA 100 que resultó positivo para el protocolo de incorporación en placas con las cepas TA 1535, TA 1537 con un rango de concentraciones de 50 a 5000 µg/placa (± S9). Mediante el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón el extracto exhibió un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de PCE micronucleados en las hembras tratadas y una relación dosis respuesta positiva, cuando se evaluaron dosis de 500, 1000 y 2000 mg/kg por vía oral con el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón.²²

2.2 Aspectos botánicos de *Argemone mexicana* L. “cardo santo”.

2.2.1 Clasificación taxonómica de *Argemone mexicana* L. “cardo santo”.

La identificación para la muestra vegetal para el presente trabajo de tesis, ha sido determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A., 1988 de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por la Blga. Aucasime²³

División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Sub clase	: Magnollidae
Orden	: Papaverales
Familia	: Papaveraceae
Género	: <i>Argemone</i>
Especie	: <i>Argemone mexicana</i> L.
Nombre Vulgar	: “cardo santo”

Fuente: Certificado emitido por el Herbarium Huamangensis de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH (2013) (Anexo 1).

2.2.2 Descripción botánica

Es una planta anual o bianual, herbácea de climas tropicales y subtropicales, erecta cuya altura llega a ser más de un metro, presenta tallos ramificados más o menos cilíndricos espinosos glaucos, contienen látex de color amarillo. Sus hojas son simples pinnatipartidas, de disposición alterna. Las flores son generalmente solitarias, bisexuales y actinomorfas, cáliz formado por dos sépalos caducos; corola formado por 4 -6 pétalos de color amarillo también caducos. Estambres numerosos y libres. Gineceo de ovario súpero, bicarpelar y unilocular numerosos óvulos. El fruto es una cápsula, oblonga, espinosa, de 2,5 - 5 cm de largo y 2 cm de ancho, con 4-6 válvulas de apertura en la punta para su liberación.

Se encuentra distribuida desde Estados Unidos, México, América Central, Colombia, Guyana, Venezuela, Brasil, Ecuador, Perú, Uruguay y Argentina. Naturalizada en la India, Java, Egipto, Ghana, Nigeria, Australia y en lo trópicos de todos los continentes, En el Perú es frecuente en los valles interandinos, esta planta es de crecimiento espontáneo, incluso como hierba invasora de los terrenos de cultivo. Es importante en la apicultura: productora de polen. Crece en forma espontánea y silvestre, su propagación y crecimiento están supeditados a la época de lluvias generalmente.^{24.,25}

2.2.3 Usos tradicionales

Argemone mexicana es una planta muy usada en la Medicina Tradicional, en el tratamiento de numerosas enfermedades, varias partes de la planta tienen potente actividad antiemética, actividad narcótica y tradicionalmente ha sido usada para tratar la sífilis y enfermedades de la piel. Las semillas son usadas contra la tos y el asma, también son laxativas y expectorantes. La raíz es antihelmíntica. En la Medicina Tradicional Mexicana la planta *Argemone mexicana* es usada para curar afecciones de los ojos, como dolor, escozor, manchas e inflamación; aunque principalmente se usa en las cataratas, aplicando directamente el látex fresco o fomentos del cocimiento de la corteza por 5 ó 6 días. La leche (látex) fresca se aplica por las noches sobre el párpado o dentro del ojo para quitar el escozor, el látex se pone en gotas para remover las nubes de los ojos, de la misma forma se aplica en ojos irritados, aunque se sugiere ponerla por la mañana.^{24,25}

Las hojas junto con la pimienta negra se utilizan para curar la diabetes. La decocción de las hojas se utiliza en el tratamiento de la fiebre palúdica y úlceras. El extracto acuoso de hojas también posee actividad anti-inflamatoria. Una decocción de las hojas se bebe para tratar dolores de estómago y también es utilizada en baños para tratar el dolor muscular. Las hojas son útiles contra la tos, heridas, úlceras, verrugas, herpes labial, afecciones cutáneas, enfermedades de la piel.²⁶

Las flores son utilizadas como narcótico; el extracto en agua caliente de la planta es utilizado como insecticida efectivo contra diversas plagas como "gusano cogollero del maíz", orugas y otros insectos.

Así mismo se reporta como anti-insecto frente a *Bagrada picta*, *Pieris brassicae* y *Spodoptera litura*, antifúngico frente a *Altemaria tenuis* y una especie de *helminthosporium*. antinemátodo frente a *Meloidogyne incógnita* y *Meloidogyne javanica* e insecticida frente a *Bagrada cruciferarum*. *Dysdercus Koenigii*, *Lipaphis erysími* y *Sitophilus oryzae* (siendo los alcaloides los metabolitos responsables de estas actividades); así mismo como controlador de plagas de maíz en un ensayo de campo y controlador del gorgojo pinto del frijol.²⁴

2.2.4 Composición química

La especie *Argemone mexicana* ha sido estudiada por sus usos en medicina y por su actividad farmacológica, contra la malaria, la diabetes, el cáncer, por su actividad cicatrizante, antipirética, por su actividad hepatoprotectora, actividad antimicrobiana, anti – VIH, actividad antiasmática, citotóxica y su actividad antiinflamatoria.²⁶

Entre los alcaloides identificados como controladores de las diversas actividades se encuentran allocriptopina, argemonina, berberina, cheleritrina, codeína, coptisina, dihidrocheleritrina, morfina, norargemonina, protopina, romneina, y sanginarina, de los cuales berberina y protopina reportan ser mayoritarios. Estructuralmente ellos pertenecen al tipo de alcaloides isoquinolínicos los que aproximadamente se han dividido en veinte grupos o categorías. Entre los grupos a los que pertenecen los alcaloides en estudio se encuentran las protoberberinas, las benzofenantridinas, las protopinas, de tipo pavina y morfina. Distintos estudios indican que *Argemone mexicana* también presentan aminoácidos, compuestos fenólicos y ácidos grasos como ácido mirístico, palmítico, oleico, linoleico, etc.^{24,26} El extracto metanólico y acuoso (frío y caliente) de las hojas y semillas de *Argemone mexicana* posee actividad contra dos cepas gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) y dos cepas gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), se encontró que el alcaloide aislado N – dimetiloxysanguinarina es el que tiene actividad contra *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.²⁶

Alcaloides

En la actualidad se han aislado y elucidado más de 20,000 estructuras de metabolitos secundarios. Desde la identificación del primer alcaloide, la morfina, encontrado en *Papaver somniferum*, los alcaloides han recibido un interés particular debido a que presentan ciertas actividades biológicas en animales y humanos que se pueden aprovechar en el diseño de medicamentos. El término alcaloide proviene de la raíz árabe *alkali* que hace referencia a su comportamiento químico similar al de las bases. Todos los alcaloides son compuestos nitrogenados sintetizados a partir de diferentes aminoácidos.²⁷

Alcaloides bencilisoquinolínicos (ABIs)

Los ABIs son derivados de dos unidades de tirosina que, después de ser modificados se condensan formando un intermediario central que da lugar a los diferentes subgrupos que incluyen a las benzofenantridinas, como berberina y palmitina; y los alcaloides morfínicos, como la morfina y codeína. La actividad biológica de los ABIs los hace útiles en el tratamiento de diversas afecciones humanas. Por ejemplo, la morfina tiene eficacia como analgésico, la colchicina provoca la disrupción de los microtúbulos y la (+) – tubocurarina es un bloqueador neuromuscular. Esto sugiere que también funcionan en las plantas como protectores contra el ataque de herbívoros. La propiedad antimicrobiana de la

sanguinarina y de la berberina sugiere que pueden conferir protección a la planta contra microorganismos *P. somniferum*, como muchas plantas, invierten considerables recursos para la producción de estos alcaloides, lo que sugiere que estos componentes juegan un papel esencial y fisiológico dentro de la misma.²⁷

2.3 Aspectos botánicos de *Taraxacum officinale* “diente de león”.

2.3.1 Clasificación taxonómica de *Taraxacum officinale* “diente de león”.

La identificación para la muestra vegetal para el presente trabajo de tesis, ha sido determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A., 1988 de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por la Blga. Aucasime²³

División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Sub clase	: Asteridae
Orden	: Asterales
Familia	: Asteraceae
Género	: <i>Taraxacum</i>
Especie	: <i>Taraxacum officinale</i> Wiggers
Nombre Vulgar	: “diente de león”, “amargón”

Fuente: Certificado emitido por el Herbarium Huamangensis de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH (2013) (Anexo 2).

2.3.2 Descripción botánica

Es una planta vivaz, anual y perenne se distingue por ser una hierba de unos 10cm a 50cm de altura, pertenece a la familia de las compuestas, por lo tanto, es pariente de la Caléndula y de la Margarita, entre otras plantas conocidas. La especie presenta un intenso polimorfismo ligado a la existencia de numerosos poliploides, es por ello que aparece en las clasificaciones como grupo, ya que se trata de un conjunto numeroso de plantas.²⁸

La raíz primaria larga, roseta basal, más o menos gruesa que cuando se corta arroja leche muy blanca del extremo superior de la misma, a ras del suelo, brotan las hojas alternas lanceoladas con una nervadura central y tiene un color verde brillante. Las hojas varían también en semejantes proporciones, y sobre toda ponderación por su forma, porque las hay de bordes dentados o casi enteros, porque siendo el tallo tan corto, parece que esta planta no la tiene, salvo cuando florece que produce unos cabillos sin hojas, los bohordos floríferos. Los bohordos suelen tener cierta pelusilla, sobre todo en la parte superior y son huecos como

una caña en toda su extensión. En el extremo traen una cabezuela de flores rodeada por una serie de hojitas o brácteas verdes más cortas que aquellas y por fuera de ellas las rodea un collarcito de otras brácteas más cortas y echadas hacia fuera. Las flores tienen figura de lengüeta rematan en cinco puntitas y son de color amarillo. Dentro de la cabezuela se forman los frutitos de esta planta, pequeños, algo más anchos hacia arriba a modo de pequeños gusanitos. El fruto es un aquenio con una sola semilla a veces prolongado en un pico y con frecuencia rematado por un vilano de escamas o de pelos simples o ramificados que facilita su dispersión aérea.^{28, 29}

2.3.3 Distribución y hábitat

De origen europeo, probablemente de Grecia, aunque en la actualidad se encuentra ampliamente distribuida en todo el hemisferio norte. Es frecuente encontrarla en terrenos baldíos, al borde de caminos, en prados y jardines.²⁹

2.3.4 Usos tradicionales

En nuestro país especialmente a nivel popular, sus usos son muchos y requieren prácticamente a toda la planta, tiene propiedades como tónico remineralizante o reconstituyente. Se considera un excelente “depurativo” o “drenadorhepato – renal”. Las hojas y raíces de esta planta poseen varias propiedades que la convierten en una de gran utilidad terapéutica. Las hojas actúan como un diurético aumentando el flujo de orina. Muchos diuréticos tienen la desventaja de que hacen disminuir los niveles de potasio en la sangre. Sin embargo, el diente de león contiene altos niveles de potasio por lo que no tiene este efecto. Las raíces contienen dos sustancias llamadas inulina y levulina que ayudan a balancear el nivel de azúcar en la sangre. También contienen otras sustancias que estimulan la digestión, el flujo de bilis del hígado y la vesícula biliar y la producción de ácido hidrocórico en el estómago. Todo esto convierte al diente de león en una gran ayuda para los procesos digestivos y para desintoxicar el colon y el hígado. Por su acción depurativa se utiliza en el tratamiento de fondo de enfermedades cutáneas: acné, eczemas, forunculosis, herpes, psoriasis, etc. Está especialmente indicado en todas las dermatosis de etiología relacionada con secreción biliar defectuosa. El látex de la planta fresca puede producir dermatitis de contacto, el uso interno, debido a su contenido en sustancias amargas, puede causar molestias gástricas, con hiperacidez. Para evitarlo se recomienda asociar a drogas mucilaginosas, como el malvavisco.^{28,30}

2.3.5 Composición química

La composición química de *Taraxacum officinale* es tan compleja como variada. Contiene lactonas sesquiterpénicas, que son los principios amargos (taraxacina, taraxacerina, o lactucopicrina) responsables de su sabor (principalmente del tipo de los eudesmanólidos y germacranólidos), característicos de las asteráceas, a estos compuestos se les atribuye el potencial anti-inflamatorio y el beneficio del diente de león en el hígado y el aparato digestivo, además en la planta pueden encontrarse compuestos fenólicos simples del grupo de los fenilpropanoides, como los ácidos trans-cinámico y *p*-cumárico, y sus derivados, como el ácido cafeico, que presentan efecto modulador sobre la inflamación. También contiene compuestos fenólicos complejos como luteolóxido y cosmosiósido. Asimismo, en el diente de león se ha detectado una compleja mezcla de compuestos terpenoides y fitosteroles, como faradiol, β -amirina, β -sitosterol, sitgmasterol, taraxerol y taraxasterol. En la raíz del diente de león se encuentra la inulina, un carbohidrato de almacenamiento natural presente principalmente en asteráceas, que alcanza en otoño hasta un 40% del contenido total de la raíz. También se encuentran formando parte de su composición varias cumarinas, flavonoides, vitaminas B y C.²⁹

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros. Esta síntesis se da a partir de fenilalanina por la vía del shikimato. Juegan un rol vital en las plantas y regulan el metabolismo y síntesis de la lignina, por lo que las plantas presentan un gran número de componentes fenólicos (flavanoles, flavonoles, chalconas, flavonas, flavanonas, isoflavonas, taninos, estilbenos, curcuminoides, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, etc).³²

2.4 Afecciones dérmicas

La piel es un órgano que desempeña una gran variedad de funciones: protección frente agresiones externas, impermeabilización, termorregulación, producción de vitamina D, absorción de radiación ultravioleta y la detección de estímulos sensoriales. Existen enfermedades de la piel que son producto de la acción de un agente etiológico microscópico, (virus, hongo, bacteria o protozoario), como también por agentes visibles al ojo humano, como son las ectoparasitosis (piojos, ladillas, etc).³³

2.4.1 Acné

El acné es una dermatosis caracterizada por una foliculitis crónica producida por el *Corynebacterium acnés* asociada a un trastorno de queratinización de la capa córnea con formación de tapones de queratina (comedones) y la sobreproducción de grasa también denominada seborrea. La lesión fundamental para hacer el diagnóstico es el comedón, esta lesión se observa en la histopatología como una hipertrofia de las glándulas sebáceas y una hiperqueratosis intrafolicular, pueden verse acúmulos de neutrófilos, células gigantes de tipo Touton, restos de glándulas sebáceas y folículos, en las pústulas predominan la acumulación de leucocitos polimorfonucleares y en los períodos más tardíos hay fibrosis en las cicatrices e incluso la formación de quistes de retención. El acné es una de las enfermedades más comunes de la piel, afecta cerca del 80% de las personas con edades entre los 11 y los 30 años; puede persistir por años y resultar en efectos adversos tanto físicos como psicológicos en el paciente.^{33,34}

Tratamiento

El tratamiento va dirigido a la eliminación de los comedones, disminución de la población de las bacterias y levaduras lipófilas y la reducción de la inflamación.

La elección del medicamento dependerá del tipo de lesión y la severidad que presente el paciente. Es necesario realizar una historia clínica detallada, determinar el tiempo de evolución, tratamientos previos, antecedentes heredofamiliares y tendencia a desarrollar cicatrices.

Hay un consenso en cuanto a que los retinoides tópicos deben ser usados como primera línea terapéutica para el acné inflamatorio leve a moderado, así como también para el acné comedónico y en la terapia de mantenimiento. Su mecanismo de acción se basa en: la inhibición de la formación y número de comedones; expulsión de comedones maduros (abiertos/ (tratamiento de mantenimiento). En la actualidad se encuentran disponibles los siguientes retinoides tópicos para el acné: tretinoína, adapaleno y tazaroteno. Ellos difieren algo en cuanto a efectos antiinflamatorios y tolerabilidad; esto es importante ya que la irritación es el principal efecto colateral que impide la continuidad de este tipo de tratamiento.³⁵

2.4.2 Verruga de la piel

Las verrugas son epitelomas infecciosos benignos que afectan a las capas superiores de la piel y las mucosas. El agente causal del virus de la verruga es un virus DNA cariotípico llamado *papiloma virus humano* (PVH). Hasta la fecha se

han aislado más de 70 tipos diferentes de PVH sin completarse del todo la clasificación de éstos. Las verrugas constituyen una enfermedad de difusión universal que afecta preferentemente a niños y gente joven. Parece ser que es necesaria una cierta predisposición genética para sufrir la infección. El 10% de la población infantil padece verrugas. Cuando la piel está dañada existe más facilidad para el contagio. Esto explica que las personas que se comen las uñas tengan más verrugas.³⁶

Tratamiento de las verrugas de la piel

Las verrugas se consideran una enfermedad infecciosa autolimitada de origen vírico, por lo que su tratamiento no debe ser nunca demasiado agresivo evitando tratamientos que dejen cicatriz. El tratamiento de las verrugas dependerá del tipo de las mismas, de su número, tamaño y localización, de la experiencia del médico y del deseo del paciente. Se recomienda siempre un tratamiento conservador dada la tendencia a la resolución espontánea de las verrugas.³⁰

Si las verrugas no desaparecen solas pueden tratarse con líquidos irritantes para estimular las defensas del organismo contra el virus y queratolíticos para disminuir el tamaño de estas. En caso de que estos no sean eficaces pueden emplearse métodos como la crioterapia, el bisturí eléctrico o el láser.³⁶

2.5 Toxicidad y genotoxicidad

2.5.1 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).³⁷

2.5.2 Genotoxicidad

Es la capacidad de producir un daño en el material genético por agentes físicos, químicos o biológicos; el daño en el material genético incluye no solo 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. Este daño puede ser de dos tipos: mutagénico o carcinogénico, mutagénico produciendo cambio heredable en el material genético, ya sea la transformación química de un gen individual, que altera la función de dicho gen, la reorganización, ganancia o pérdida de una parte de un cromosoma y carcinogenicidad.³⁸

2.6 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 groseros en la estructura) o numéricas (aneuploidías y poliploidías por afectaciones en los componentes del aparato mitótico o meiótico) o alteraciones al DNA (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.

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 DNA opera el daño causado por el compuesto evaluado. En concordancia con ello se reconocen los niveles siguientes: Mutación génica (nivel I), Mutación cromosómica (nivel II), Daño primario del DNA (nivel III), Transformaciones celulares (nivel IV), Otras alteraciones. Los ensayos pertenecientes a los dos primeros niveles son muy variados y ampliamente utilizados, en especial las pruebas *in vitro* que se caracterizan por tener una alta sensibilidad y precisión. En los últimos años las pruebas para medir daño a nivel primario del ADN, han alcanzado gran importancia entre los análisis de genotoxicidad.

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. 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 cromatidas hermanas; micronúcleos, síntesis de ADN no programada y electroforesis de una célula (ensayo cometa).³⁹

2.7 Ensayo cometa (EC)

Desde hace varias décadas el ensayo Cometa, o electroforesis alcalina de células individuales, se ha convertido en un método establecido para el estudio del daño del ácido desoxirribonucleico, con múltiples aplicaciones en ensayos de genotoxicidad, estudios de biomonitorio en humanos, epidemiología molecular y ecotoxicología; así como una herramienta fundamental para investigaciones sobre daño y reparación del ácido desoxirribonucleico. Este ensayo se distinguió por su simplicidad, sensibilidad, versatilidad, rapidez y economía. Es una poderosa técnica que se basa en la visualización microscópica de las imágenes del ácido desoxirribonucleico después que las células son embebidas en agarosa, lisadas y sometidas a una electroforesis alcalina. Esta metodología básica ha sido ampliada y permite ahora, detectar con alta sensibilidad una gran variedad de daños del ácido desoxirribonucleico en cualquier tipo de células. La inclusión en este ensayo, de enzimas capaces de producir lesiones específicas en la hebra del ácido desoxirribonucleico, ha incrementado su rango de detección y sensibilidad.¹¹

La electroforesis de células individuales o el ensayo cometa es una prueba que cuantifica el daño ocasionado por un agente en el ADN, mediante el número de rupturas o fragmentos que posterior a un corrido electroforético toman la apariencia de la cola de un cometa.

Los agentes genotóxicos ocasionan rupturas que originan la fragmentación del material genético, lo cual se aprecia como la cola de un cometa posterior a una electroforesis. Así pues, ante la acción de un genotóxico, se espera tener cabezas con información intacta y colas con material afectado, por el contrario, en células sin daño se espera obtener solo cabezas o núcleos sin la existencia de colas. La cola del cometa se forma debido a que los fragmentos de ADN que en ella se encuentran son menos pesados que el resto de la cadena de ADN y por tanto su velocidad de migración hacia el polo positivo es mayor.⁴⁰

2.8 Ácido desoxirribonucleico (ADN)

Los ácidos nucleicos (AN) son portadores de la información genética y se encuentran en todas las células. Hay dos tipos de ácidos nucleicos: el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). En el ADN se encuentran las instrucciones génicas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos y algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria. Los segmentos de ADN que llevan esta información genética son llamados genes, pero también las otras secuencias de ADN tienen propósitos

estructurales o toman parte en la regulación del uso de esta información genética. El ADN es un polímero de nucleótidos, es decir, un polinucleótido, cada nucleótido, a su vez, está formado por un azúcar (la desoxirribosa), una base nitrogenada que puede ser: adenina (A), timina(T), citosina (C) o guanina (G) y un grupo fosfato.⁴¹

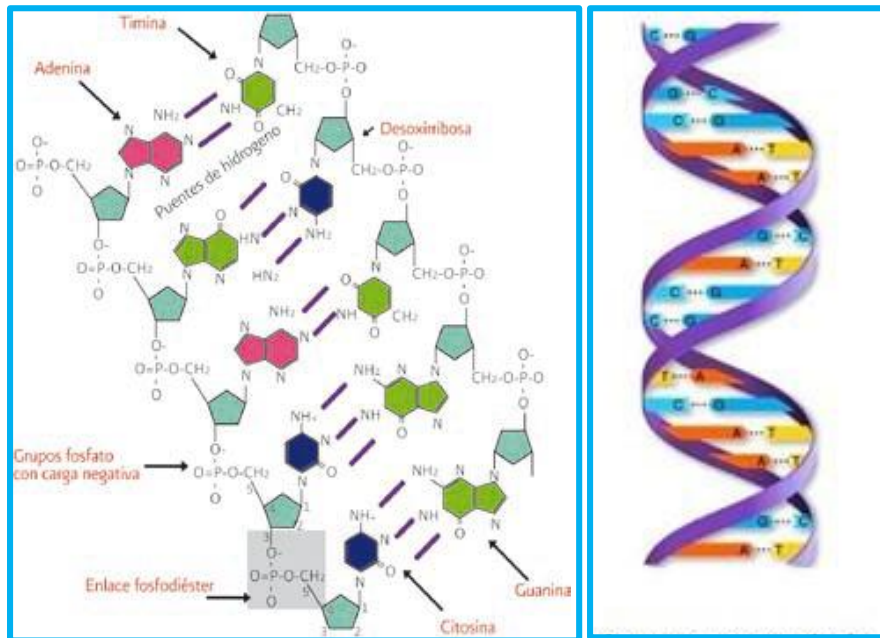


Figura 1. Estructura del nucleótido y la doble hélice del ADN.⁴¹

2.8.1 Cuantificación y determinación de pureza de ADN

La pureza del ADN es un factor muy importante para los subsecuentes análisis moleculares. Existen en general métodos diferentes para medir la cantidad de ácidos nucleicos en solución entre los cuales podemos mencionar al método de absorbancia y el de fluorescencia.⁴²

Espectrofotometría

La capacidad que tiene el ADN de absorber luz a una determinada longitud de onda (260 nm) permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico de la muestra. Si la densidad óptica (OD) es 1, corresponde a aproximadamente 50 µg/ml de cadena doble de ADN, entonces calculamos la concentración de ADN que tenemos en nuestras muestras, midiendo simplemente su absorbancia, sin necesidad de realizar una curva patrón.⁴²

Las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 (principalmente por residuos de triptófano), así las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existe algún contaminante proteico. El cálculo de una relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm es una manera común para hacer un estimado de la pureza o evaluar la contaminación de una preparación de ADN con proteínas de ácido nucleico, esta

relación debe estar entre los valores de 1,8 y 2,0. Si la muestra es pura, el primer método comúnmente usado para la cuantificación es el de espectrofotometría.⁴²

2.9 Electroforesis en gel

La electroforesis en gel es un modo conveniente de cuantificar el ADN y analizar su estado físico al mismo tiempo, se puede visualizar si existen contaminantes que pueden estar presentes en la muestra de ADN o si está degradado. 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.⁴²

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 periodo de tiempo determinado. Cada muestra comenzará a migrar a través de los poros del gel con una velocidad diferencial, que dependerá de la carga eléctrica y del tamaño molecular. Cuando las separaciones se han completado se interrumpe el paso de corriente y las muestras separadas se tiñen para visualizarse. Cada muestra se encontrará a una distancia distinta respecto al origen.⁴²

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 (número de nucleótidos), a la hora de cargar la muestra se colocan unos marcadores de frente (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. 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. La electroforesis en gel tiene dos mecanismos de separación: la electroforesis, que separa por la relación carga/tamaño y el tamizado por el gel, que separa mayormente por tamaño. Los geles más comunes son agarosa y poliacrilamida.⁴²

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del trabajo de investigación

El tamizaje fitoquímico del presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Farmacognosia del Área de Farmacia; la obtención de ADN de linfocitos humano y los ensayos de genotoxicidad se realizaron en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de octubre del 2016 y marzo del 2017.

3.2 Definición de población y muestra

3.2.1 Población:

Plantas de *Argemone mexicana* L “cardo santo” y *Taraxacum officinale* “diente de león” ubicadas en el rango altitudinal de 2700 msnm, que crecen en los diferentes pisos ecológicos de los distritos de Ayacucho, provincia de Huamanga de la región de Ayacucho, Perú.

3.2.2 Muestra:

Muestra vegetal

- 500 µL de látex de *Argemone mexicana* L “cardo santo”.
- 500 µL de látex de *Taraxacum officinale* “diente de león”.

Muestra biológica

- ADN de linfocito humano.

3.2.3. Tipo de muestreo

Muestreo por conveniencia

3.3 Diseño metodológico para la recolección de datos

3.3.1 Tipo de Estudio

Básico– experimental.

3.3.2 Recolección de la muestra

Las muestras de *Taraxacum officinale* “diente de león” fueron recolectadas en los jardines de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San

Cristóbal de Huamanga del distrito de Ayacucho; y las muestras de *Argemone mexicana* L “cardo santo” fueron recolectados en el distrito de Andrés Avelino Cáceres, provincia de Huamanga, de la región de Ayacucho. Todas ellas en buen estado de conservación, recogidas en las primeras horas del día, e inmediatamente fueron transportadas a los laboratorios para los ensayos respectivos.

La identificación taxonómica de cada planta medicinal en estudio fue realizada en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas por la BIga. Laura Aucasime Medina. (Anexo 1 y 2).

3.3.3 Obtención del látex

El látex de *Taraxacum officinale* “diente de león” se obtuvo realizando un corte en la parte basal de la planta, con la ayuda de la micropipeta de 10µL se recolectó en los tubos de eppendorf estériles de 200 µL (estos tubos ya estaban preparados, conteniendo cada tubo la cantidad de microlitros de ADN y agua bidestilada para cada concentración) e inmediatamente se llevó la muestra al laboratorio, para el Tamizaje fitoquímico el látex fue obtenido con la ayuda de una varilla de metal y una placa de tinción de vidrio; en el caso de *Argemone mexicana* L. “cardo santo” se realizó un corte en la base del fruto verde y la flor, con la micropipeta se aspiró el látex para trasladarlos a los tubos eppendorf estériles de 2 mL.

3.3.4 Tamizaje fitoquímico del látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo” y *Taraxacum officinale* “diente de león”.

Se realizó una marcha fitoquímica cualitativa a los látex obtenidos de las plantas medicinales en estudio, para determinar la presencia de los diferentes metabolitos secundarios, que se fundamentan en los cambios estructurales ocasionados en los metabolitos presentes, como aparición o desaparición de una coloración, formación o dilución de un precipitado o desprendimiento de gas. Las reacciones de identificación, se realizó siguiendo la metodología propuesta por Lock⁴³ y Miranda.⁴⁴

3.4. Extracción de ADN genómico de linfocitos humanos:

A partir de esta etapa, el estudio se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática; contando con seis unidades de bolsa colectora de sangre “cuádruple” fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos, para el desecho, se consiguió en donación del Banco de Sangre del Hospital Regional de Ayacucho “Miguel Ángel Mariscal Llerena”, para la obtención del ADN de linfocitos con el siguiente protocolo descrito por Miranda.⁴⁵

1. Se transfirió 1 mL de sangre (paquete globular) a un tubo de centrifuga con tapa rosca y se adicionó 9 mL del tampón Tris- HCL 50 mM (pH 7,7) precalentado a 37 °C.
2. Se homogenizó e incubó a 37 °C por 30 minutos, se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos para sedimentar los linfocitos.
3. Se descartó el sobrenadante aspirándolo con una pipeta Pasteur, dejando 1 mL del centrifugado en la parte inferior del tubo.
4. Se repitió tres veces, los procedimientos 2 y 3 (esta vez con 7mL de tampón Tris – HCl 50 mM (pH 7,7), hasta tener un preparado claro.
5. Se adicionó a 1 mL de lo centrifugado, 9 mL de solución salina (NaCl al 0,85%) se homogenizó y centrifugó a 2500 rpm/ 10 minutos.
6. Se aspiró y descartó el sobrenadante dejando solo el sedimento, se resuspendió el paquete celular en 0,5 mL de la solución “high TE” (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 100 mM), luego se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL.
7. Se adicionó 0,5mL de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 40 mM; SDS al 1%; NaCl 10 mM). Precalentada a 50 °C.
8. Se agregó 10 µL de la solución de proteinasa K (20 mg/mL) y se incubó por una hora a 53 °C.
9. Luego se adicionó 750 µL de la solución cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1) y homogenizó por inversión, delicadamente durante 10 minutos.
10. Se centrifugó en la microcentrifuga durante 10 minutos a 14000 rpm para separar las fases, luego se aspiró la fase superior acuosa que contiene el DNA y transfirió a un tubo nuevo de microcentrifuga de 2 mL.
11. A la fase acuosa, se adicionó 750 µL de la solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y homogenizó por inversión durante 5 minutos. Nuevamente se centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm, se aspiró la fase acuosa que contiene el DNA y transfirió a un tubo nuevo de microcentrifuga de 2 mL.
12. Repetir el procedimiento 11 hasta obtener una fase acuosa completamente clara.
13. Se adicionó la solución de acetato de sodio 3M, pH 5,2. en cantidad de 1/10 del volumen de la fase acuosa.
14. Se agregó 500 µL de alcohol isopropílico helado y se dejó en reposo por 1 día en hielo. Luego se centrifugó por 15 minutos a 14000 rpm.
15. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y enjuagó el sedimento con 1 mL de etanol al 70%.

16. Se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 14000 rpm. Eliminando el alcohol y dejando secar el sedimento a temperatura ambiente.
17. Se resuspendió el sedimento con 40 μ L de la solución "low TE" (Tris HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) y se guardó en la nevera.

3.5. Cuantificación de ADN genómico de linfocitos humano por espectrofotometría

Procedimiento:

1. Se homogenizó lentamente las muestras de ADN, por diez veces, con la ayuda de una micropipeta de 100 μ L.
2. Se preparó el espectrofotómetro UV marca EppendorfBioPhotometer plus, con la opción de cuantificación de ADN.
3. Para limpiar la superficie de muestra del adaptador donde se colocó la muestra, se depositó 10 μ L de agua bidestilada estéril, luego de un minuto, se retiró el agua utilizando papel "tissue", para una mejor limpieza se repitió este paso.
4. Nuevamente se depositó 10 μ L de agua bidestilada estéril sobre la superficie del adaptador, se colocó la tapa de factor 50 – Lp 0,2 mm y se presionó la opción BLANK (blanco) para calibrar y obtener "cero de Absorbancia" (0,000 A°).
5. Se absorbió el agua utilizando papel "tissue", luego se depositó 5 μ L de la muestra de ADN, se colocó la tapa 50– Lp 0,2 mm y presionó la opción SAMPLE para ver el resultado de la cuantificación y pureza de ADN en la pantalla del equipo; luego se absorbió la muestra con papel "tissue".
6. Se repitió los pasos 4 y 5 para la cuantificación de cada muestra de ADN.
7. Terminada la cuantificación de ADN, se depositó 10 μ L de agua bidestilada estéril, sobre la superficie del adaptador, luego de un minuto se secó con papel "tissue" y apagó el equipo.

3.6 Ensayos de la genotoxicidad *in vitro*.

Se desarrolló con la siguiente metodología, propuesto por Miranda⁴⁵, con las siguientes fases:

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

El ADN genómico de linfocitos humano obtenido, fue cuantificado por espectrofotometría UV en EppendorfBioPhotometer plus; luego se preparó un

stock de ADN a concentración de 1 500 ng/ μ L en volumen final de 150 μ L, para cada planta medicinal en estudio.

3.6.2 Fase II: Prueba de genotoxicidad “*in vitro*” de ADN genómico de linfocitos humano

Se preparó las soluciones del látex de cada planta medicinal, a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, con agua bidestilada estéril.

Se acondicionó las soluciones para el ensayo 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 látex de plantas medicinales de uso dérmico *Argemone mexicana* L. “cardo santo” y *Taraxacum officinale* “diente de león” sobre ADN genómico humano.⁴⁵

Condiciones		Mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>					
Nº de tubo		1	2	3	4	5	6
Stock de ADN (1 500 ng/ μ L)		14	14	14	14	-	14
Volumen en μ L							
Látex	Concentración (%)	10	25	50	100	100	-
	Volumen (μ L)	0,75	1,5	3	6	6	-
Agua bidestilada estéril		5,25	4,5	3	-	14	6
Volumen total (μ L)		20	20	20	20	20	20
Incubación en baño María a 37°C		1 hora					

Se realizó cuatro repeticiones de las pruebas de genotoxicidad *in vitro*, del látex *Argemone mexicana* L. “cardo santo” y *Taraxacum officinale* “diente de león”.

3.6.3 Fase III: Electroforesis para la detección de genotoxicidad.

Se preparó el gel de agarosa al 1,5% y se dispuso de una cámara de electroforesis Biometra.

Para el volumen de carga en gel de agarosa, se utilizó las siguientes cantidades: 1 μ L de loading (colorante señalizador de migración de las bandas), 7 μ L de la solución para la prueba de genotoxicidad “*in vitro*” y 2 μ L de agua bidestilada estéril, volumen final 10 μ L; se mezcló y se cargó en el respectivo pozo del gel de

agarosa para electroforesis, se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se programó a 40 voltios (V) por tres horas.

3.6.4 Fase IV: Radiación UV para la visualización de genotoxicidad.

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

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

La escala de los valores numéricos correspondientes a los niveles de fragmentación del ADN como producto de la genotoxicidad, visualizados en el registro fotográfico, fueron basados en la clasificación del “*ensayo cometa*” propuesto por Speit (1995) y Collins (2004), en tesis de Larrea Poma.⁴⁶

Tabla 2. Valoración numérica de la genotoxicidad según la 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%

Fuente: Larrea, M.⁴⁶

3.7 Análisis de datos

Los datos fueron agrupados y presentados en tablas, expresados en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. Para evaluar el daño genotóxico 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.⁴⁷

IV. RESULTADOS

Tabla 3. Tamizaje fitoquímico para la identificación de los metabolitos secundarios presentes en el látex de *Argemone mexicana L.* “cardo santo”. Ayacucho 2017.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Mayer	+++	Precipitado blanco
Alcaloides	Dragendorff	+++	Precipitado rojo
Alcaloides	Wagner	+++	Precipitado rojo
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	+	Coloración amarilla
Fenoles y taninos	FeCl ₃	+++	Coloración verde oscuro
Cardenólidos	Kedde	-	Coloración naranja

Leyenda:

- (-) : Ausencia
- (+) : Leve
- (++) : Moderado
- (+++): Abundante

Tabla 4. Tamizaje fitoquímico para la identificación de los metabolitos secundarios presentes en el látex de *Taraxacum officinale* “diente de león”. Ayacucho 2017.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Mayer	+	Coloración amarilla
Alcaloides	Dragendorff	-	Coloración blanca
Alcaloides	Wagner	-	Coloración roja
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	-	Coloración blanca
Fenoles y taninos	FeCl ₃	+++	Coloración rojo oscuro
Cardenólidos	Kedde	+	Coloración amarilla

Leyenda:

- (-) : Ausencia
- (+) : Leve
- (++) : Moderado
- (+++): Abundante

Tabla 5. Cuantificación mediante espectrofotometría ultra violeta de ADN genómico extraído de linfocito humano.

Muestra	Concentración ADN µg/mL	Pureza de ADN A260/A280
1	5306,4	2,06
2	2776,7	1,74
3	2620,7	1,69
4	1389,9	1,71
5	2672,3	1,96
6	1634,7	1,68

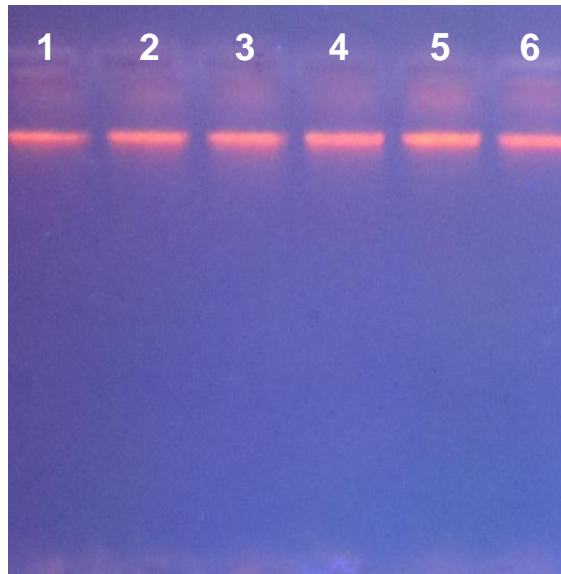


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % del ADN genómico humano obtenido de seis muestras de sangre y coloreado con bromuro de etidio al 1%.

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.

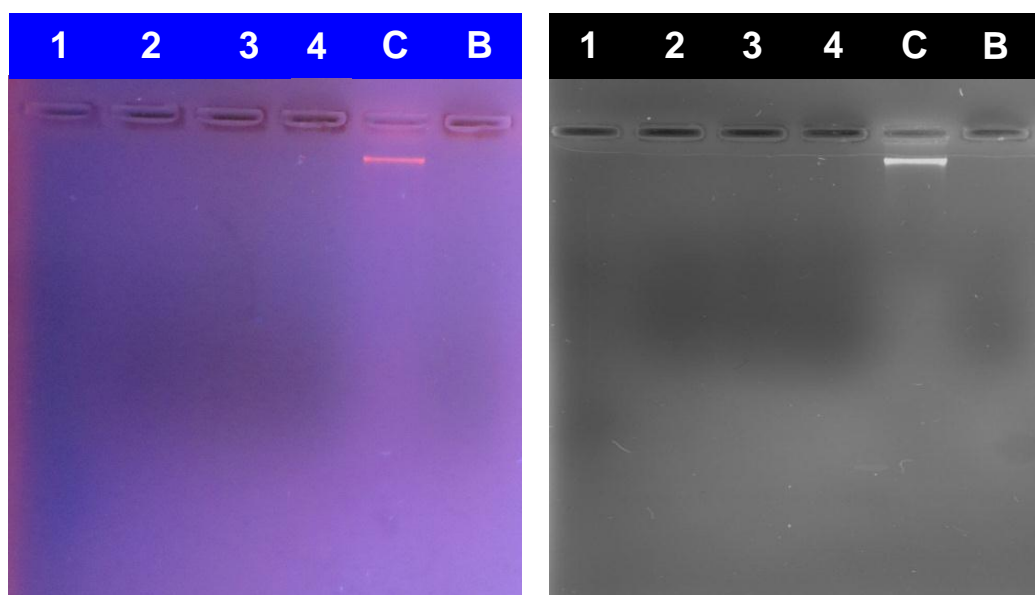


Figura 3. Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo” a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del primer ensayo.

Leyenda:

Carril Nº 1: Con 10%.

Carril Nº 2: Con 25%.

Carril Nº 3: Con 50%.

Carril Nº 4: Con 100%.

Carril C: Con 100% de ADN (control).

Carril B: Con 100% de látex (blanco).

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 20 minutos.

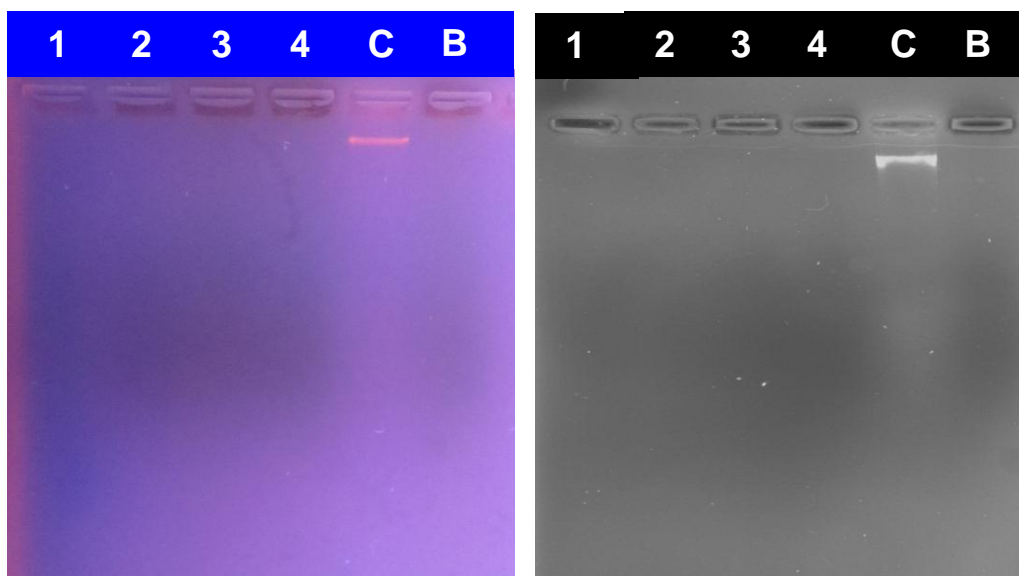


Figura 4. Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo” a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del segundo ensayo.

Leyenda:

Carril N° 1: Con 10%.

Carril N° 2: Con 25%.

Carril N° 3: Con 50%.

Carril N° 4: Con 100%.

Carril C: Con 100% de ADN (control).

Carril B: Con 100% de látex (blanco).

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 20 minutos.

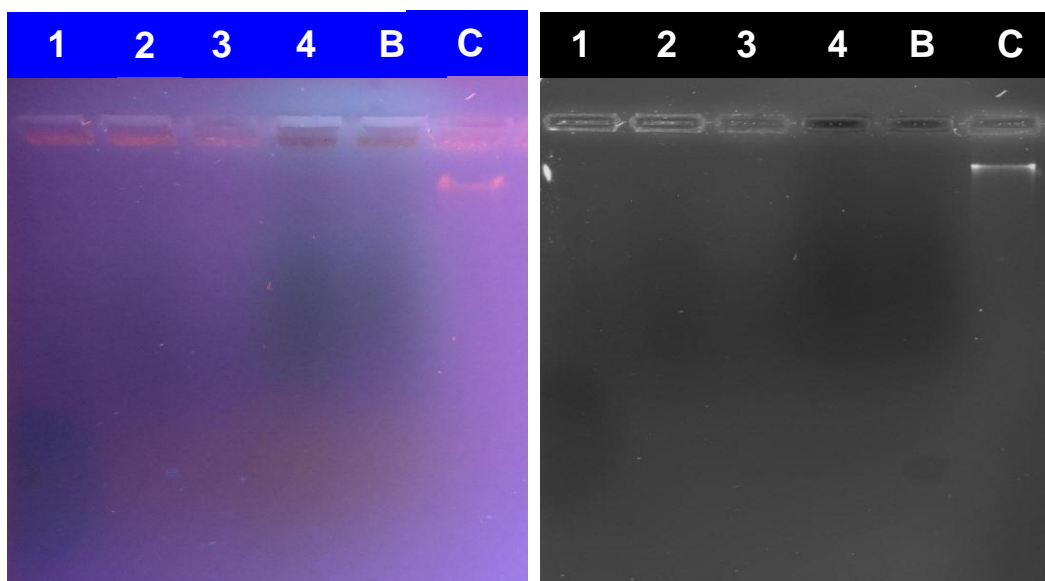


Figura 5. Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo” a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del tercer ensayo.

Leyenda:

Carril N° 1: Con 10%.

Carril N° 2: Con 25%.

Carril N° 3: Con 50%.

Carril N° 4: Con 100%.

Carril B: Con 100% de látex (blanco).

Carril C: Con 100% de ADN (control).

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 20 minutos.

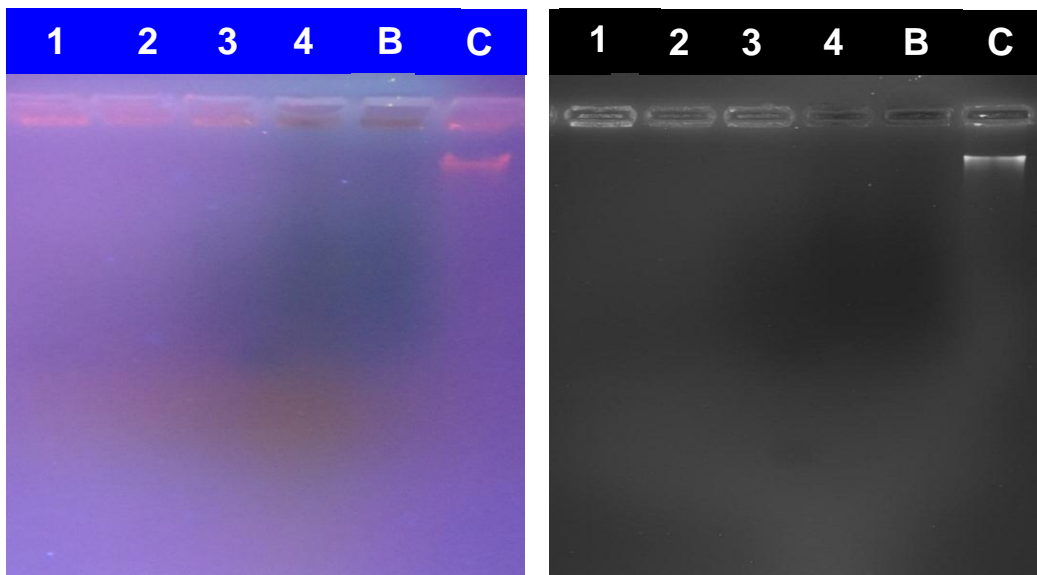


Figura 6. Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo” a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del cuarto ensayo.

Leyenda:

Carril N° 1: Con 10%.

Carril N° 2: Con 25%.

Carril N° 3: Con 50%.

Carril N° 4: Con 100%.

Carril B: Con 100% de látex (blanco).

Carril C: Con 100% de ADN (control).

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 20 minutos.

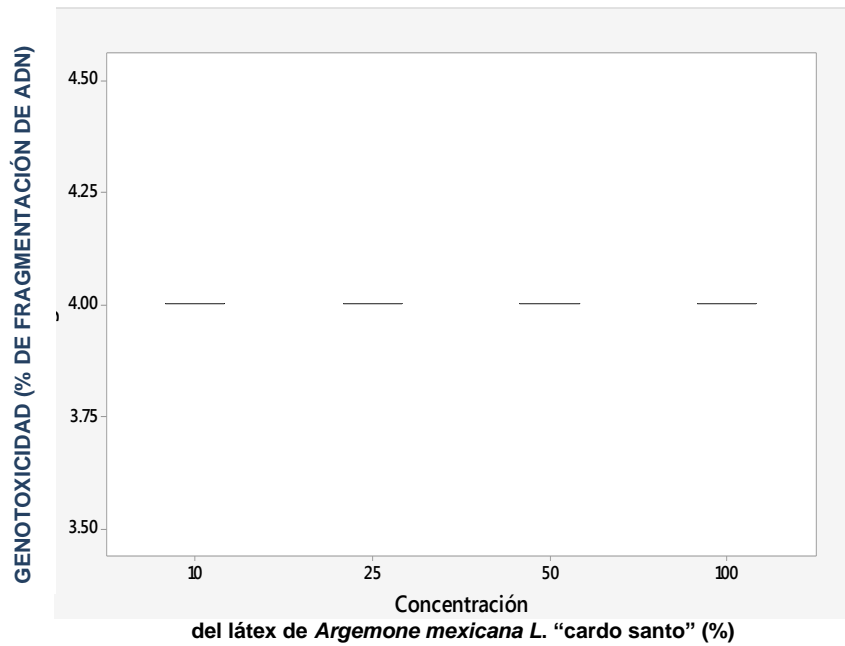


Figura 7. Prueba de Kruskal Wallis para evaluar el grado de genotoxicidad mediante fragmentación del ADN genómico de linfocito humano, por efecto del látex de *Argemone mexicana* L. "cardo santo" a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación a 37°C.

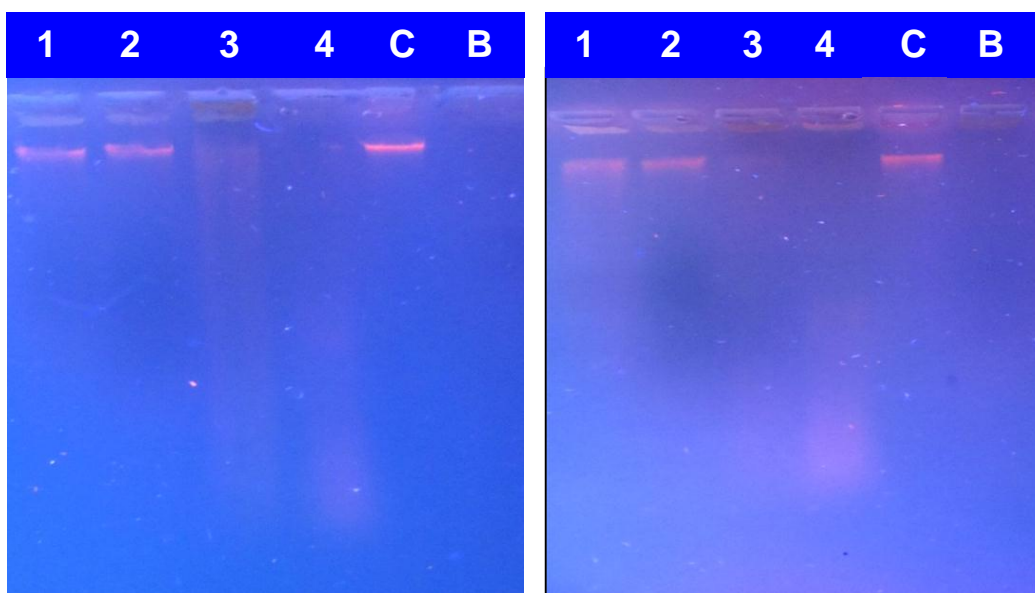


Figura 8. Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de *Taraxacum officinale* “diente de león” a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del primer ensayo.

Leyenda:

Carril N° 1: Con 10%.

Carril N° 2: Con 25%.

Carril N° 3: Con 50%.

Carril N° 4: Con 100%.

Carril C: Con 100% de ADN (control).

Carril B: Con 100% de látex (blanco).

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 20 minutos.

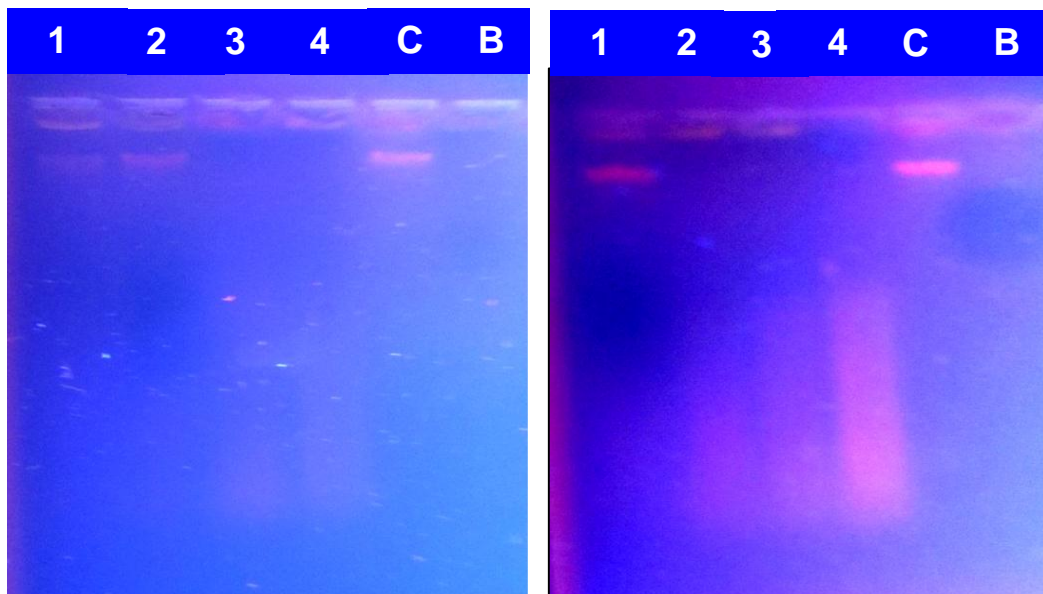


Figura 9. Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de *Taraxacum officinale* “diente de león” a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del segundo ensayo.

Leyenda:

Carril Nº 1: Con 10%.

Carril Nº 2: Con 25%.

Carril Nº 3: Con 50%.

Carril Nº 4: Con 100%.

Carril C: Con 100% de ADN (control).

Carril B: Con 100% de látex (blanco).

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 20 minutos.

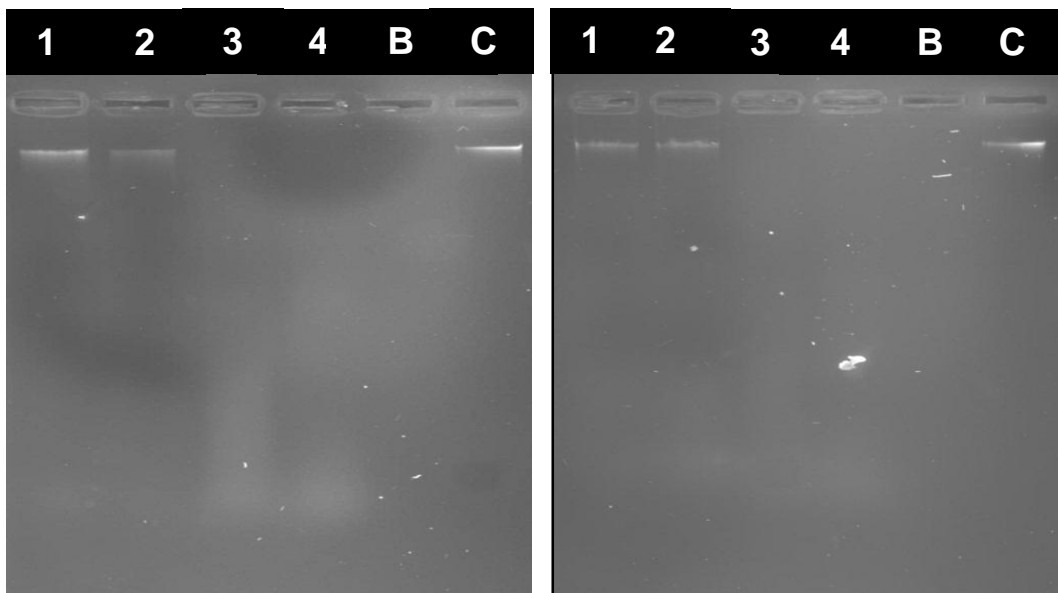


Figura 10. Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de *Taraxacum officinale* “diente de león” a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del tercer ensayo.

Leyenda:

Carril Nº 1: Con 10%.

Carril Nº 2: Con 25%.

Carril Nº 3: Con 50%.

Carril Nº 4: Con 100%.

Carril B: Con 100% de látex (blanco).

Carril C: Con 100% de ADN (control).

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 20 minutos.

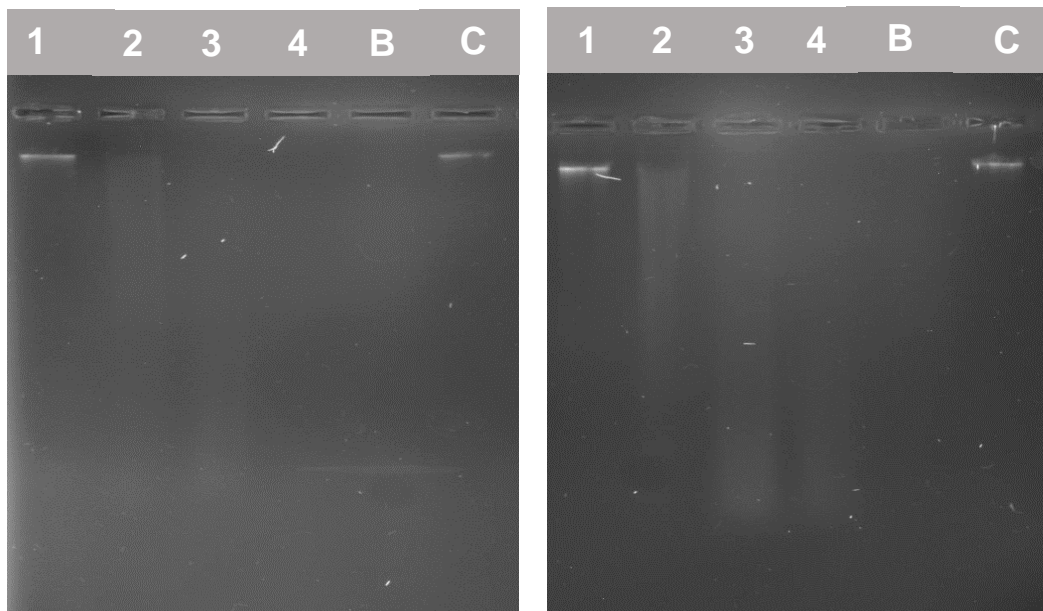


Figura 11. Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de *Taraxacum officinale* “diente de león” a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del cuarto ensayo.

Leyenda:

Carril N° 1: Con 10%.

Carril N° 2: Con 25%.

Carril N° 3: Con 50%.

Carril N° 4: Con 100%.

Carril B: Con 100% de látex (blanco).

Carril C: Con 100% de ADN (control).

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 20 minutos.

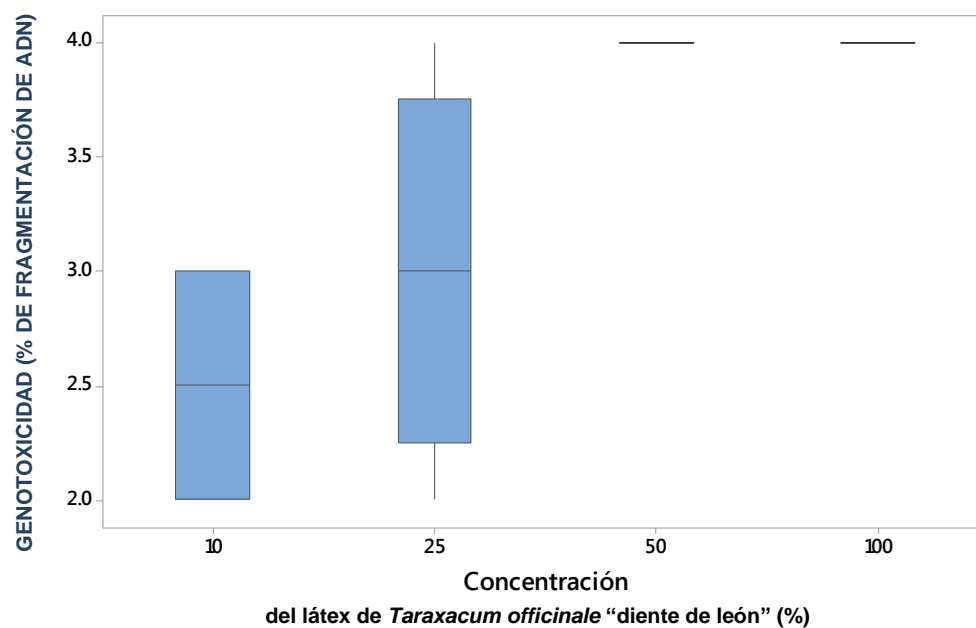


Figura 12. Prueba de Kruskal Wallis para evaluar el grado de genotoxicidad mediante fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, por efecto del látex de *Taraxacum officinale* “diente de león” a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación a 37°C.

V. DISCUSIÓN

La tabla 3, muestra los resultados de la identificación fitoquímica de los metabolitos secundarios presentes en el átex de *Argemone mexicana L.* "cardo santo", se evidenció la posible presencia de alcaloides, lo que es muy común en la familia de las papaveráceas, también se encontraron resultados positivos para fenoles y taninos, seguidos de lactonas y/o cumarinas en concentración leves.

Estos resultados coinciden con lo descrito por Quispe y Díaz ^{24,25}, que entre los alcaloides identificados en *Argemone mexicana L.* "cardo santo", las mismas que son utilizadas como controladores en diversas actividades se encuentran: allocriptopina, argemonina, berberina, cheleritrina, codeína, coptisina, dihidrocheleritrina, morfina, norargemonina, protopina, romneina y sanginarina, de los cuales berberina y protopina reportan ser mayoritarios. Estructuralmente ellos pertenecen al tipo de alcaloides isoquinolínicos los que aproximadamente se han dividido en veinte grupos o categorías. Distintos estudios indican que *Argemone mexicana* también presentan aminoácidos, compuestos fenólicos y ácidos grasos como ácido mirístico, palmítico, oleico, linoleico, etc.

Los ensayos fitoquímicos aplicados al látex de *Taraxacum officinale* "diente de león" se muestra en la tabla 4, identificándose los metabolitos secundarios como fenoles y taninos en abundante cantidad, mientras que los alcaloides y cardenólidos se encuentran en cantidad leve.

Nuestros resultados son corroborados por el reporte de Gonzales ²⁹ donde indica que contiene lactonas sesquiterpénicas, que son los principios amargos (taraxacina, taraxacerina, o lactucopicrina) responsables de su sabor (principalmente del tipo de los eudesmanólidos y germacranólidos), característico de las asteráceas, también contiene compuestos fenólicos simples del grupo de los fenilpropanoides, como los ácidos trans-cinámico y *p*-cumárico, y sus derivados; compuestos fenólicos complejos como luteolóxido y cosmosiósido. En

la raíz del diente de león se encuentra la inulina, un carbohidrato de almacenamiento natural presente principalmente en asteráceas, que alcanza en otoño hasta un 40% del contenido total de la raíz, también se encuentran formando parte de su composición varias cumarinas, flavonoides, vitaminas B y C.

La cuantificación mediante espectrofotometría ultra violeta de seis muestras de ADN genómico extraído de linfocito humano, se reporta en la tabla 5, las concentraciones va desde 1634,7 $\mu\text{g/mL}$ hasta 5306,4 $\mu\text{g/mL}$ y todas ellas se encuentran dentro del nivel de pureza aceptable (1,8 a 2,0), excepto la muestra N° 2 que tiene 1,74, la misma que no garantiza que los ensayos que realizamos no pueda encontrar interferencias por otros compuestos y que solo esté ADN.

El ADN genómico humano obtenido de seis muestras de sangre se presenta en la figura 2, es el registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1% y coloreado con bromuro de etidio al 1%, que se intercala entre los nucleótidos del ADN y emite la característica coloración grosella por efecto de la luz ultravioleta, cuya intensidad va en relación directa a la concentración del ADN. Estas intensidades del color grosella guardan relación con la lectura de las concentraciones de ADN, realizadas por espectrofotometría UV y mostradas en la tabla 5.

La figura 3, es el registro fotográfico que corresponde a la electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo” a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100 %, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a concentración de 1500 $\text{ng}/\mu\text{L}$, durante una hora de incubación a 37 °C, del primer ensayo realizado. Los carriles 1, 2, 3, y 4 corresponde al tratamiento con las concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100 % de látex, respectivamente, se observa que en todos ellos el ADN ha sido degradado en su totalidad, comparándolos con el ADN “control” que se encuentra en el carril C; el carril B corresponde al “blanco” que es el látex al 100%, así mismo nos revela que el látex está exento de ADN.

Estos resultados se ratifican en el segundo, tercer y cuarto ensayo, mostrados en los registros fotográficos de las figuras 4, 5 y 6, con la indicación que en la figura 4 el “control” se encuentra en el carril C y el “blanco” en el carril B; en las figuras 5 y 6, el “blanco” se encuentra en el carril B y el control en el carril C, debido a la posición de los tubos al momento de realizar los ensayos de genotoxicidad.

Se han reportado ya varios trabajos realizados en plantas medicinales que presentan actividad genotóxica como lo descrito por Brugés y col., (2007) con la

evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. donde los extractos etanólicos presentaron una importante actividad genotóxica sobre los linfocitos en el ensayo Cometa, siendo el extracto etanólico de raíces el que presenta mayor genotoxicidad (CL50 35 ppm). Es importante señalar que el extracto acuoso de hojas presenta una baja genotoxicidad (CL50 900 ppm), lo cual es relevante si se toma en consideración que es la parte de la planta tradicionalmente utilizada por las comunidades indígenas ubicadas en la Sierra Nevada de Santa Marta. En el caso de nuestro estudio con *Argemone mexicana* L. “cardo santo”, es el látex que nos demuestra un efecto altamente genotóxico, capaz de fragmentar totalmente el ADN genómico humano, desde 10% de concentración a la que realizamos los ensayos.

Por otro lado también hay reporte de estudios de plantas medicinales que no presentan actividad genotóxica como lo realizado por Vizoso *et al* (2005) en su investigación de la genotoxicidad *in vitro* del extracto fluido de *Cassia grandis* L. y el gel de *Aloe vera* L., se llevó a cabo un estudio toxicogenético empleando dos sistemas de ensayo a corto plazo uno *in vitro* y otro *in vivo* con el modelo *Aspergillus nidulans* D-30 que detecta daño primario al ADN y el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón el cual determina daño clastogénico y aneugénico. En el ensayo *in vitro* con el hongo *Aspergillus nidulans* D-30 (segregación mitótica) evaluaron con concentraciones del extracto fluido de *Cassia grandis* L., desde 0,067 a 1,675 mg de sólidos totales/mL y para el gel de *Aloe vera* L., concentraciones de 0,09 a 1,00 mg de sólidos totales/mL. En la prueba *in vivo* de inducción de micronúcleos se ensayaron para la *Cassia grandis* L. y para el gel de *Aloe vera* L., dosis de 500, 1000 y 2000 mg/kg de peso corporal (pc). En ambas baterías de ensayos genotóxicos ninguno de los 2 fitofármacos mostraron ni daño celular ni actividad genotóxica.

La figura 7, es una gráfica de la prueba de Kruskal Wallis, que nos permitió evaluar el grado de genotoxicidad mediante fragmentación del ADN genómico humano, por efecto del látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo” a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación a 37°C; nos muestra que todas las concentraciones presentan resultados iguales, con fragmentación del ADN en 100%, por tanto no hay diferencia de actividad genotóxica sobre el ADN genómico humano según las concentraciones del látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo”.

Nuestros resultados que demuestran una alta genotoxicidad del látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo”, serían parte importante de fundamentar las

propiedades curativas de afecciones cutáneas como acné, verrugas, úlceras, así como que el extracto en agua caliente de la planta es utilizado como insecticida efectivo contra diversas plagas como "gusano cogollero del maíz", orugas y otros insectos. Al mismo tiempo advertir a la población que el uso del látex para curar la tos, tos convulsiva, asma, laxante, sudorífico, malestares hepáticos, cálculos renales, dolor de muelas, oftalmías, purgante, etc. Que es mediante ingesta, requiere de mucho cuidado, puesto que podría causar efectos dañinos al organismo, este caso obviamente amerita realizar otros estudios.

El registro fotográfico de la figura 8, muestra la electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de *Taraxacum officinale* "diente de león" a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del primer ensayo. Los carriles 1 y 2 de 10% y 25%, han fragmentado entre 40 a 95% del ADN; mientras que el 3 y 4 nos revelan la fragmentación total del ADN, que corresponde a las concentraciones de 50% y 100% de látex de "diente de león".

El segundo ensayo mostrado en la figura 9, presenta a los carriles 1 y 2 de 10% y 25% una fragmentación entre el 20% y 40% del ADN, un tanto menor de actividad que el primer ensayo; mientras que los carriles 3 y 4 con 50% y 100% de látex, siempre muestran una fragmentación total del ADN. La figura 10 del tercer ensayo revela los resultados similares al primer ensayo con fragmentación de ADN entre 40% a 95% a concentraciones de 10% y 25% de látex. En la figura 11, las concentraciones de 10%, muestra una fragmentación de 20% a 40% del ADN, pero el de 25% muestra una fragmentación total del ADN, al igual que el de 50% y 100% del látex en los carriles 2, 3 y 4 respectivamente.

Nuestros resultados concuerdan con los reportado por Zafar y col., (2014) donde evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos (metanol, cloroformo y agua destilada) de *Taraxacum officinale*. El extracto de metanol y cloroformo mostró ser eficaz contra todos los patógenos bacterianos ensayados *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*, mientras que los extractos en agua destilada no mostraron ninguna actividad. La concentración mínima inhibitoria (MIC), de los extractos contra estas cepas bacterianas estaba en el rango de 0,30 mg / ml. Los diferentes resultados del análisis fitoquímico indica la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, taninos y flavonoides que pueden ser responsables del ensayo antibacteriano.

La gráfica 12 corresponde a la prueba de Kruskal Wallis de la actividad genotóxica del látex de *Taraxacum officinale* “diente de león”, que nos permitió evaluar el grado de genotoxicidad mediante la fragmentación del ADN genómico humano, a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación a 37°C; nos muestra que las concentraciones de 50% y 100% de látex presentan fragmentación del ADN en 100%, mientras que de 10% y 25%, manifiestan fragmentar el ADN genómico humano entre 40% a 95%. El valor determinado de $p=0.027$ es menor que $p=0.05$, por tanto se rechaza la H_0 nula, y se acepta la H_1 , que al menos una concentración del látex muestra diferente actividad. Por tanto, la concentración del látex de *Taraxacum officinale* “diente de león”, si tiene efecto en la actividad genotóxica sobre el ADN genómico humano.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, estaría demostrando en parte el principio curativo de *Taraxacum officinale* “diente de león”, que por su acción depurativa se utiliza en el tratamiento de fondo de enfermedades cutáneas: acné, eczemas, forunculosis, herpes, psoriasis, etc. Está especialmente indicado en todas las dermatosis de etiología relacionada con secreción biliar defectuosa.

Así mismo explicar que el látex de la planta fresca *Taraxacum officinale* “diente de león”, puede producir dermatitis de contacto. El uso interno, debido a su contenido en sustancias amargas, puede causar molestias gástricas, con hiperacidez. Para evitarlo se recomienda asociar a drogas mucilaginosas, como el malvavisco y por nuestros resultados advertir a la población tener cuidado en el uso de esta planta en cualquiera de sus formas por ingestión.^{30,31}

VI. CONCLUSIONES

1. El látex de las plantas medicinales de uso dérmico *Argemone mexicana* L. "cardo santo" y *Taraxacum officinale* "diente de león" presentan una importante actividad genotóxica frente al ADN genómico humano.
2. Los metabolitos secundarios del látex de plantas medicinales de uso dérmico *Argemone mexicana* L. "cardo santo" y *Taraxacum officinale* "diente de león" fueron: alcaloides, compuestos fenólicos y taninos en abundante cantidad, mientras que en el látex de *Taraxacum officinale* "diente de león" los metabolitos secundarios identificados fueron: compuestos fenólicos y taninos en abundante cantidad y alcaloides en una cantidad leve.
3. El látex de *Argemone mexicana* L. "cardo santo" desde 10% al 100% de concentración, presenta un potente efecto genotóxico frente al ADN genómico humano, fragmentándolo en 100%; mientras que el látex de *Taraxacum officinale* "diente de león" muestra que las concentraciones de 50% y 100% de látex presentan fragmentación del ADN en 100%, y las de 10% y 25%, manifiestan fragmentar el ADN genómico humano entre 40% a 95%, siendo esta la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

VII. RECOMENDACIONES

1. Ampliar estudios de genotoxicidad con otras plantas medicinales de uso común en nuestra región, 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. Identificar que metabolitos secundarios del látex presentaron actividad genotóxica en este estudio.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brugés k, Reguero M. Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. Rev.Colomb.Biotecnol [revista en Internet]. 2007 [acceso 25 de agosto de 2016]; 9(3). Disponible en: <http://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/702>.
2. García Franco SN. Citotoxicidad y genotoxicidad de dos extractos naturales [Tesis doctoral]. Buenos Aires. 2003.
3. Salaverry O. La complejidad de lo simple: plantas medicinales y sociedad moderna. Rev Peru Med salud pública, 22(4): 245-46. Peru. 2005.
4. Carballo A, Cortada C, Gadano A. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. vol. 14 (2): 95-108, citogenética humana y genética toxicológica. Departamento de Bioquímica clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires- Argentina. 2005.
5. Medrano Padial C. Evaluación de la genotoxicidad de un compuesto del extracto de *proalliumap*® mediante el ensayo cometa con potencial uso en el envase alimentario. Sevilla. 2016.
6. Marks R, Motley R. Dermatología. 1º ed. México: El Manual Moderno. 2012.
7. García A, Ávila Y, Alonso L, López P, Ruiz A, Morón F, et al. Reacciones adversas reportadas por consumo de productos naturales en Cuba durante 2003 y 2007. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 14, 1-11.2009.
8. Miranda T, Valer G. Protocolos de Biología Molecular-Guía de práctica. Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2013.
9. Azuero A, Jaramillo C, San Martín Diana, D'Armas H. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. Revista Ciencia UNEMI. 2016; 9(12).
10. Motsei M, Lindsey K, Van Staden J, Jager A. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 235–241. (2003).
11. Rey A, García E, Fundora M. Principles and relevance of the comet assay. Revista Cubana de Investigaciones Biomédica. 2016; 11(1).
12. Angel Castañeda A. Evaluación de la actividad genotóxica de propóleos recolectados en diferentes apiarios de Cundinamarca y Boyacá. Colombia.2012.
13. Remigio AC, Pérez G, Fernández N, Bada AM, Arteaga ME, Mancebo A. Estudio genotóxico *in vivo* de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. Rev. Toxicol. 2001; 18(3).
14. Palacio Arpi MA. Actividad anti-genotóxica mediante ensayo cometa de la horchata expendida en los mercados de Loja.[tesis]. Ecuador.2016.
15. Vizoso Á, Ramos A. Estudio genotóxico *in vitro* e *in vivo* del extracto fluido de *Cassia grandis* L. y el gel de *Aloe vera* L. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM).Ciudad de La Habana. Cuba; 2005.
16. Gadano A, Gurni A, Carballo A. Screening genotóxico de hierbas medicinales utilizadas en la medicina tradicional argentina .Acta Toxicol. Argent. 2004; 12(1).
17. Juárez Flores GM. Evaluación de la posible actividad genotóxica de *alfa-asarona* en células gaméticas y somáticas de vegetales. [tesis]. México. 2003.
18. Chang Y-C, Chang F-R, Khalil A, Hsieh P-W, Wu Y-C. Cytotoxic Benzophenanthridine and Benzylisoquinoline Alkaloids from *Argemone Mexicana*. 2003; 521-526.

19. Brahmachari G, Gorai D, Roy R. *Argemone mexicana*: chemical and pharmacological aspects. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2013; 23(3): 559-575. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102695X13700711>.
20. Huamán F, Toscano EM, Acosta O, Rojas D, Inocente MA, Garrido DP, et al. Estudio genotóxico de una bebida experimental de *quinua*, *kiwicha* y *kañiwa*. *Revista peruana de biología*. 2014; 21(3).
21. Zafar S, Afzal M, Afzal A, Rahman I, Shad S, Ahmed B, et al. *In vitro* antibacterial study of *Taraxacum officinale* leaves extracts against different bacterial pathogenic strains. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2014; 3 (1).
22. Remigio A, Piloto J, García A, Guerra M, Sánchez E, Vega Y. Genotoxicidad de *Indigofera suffruticosa* Mil. (añil cimarrón). *Revista cubana de plantas medicinales*. 2007; 12(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962007000300002.
23. Aucasime L. Herbario Huamangensis de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2013.
24. Quispe Y. Efecto biocida de extractos de *Shinus molle* L. “molle” y *Argemone mexicana* L. “cardo santo” sobre “áfidos” en cultivos de *Brassica oleracea* L. “col”. Perú. 2005.
25. Diaz H. Actividad antiinflamatoria y antioxidante del extracto hidroalcohólico del látex de *Argemone mexicana* (“Cardo santo”). Perú. 2016.
26. Manjamalai A SStSR, Guruvayoorappan C, Berlin Grace VM. Analysis of phytochemical constituents and anti-microbial activity of some medicinal plants in Tamilnadu, India. *Global J Biotechnol Biochem* 2010; 5(2):120-8.
27. Serrano JG. Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Argemone Mexicana* L. para el estudio de la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. México. 2015.
28. Gimeno JM. *Medicina naturista diente de león*. 2000; 1: 20-23.
29. Font Q. *Plantas medicinales*. Editorial Labor S.A. Barcelona 1981.
30. Gonzales M. Efecto de extractos de *taraxacum officinale* sobre la adipogénesis y el metabolismo lipídico de células 3T3-L1. [Tesis doctoral]. Madrid. 2013.
31. Asqui MJ. Actividad hepatoprotectora del extracto de diente de león (*taraxacum officinale*) en ratas (*Rattus norvegicus*) con hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono. Ecuador. 2012.
32. Muñoz AM, Ramos F, Ortiz C, Catañeda B. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev. Soc. Quím.* 2007; 73(3). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2007000300003&script=sci_arttext&lng=pt.
33. Serna J, Vitales M, López M, Molina A. *Farmacia hospitalaria*. España 2002.
34. Peñaloza, JA. El acné. *Rev Fac Med UNAM*; 46(4). 2003.
35. Gómez G, Molina W. Dermatología (tratamiento del acné). *Revista médica de costa rica y Centroamérica* [revista en Internet]. 2012 pp 91-97. Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/600/art17.pdf>.
36. Hernandez J, Achell L, Jaimes V. Diagnóstico y tratamiento de verrugas vulgares. Gobierno Federal de México. 2010.
37. Repetto Jiménez M, Repetto Kuhn G. *Toxicología fundamental*. 4ª Edición. Madrid: Díaz de Santos; 2009.

38. Herrero O, De la peña E, García P, Pérez CC. Mutagénesis y Carcinogénesis Química, Edit Ilustre Colegio Oficial de Químicos. Sevilla. Rev. Experto Internacional en Toxicología. [Internet].2012; vol.13: p.978-84-695. Disponible en :
[Http://Digital.Csic.Es/Bitstream/10261/102537/1/Expertox2012.Pdf](http://Digital.Csic.Es/Bitstream/10261/102537/1/Expertox2012.Pdf)
39. Sánchez A, Fonseca G, Capiro N, Fernández D. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. Revista Cubana de Farmacia.2000;34,34-43 Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0034-75152000000100005
40. Vergara García AP. Estandarización del ensayo del cometa alcalino en células de sangre periférica. [Tesis]. Bogotá.2010.
41. Acevedo González JF. Búsqueda de las estructuras triplex del adn formadas entre los pares de Watson y Crick y las bases canónicas. [Tesis]. Puebla. 2014.
42. Carranza Z. Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del estado de Hidalgo más componentes en medio de cultivo sólido. [Tesis]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias. Tulancingo de Bravo Hgo. 2006.
43. Lock O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2da Edición. Fondo editorial; 1994.
44. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad De La Habana Instituto de Farmacia y Alimentos. Cuba. 2000.
45. Miranda T, Valer G. Protocolos de Biología Molecular – Guía de Práctica. Edit. Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2013.
46. Larrea Poma M. evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay [tesis].la Paz. Universidad Mayor de San Andrés. 2007.
47. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. 5^{ta} edición. Perú: Editorial Mc Graw Hill. 2010.

ANEXOS

Anexo 1

Certificado de identificación taxonómica de *Argemone mexicana* L. "cardo santo".



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. Mary Elizabett, MONTES ENCISO** ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	MAGNOLLIDAE
ORDEN	:	PAPAVERALES
FAMILIA	:	PAPAVERACEAE
GENERO	:	Argemone
ESPECIE	:	<i>Argemone mexicana</i> L .
N.V.	:	"cardo santo"

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

Ayacucho, 10 de Setiembre del 2015

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

Biga. Laura Aucasime Medina
JEFE

Anexo 2

Certificado de identificación taxonómica de *Taraxacum officinale* Wiggers. “diente de león”



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. Mary Elizabett, MONTES ENCISO** ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	ASTERALES
FAMILIA	:	ASTERACEAE
GENERO	:	Taraxacum
ESPECIE	:	<i>Taraxacum officinale</i> Wiggers.
N.V.	:	“diente de león”, “amargón”

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

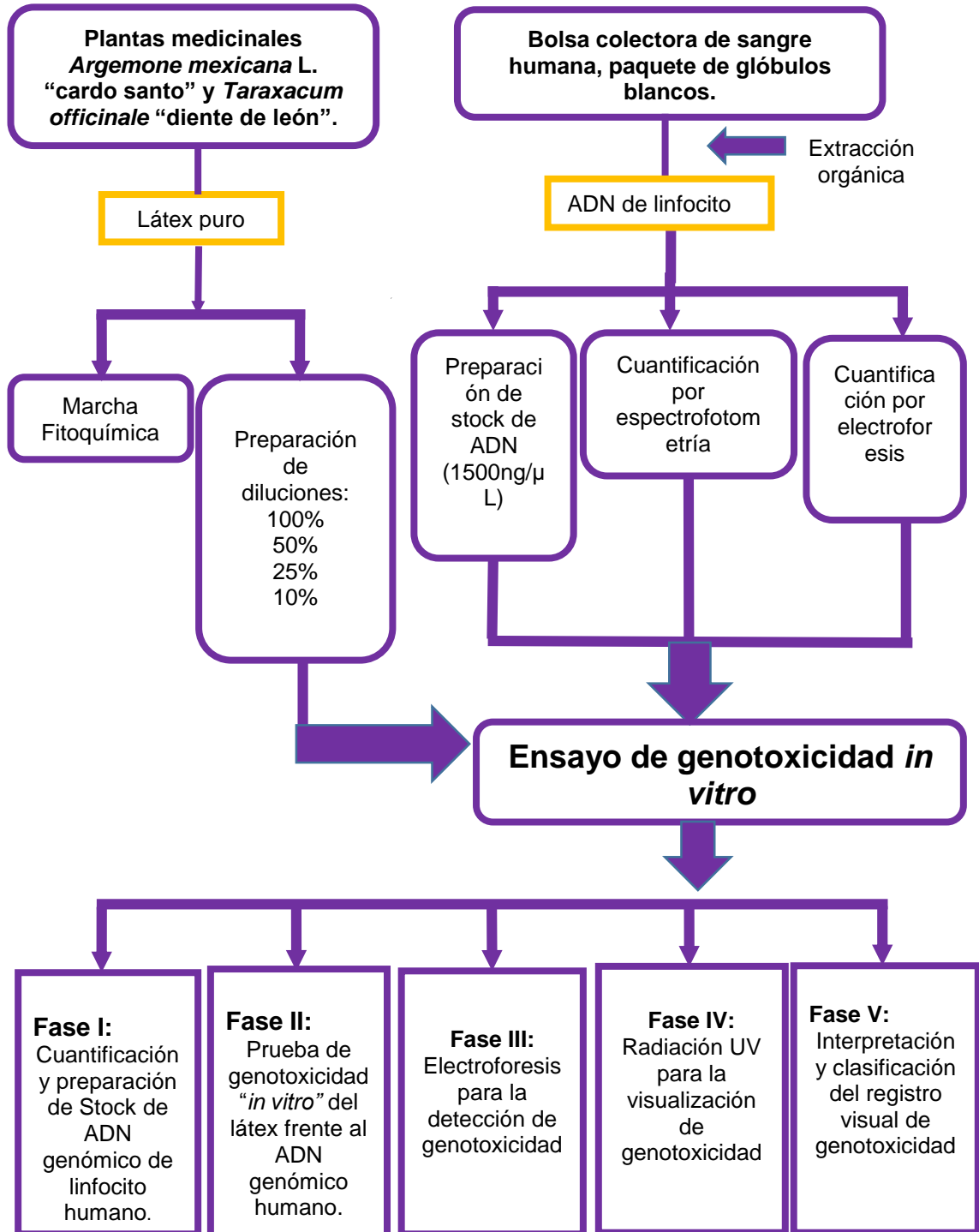
Ayacucho, 10 de Setiembre del 2015

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

Btga. Laura Aucasime Medina
JEFE

Anexo 3

Flujograma para el procedimiento de genotoxicidad a partir del látex obtenido.



Anexo 4

Tabla 6. Valores numéricos del grado de genotoxicidad de *Argemone mexicana* L. “cardo santo”, a las concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100% del látex, frente a ADN genómico humano, incubado a 37°C durante una hora. Ayacucho, 2017.

Condiciones de la incubación		<i>Argemone mexicana</i> L “cardo santo” Látex			
Temperatura °C	Tiempo Hora	Concentración en %			
		10	25	50	100
37	1	4	4	4	4
		4	4	4	4
		4	4	4	4
		4	4	4	4
		4	4	4	4

Anexo 5

Tabla 7. Valores numéricos del grado de genotoxicidad de *Taraxacum officinale*. “diente de león”, a las concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100% del látex, frente a ADN genómico humano, incubado a 37°C durante una hora. Ayacucho, 2017.

Condiciones de la incubación		<i>Taraxacum officinale</i> “diente de león”			
		Látex			
Temperatura °C	Tiempo Hora	Concentración en %			
		10	25	50	100
37	1	3	3	4	4
		2	2	4	4
		3	3	4	4
		2	4	4	4
		2	4	4	4

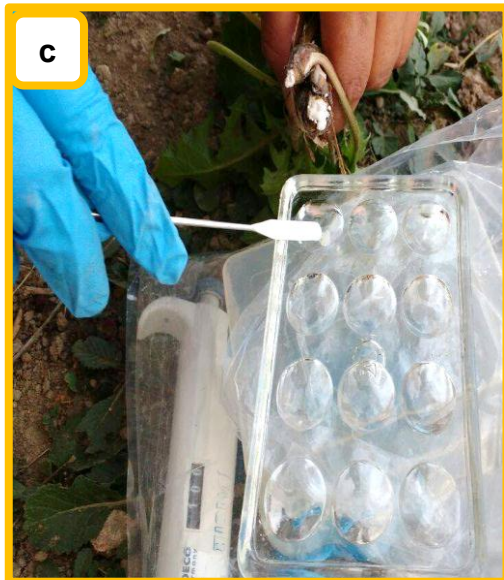
Anexo 6

Fotografía de la recolección del látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo”
a). Identificación de la planta en estudio; **b).** corte en la parte basal del fruto y la flor; **c).** Látex de color amarillo de *Argemone mexicana* L; **d).** recolección del látex en el tubo de eppendorf con la ayuda de una micropipeta.



Anexo 7

Fotografía de la recolección del látex de *Taraxacum officinale* “diente de león” para el tamizaje fitoquímico. **a).** identificación de la planta en estudio; **b).** corte en la parte basal del tallo; **c) y d)** látex de color lechoso de *taraxacum officinale* en la placa de tinción de vidrio.



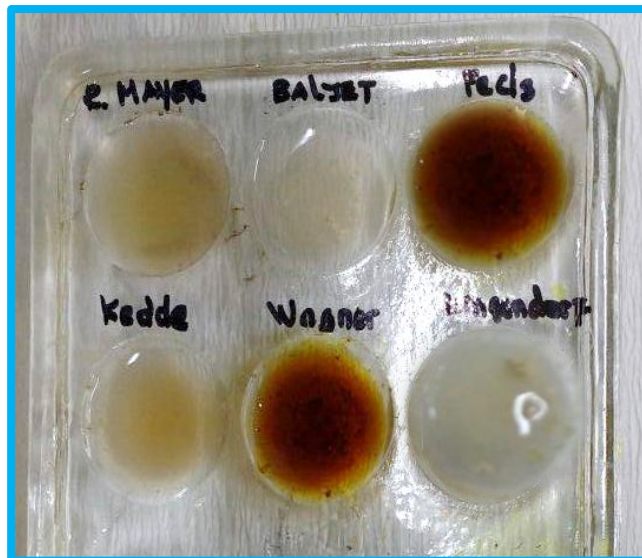
Anexo 8

Tamizaje fitoquímico obtenido del látex de *Argemone mexicana* L. "cardo santo"



Anexo 9

Tamizaje fitoquímico obtenido del látex de *Taraxacum officinale* "diente de león".

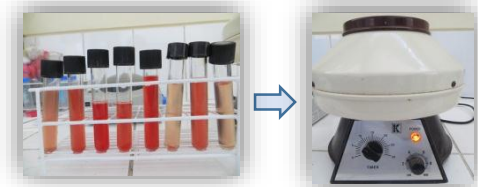


Anexo10

Protocolo de extracción de ADN genómico de linfocito humano.



Transferir 1 mL de sangre a un tubo con tapa rosca, agregar 9 mL de tris-HCl precalentado a 37°C.



Homogenizar e incubar a 37°C x 30' en Baño María, centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos.



Descartar el sobrenadante, dejar 1 mL de lo centrifugado, agregar 9 mL tris-HCl. Homogenizar e incubar a 37°C por 30 minutos luego centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos. Repetir 2 veces este procedimiento hasta obtener un preparado claro.



Agregar a 1 mL de centrifugado 9 mL de NaCl 0.85%, centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos.



Aspirar y descartar el sobrenadante, dejar sedimento y resuspender con 0.5 mL de Sol. High TE.

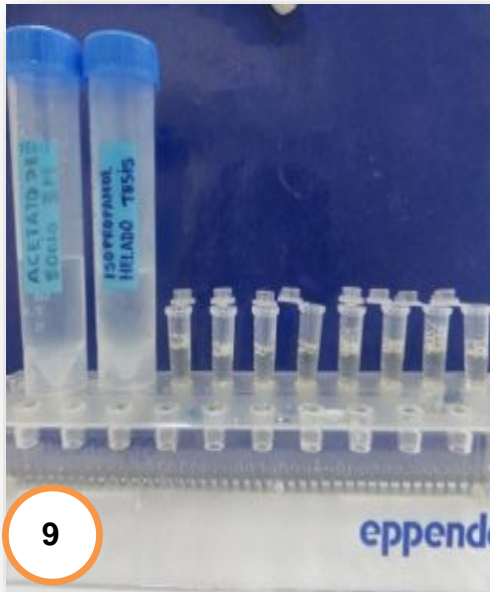


Transferir a otro tubo y agregar 0.5 mL de Sol. lisis precalentado a 50°C. Agregar 10 μ L de proteinasa K (20mg/mL) e incubar por una hora a 53°C, luego adicionar 750 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Homogenizar y centrifugar a 14000 rpm x 10'.



Aspirar la fase superior acuosa y trasvasar a otro tubo, agregar 750 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y centrifugar por 10 minutos.





9

Agregar acetato de sodio 3M 20 μ L, 500 μ L de alcohol isopropilico helado, dejar en reposo por una noche en la nevera, luego centrifugar



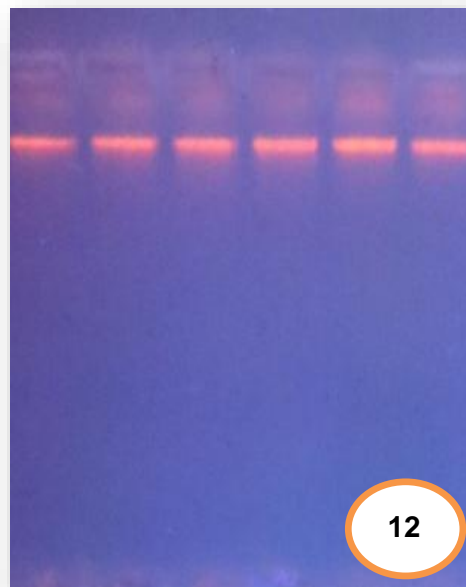
10

Eliminar cuidadosamente el sobrenadante y enjuagar el sedimento con 1 mL de etanol al 70%, centrifugar por 10 minutos.



11

Dejar secar a medio ambiente y finalmente resuspender con low TE" y guardar a -20°C.



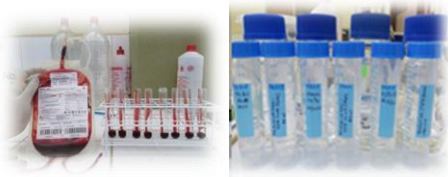
12

Bandas de ADN..

Anexo 11

Protocolo para la determinación del efecto genotóxico *in vitro* mediante electroforesis, propuesto por Miranda T.

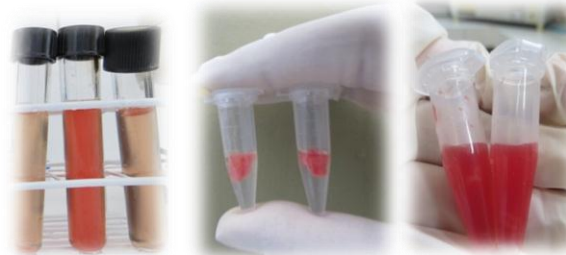
Preparación de reactivos para la extracción de ADN genómico de linfocito humano.



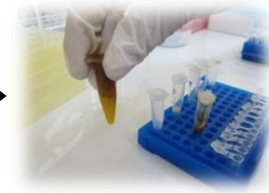
Sembrado en el gel de agarosa para electroforesis.



Extracción del ADN genómico de linfocito humano.

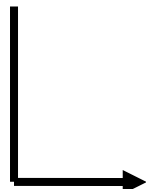


Después de resuspender el sedimento con low TE, guardar en la nevera.



Cuantificación del ADN genómico de linfocito humano.

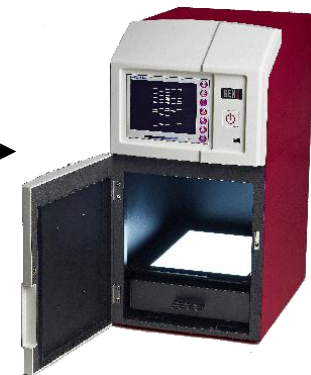
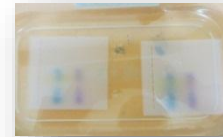
Preparación de las soluciones con látex para enfrentar al ADN genómico de linfocitos humanos para la prueba de genotoxicidad, incubar en Baño María a 37°C por una hora.



Sembrado en el gel de agarosa para electroforesis.



Luego de colorear en bromuro de etidio, se registró las imágenes en el Biometra UVsolo TS; luego con una cámara fotográfica.



Anexo 12. Matriz de consistencia

TÍTULO: Efecto genotóxico *in vitro* del látex de plantas medicinales de uso dérmico *Argemone mexicana* L. “cardo santo” y *Taraxacum officinale* “diente de león”. Ayacucho, 2017.

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Efecto genotóxico <i>in vitro</i> del látex de plantas medicinales de uso dérmico <i>Argemone mexicana</i> L “cardo santo” y <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león”. Ayacucho, 2017.	¿Tendrá efecto genotóxico <i>in vitro</i> el látex de plantas medicinales de uso dérmico <i>Argemone mexicana</i> L “cardo santo” y <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león” frente al ADN de linfocito humano?	<p>GENERAL</p> <ul style="list-style-type: none"> Determinar el efecto genotóxico <i>in vitro</i> del látex de plantas medicinales de uso dérmico <i>Argemone mexicana</i> L “cardo santo” y <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león”. <p>ESPECIFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> Identificar los metabolitos secundarios presentes en el látex de <i>Argemone mexicana</i> L “cardo santo” y <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león”. Caracterizar el efecto de la genotoxicidad del látex de las plantas medicinales de uso dérmico en estudio, mediante ensayos <i>in vitro</i> sobre el ADN genómico de linfocitos humano detectado mediante electroforesis. 	<p>Aspectos Botánicos</p> <p><i>Argemone mexicana</i> L “cardo santo” y <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león”.</p> <p>Clasificación taxonómica, Descripción Botánica, Composición Química, Actividades Biológicas.</p> <p>ADN</p> <p>Genotoxicidad</p> <p>Electroforesis.</p>	El látex de las plantas medicinales de uso dérmico <i>Argemone mexicana</i> L “cardo santo” y <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león”, presentan efecto genotóxico <i>in vitro</i> frente al ADN genómico de linfocitos humanos, detectado mediante electroforesis	<p>Variable Principal:</p> <ul style="list-style-type: none"> Plantas medicinales de uso dérmico <i>Argemone mexicana</i> L “cardo santo” y <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león”. <p>Indicador:</p> <ul style="list-style-type: none"> Concentración del látex en microlitros (%). <p>Variable secundaria:</p> <p>Efecto genotóxico <i>in vitro</i> de las plantas medicinales.</p> <p>Indicador:</p> <ul style="list-style-type: none"> ADN de linfocitos humanos. Fragmentación del Ácido desoxirribonucleico (ADN). 	<p>Tipo de investigación :</p> <p>Básica – experimental.</p> <p>Nivel de investigación:</p> <p>Básico</p> <p>Población:</p> <p><i>Argemone mexicana</i> L “cardo santo” y <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león”, que crece en los diferentes pisos ecológicos de la ciudad de Ayacucho</p> <p>Muestra:</p> <ul style="list-style-type: none"> 500 µL del látex de <i>Argemone mexicana</i> L “cardo santo” y <i>Taraxacum officinale</i> “diente de león”. <p>Unidad experimental:</p> <ul style="list-style-type: none"> ADN de linfocitos humano a 1500 ng/µL por ensayo. <p>Análisis estadístico</p> <p>Los datos fueron analizados utilizando paquete estadístico SPSS versión 23, empleando la prueba de Kruskal-Wallis</p>