

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Toxicidad aguda y genotoxicidad del extracto
hidroalcohólico de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don
"huamanpinta". 2017.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA

Presentado por la:

Bach. AQUINO ENCISO, Lucy Leonor

Ayacucho-Perú

2018

A Dios, mis padres y hermanos, por
su aliento permanente.

AGRADECIMIENTO

A mi *Alma Mater*, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y a la Facultad de Ciencias de la Salud y en especial a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, así mismo a los excelentes docentes que en ella laboran, quienes contribuyeron en mi formación profesional.

Al Dr. Q.F. Edwin Carlos Enciso Roca, por su asesoría y dedicación, por permitirme recurrir a su capacidad y experiencia que hizo posible ejecutar y culminar el presente trabajo de investigación.

Así mismo a todas las personas por el apoyo y colaboración.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes del estudio	3
2.2. <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta”	5
2.3. Toxicidad	6
2.4. Genotoxicidad	7
2.5. Micronúcleos	9
2.6. Método para evaluar la toxicidad aguda y genotoxicidad.	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Ubicación del trabajo de investigación	15
3.2. Definición de la población y muestra	15
3.3. Tipo de investigación	15
3.4. Metodología y recolección de datos	16
3.5. Análisis de datos	19
V. DISCUSIÓN	29
VI. CONCLUSIONES	37
VII. RECOMENDACIONES	39
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS	43

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Criterios definidos por el <i>HUMN</i> para considerar una célula apta para el análisis estadístico.	13
Tabla 2. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta”. Ayacucho 2018.	23
Tabla 3. Comportamiento general de los ratones a la dosis de 2000 mg/kg con extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta”. Ayacucho 2018.	24

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta” en su hábitat natural.	6
Figura 2. Variación del peso corporal de los ratones por efecto de la administración de 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta”. Ayacucho 2018.	25
Figura 3. Porcentaje de micronúcleos analizados en sangre periférica de ratón por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta”. Ayacucho 2018.	26
Figura 4. Porcentaje de micronúcleos analizados en medula ósea de ratón por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta”. Ayacucho 2018.	27

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de identificación botánica de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta”. Ayacucho 2017.	45
Anexo 2. Flujograma del procedimiento para la obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta” y tamizaje fitoquímico. Ayacucho 2018.	46
Anexo 3. Esquema de identificación fitoquímica propuesta por Miranda M y Cuellar A.	47
Anexo 4. Hojas recolectadas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta”. Ayacucho 2017.	48
Anexo 5. Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta”. Ayacucho 2018.	49
Anexo 6. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta” en el laboratorio de farmacognosia. Ayacucho 2018.	50
Anexo 7. Preparación de las concentraciones a ensayar del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta” en el laboratorio de toxicología. Ayacucho 2018.	51
Anexo 8. Procedimiento de la determinación de la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta” en el laboratorio de toxicología. Ayacucho 2018.	52
Anexo 9. Procedimiento de la determinación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta” en el laboratorio de toxicología. Ayacucho 2018.	53
Anexo10. Variación del peso de los animales administrados con extracto hidroalcohólico de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta” por vía oral en la evaluación de la toxicidad aguda. Ayacucho 2018.	55
Anexo 11. Variación del peso de los animales usados como control en la evaluación de la toxicidad aguda de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta”. Ayacucho 2018.	56
Anexo 12. Resultados del ensayo de micronúcleos en eritrocitos y médula ósea de ratón por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta”. Ayacucho 2018.	57

Anexo 13.	Prueba T del peso corporal de ratones al administrar 2000 mg/kg de peso corporal del extracto hidroalcohólico de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta”. Ayacucho 2018.	58
Anexo 14.	Análisis de varianza del porcentaje de micronúcleos en la evaluación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta” en sangre periférica. Ayacucho 2018.	59
Anexo 15.	Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett del porcentaje de micronúcleos en la evaluación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta” en sangre periférica. Ayacucho 2018.	60
Anexo 16.	Análisis de varianza del porcentaje de micronúcleos en la evaluación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta” en medula ósea. Ayacucho 2018	61
Anexo 17.	Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett del porcentaje de micronúcleos en la evaluación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don “huamanpinta” en medula ósea. Ayacucho 2018.	62
Anexo 18.	Matriz de consistencia. Ayacucho 2017	63

RESUMEN

Chuquiraga spinosa “huamanpinta” es una planta utilizada en la medicina tradicional peruana por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, cicatrizantes y antihemorrágica. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la toxicidad aguda oral y efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico. Las hojas fueron recolectadas en el distrito de Vinchos, departamento de Ayacucho a 3150 msnm. La obtención del extracto hidroalcohólico se realizó por maceración con etanol al 80% por 7 días, filtradas y concentradas. La toxicidad aguda se evaluó por el método a dosis límite de 2000 mg/kg y el efecto genotóxico por el test de micronúcleos según las directrices de la OECD. A las dosis de 100, 250 y 500 mg/kg, como control negativo se usó NaCl 0,9% y ciclofosfamida como inductor de micronúcleos, así mismo se identificó sus metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico fueron alcaloides, triterpenos, esteroides, saponinas, flavonoides, fenoles, lactonas y aminoácidos. No se observaron signos de toxicidad durante los 14 días pos administración en los animales en estudio hubo aumento de peso en todos los animales del grupo clasificándose en la categoría 5, ubicándose en el rango de toxicidad de una $DL_{50} > 2000$ mg/kg de peso. Los resultados de genotoxicidad muestran que no hubo variación estadística significativa del porcentaje de micronúcleos en sangre como en médula ósea en comparación con el control negativo ($p > 0,05$). Por lo tanto se concluye que en las condiciones experimentales el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* “huamanpinta” no presenta efecto genotóxico por ensayo de micronúcleos en ratones.

Palabras clave: *Chuquiraga spinosa*, toxicidad aguda, genotoxicidad, micronúcleos.

I. INTRODUCCIÓN

La alta diversidad de especies vegetales con importantes propiedades terapéuticas ha promovido en los últimos años un incremento en las investigaciones científicas, que buscan comprobar los conocimientos de la medicina popular. Esto deriva en la búsqueda de drogas alternativas que presenten menos efectos colaterales que los fármacos convencionales.¹ 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.² Por ello se hace necesario de estudios toxicológicos y genotóxicos de los extractos fluidos, acuosos, tinturas y liofilizados de las plantas. Las pruebas de toxicidad se realizan con el fin de identificar posibles daños para el ser humano debido a que, se ha detectado extractos de plantas medicinales que poseen actividad embriotóxica y/o teratogénico productos de origen vegetal.³ Entre los efectos que pueden dañar el material hereditario, se puede señalar las mutaciones génicas y las aberraciones cromosómicas, las cuales pueden producir transformaciones malignas e incluso la transmisión de alteraciones genéticas a la descendencia.⁴ Dentro de los trabajos de investigación realizados de *Chuquiragua spinosa* y *Chuquiragua lessing* de la medicina tradicional peruana se reporta sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, cicatrizantes, antihemorrágica y en infecciones vaginales.^{5,6,7} debido a su composición en alcaloides, triterpenos, esteroides, saponinas, flavonoides, taninos, sesquiterpenolactonas, aminoácidos, resinas.^{8,9,10} la genotoxicidad se evaluó mediante el ensayo de micronúcleos el cual está considerado como un ensayo práctico, universalmente validado, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos.^{11,12} El ensayo de micronúcleos permite detectar agentes aneuploidogénicos que bloquean la polimerización de microtúbulos durante la formación del uso mitótico; originando de esta manera el

rezago de cromosomas completos, que no se incluyen en los núcleos hijos. Asimismo agentes clastogénicos, como son las radiaciones y algunos medicamentos antineoplásicos que actúan como análogos de base intercalándose en el ADN, e inhibiendo su síntesis, ocasionando una fractura cromosómica. Los compuestos aneuploidogénicos causan micronúcleos más grandes que los causados por los agentes clastogénicos.

El ensayo de toxicidad aguda se evaluó a dosis única de 2000 mg/kg de extracto, esta prueba brinda información acerca del potencial tóxico de sustancias que pueden tener interacción directa o indirecta con el hombre, por tanto son exigidas por las agencias regulatorias como parte de las evaluaciones de seguridad y, de estimación de riesgo para la salud de las sustancias químicas, medicamentos, plaguicidas, aditivos alimentarios y comestibles.¹¹ Este ensayo tiene entre sus objetivos determinar los signos y síntomas tóxicos que se producen luego de la administración en dosis única a altas concentraciones del compuesto objeto de estudio.¹² De acuerdo con lo expresado por la Organización Mundial de la Salud, el 80% de la población mundial depende de las plantas para su atención primaria de la salud en los países en desarrollo. Así mismo, se estima que la población mundial será de 7500 millones de personas para el año 2020, de las cuales el 75% vivirá en países en desarrollo y consumirá solo el 15% de los medicamentos totales del mercado. Estos datos permiten predecir que la mayoría de la población dependerá aún más de las plantas medicinales.¹³ Por ende serán imprescindibles los estudios toxicológicos en dichas plantas medicinales.

Objetivo general.

Evaluar la toxicidad aguda y el efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta".

Objetivos específicos.

- Caracterizar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta".
- Evaluar la toxicidad aguda por el método de dosis límite del extracto hidroalcohólico de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta".
- Comparar el efecto genotóxico a diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta".

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

En cuanto a los trabajos de investigación realizados referente a la planta en estudio, podemos mencionar:

Chuquiraga spinosa “huamanpinta” contienen metabolitos secundarios, tales como: flavonoides, triterpenos, esteroides, alcaloides, taninos, compuestos fenólicos, lactonas sesquiterpénicas,^{5,6} saponinas y grupos aminos libres⁴ muy importantes desde el punto de vista farmacológico, que serían los responsables de sus efectos farmacológicos como antiinflamatorios, antioxidantes³, antifúngico,^{6,8} etc.

Si bien son diversas las investigaciones realizadas que demuestran las propiedades medicinales de *Chuquiraga spinosa* “huamanpinta” mas no los aspectos toxicológicos y genotóxicos, solo hay un estudio que detalla el aspecto toxicológico que fue realizado por Condorhuamán et al.⁸ En la cual determinaron la toxicidad subcrónica y posible efecto teratogénico del extracto etanólico de *Chuquiraga spinosa* en ratas de raza Holtzmann, a dosis repetida de 200mg/kg. En el ensayo de toxicidad subcrónica se observó que hubo diferencia significativa en los valores hematológicos y bioquímicos al segundo, tercer y cuarto mes de tratamiento y, a nivel histopatológico, no se evidenciaron alteraciones en hígado, riñón y cerebro. En relación al posible efecto teratogénico no se observaron diferencias en el peso de las ratas gestantes, número de implantaciones fetales, número de fetos vivos y alteraciones morfológicas de las crías al momento del nacimiento ni a dos meses de seguimiento. Concluyéndose que el extracto etanólico no presentó toxicidad subcrónica ni efecto teratogénico a la dosis de 200 mg/kg.⁸

Chávez et al.⁵ Reportaron que el extracto de acetato de etilo de *Chuquiraga spinosa* lessing sub sp. “huamanpinta”, contenía los flavonoides: 5,5'-dihidroxi-7,3'- dimetoxi-flavanona y 5-hidroxi- 7,4'-dimetoxiflavona, el flavonoide

quercetina y kampferol y del extracto etanólico se aisló el flavonoide rutina y los flavonoides de tipo glicósido como quercetina 3-O-rutinosido, kampferol 3-O-rutinosido y kampferol 3-O-glucosido.

Ramírez.⁷ Al determinar la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”. Identificó flavonoides, triterpenos, esteroides, alcaloides, taninos, compuestos fenólicos, lactonas sesquiterpénicas. Concluyéndose que la *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” manifiesta actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora, ubicándose como una especie nativa muy importante en la línea de los recursos naturales.

Casado et al.⁶ encontró que el extracto acuoso y metanólico al 50% de las partes aéreas de *Chuquiraga spinosa* presento una alta actividad antioxidante sin correlación entre la actividad antioxidante y el total de compuestos polifenólicos. Así mismo el extracto metanólico al 50% administrado por vía oral redujo significativamente (52,5%) el edema sub plantar inducido en la pata trasera en ratas. Este extracto, por administración tópica, produjo una reducción de 88,07% del edema inducido por el 12-O-tetradecanoilforbol-13-Acetato (TPA) en orejas de los ratones. El extracto acuoso y metanólico al 50% fueron activos contra *Cándida albicans* (MIC: 2,5 y 6,25 g, respectivamente) y el extracto acuoso mostró actividad antifúngica contra *Cándida cucumerinum* (MIC: 2,5 g).

Contreras.¹⁴ Al realizar tamizaje fitoquímico y evaluación de los extractos bencénico alcohólico y acuoso de las hojas de *Chuquiraga spinosa*. Manifiesta que, en el extracto alcohólico, existe presencia de flavonoides, resinas, azúcares reductores, alcaloides, saponinas y taninos. También señala que los diferentes extractos en estudio presentan actividad antiinflamatoria.

Arenas,¹⁵ en su estudio: Marcha fitoquímica y efecto diurético de *Chuquiraga spinosa* en *Cavia porcellus* (cobayos). Ayacucho 2000, demostró su efecto diurética siendo probablemente los responsables de dicha actividad serían los flavonoides en acción sinérgica con las saponinas, fenoles y taninos.

Torres,¹⁶ Identifico abundantes metabolitos secundarios, encontrándose lactonas y cumarinas, taninos y compuestos fenólicos, quinonas, principios amargos y flavonoides, poca presencia de resinas, poca presencia de azúcares reductoras, triterpenoides, esteroides, glicósidos cardiotónicos. En el extracto atomizado de *Chuquiraga spinosa*.

2.2. *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don “huamanpinta”

2.2.1. Clasificación taxonómica según el sistema de Cronquist. A. 1988.

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	ASTERALES
FAMILIA	:	ASTERACEAE
GÉNERO	:	Chuquiraga
ESPECIE	:	<i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don
N.V	:	"huamanpinta"

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas (Anexo 1)

2.2.2. Descripción botánica.

Es una planta semileñosa de 1 a 1,5 metros de alto. El tallo muy ramificado, densamente folioso. Las hojas de disposición uniformemente alternas simples enteras de pecíolo corto de forma aovada con borde entero con una longitud de 1,5 mm de diámetro de color verde intenso y brillante, con espinas axilares. Flores de color amarillo-anaranjado, con anteras sagitadas, corolas bilabiadas. Pero una de sus características más sobresalientes es por la partidura del disco del capítulo. Inflorescencia en cabezuela o capítulos rodeada de tres hileras de brácteas involucrales con numerosas flores, sésiles, dispuestas en las axilas de las hojas. Los capítulos femeninos con involucre cilíndrico y con brácteas dispuestas más o menos en cinco series, las externas aovadas y las internas angostamente aovadas. Receptáculo cónico, alveolado. Flores en escaso número con la corola algo filiforme. Aquenios glabros con un disco anular en la parte superior y lateralmente. Pappus de color algo amarillento. Capítulos masculinos con involucre cilíndrico con brácteas dispuestas en tres series, las externas e internas elípticas 5 estambres con los filamentos libres y soldados por las anteras (sinanterio), receptáculo cónico alveolado de 1,5 mm de diámetro.^{8,9}

2.2.3. Hábitat y distribución geográfica.

La especie de la planta se ha encontrado en diferentes localidades de Ayacucho como Quinua, Chiara, Vinchos; en la provincia de Cangallo en el distrito de Totos, por encima de los 3,000 metros sobre el nivel del mar. Habita en zonas escarpadas y pedregosas, se relaciona con algunas especies arbustivas como el *Gynoxis*, *Baccharis*, etc. Su zona de vida es, el bosque húmedo montano subtropical

también se le encuentra entre el límite de la zona de vida ya mencionada y el páramo muy húmedo subandino subtropical.⁹



Figura 1: *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don “huamanpinta” en su hábitat natural.

2.2.4. Composición química.

Los estudios fitoquímicos sobre *Chuquiraga spinosa* indican la presencia de compuestos como: alcaloides, triterpenos, esteroides, saponinas, flavonoides, taninos, sesquiterpenolactonas, aminoácidos y resinas. Tiene además potasio, calcio, fósforo, azufre y silicio.^{5,6}

2.2.5. Uso en medicina tradicional

La infusión del tallo y hojas de *Chuquiraga spinosa*. Se utiliza en la medicina tradicional peruana por sus propiedades antiinflamatorias y para el tratamiento de infecciones vaginales.⁶ Se coloca 15 g de las hojas para un litro de agua, hervir por 3 a 5 minutos y se toma una taza tres veces al día y se emplea como: Antiinflamatorio de las vías urinarias, antiinflamatorio prostático, cicatrizante, antiséptico vaginal.⁷

2.3. Toxicidad

Se entiende por "toxicidad" a la cantidad de una sustancia que, bajo un conjunto específico de condiciones, causa efectos perjudiciales. La toxicidad indica la potencia de una sustancia venenosa y no la afección producida por ésta (concepto que corresponde a "intoxicación" o "envenenamiento"). La toxicidad se expresa como la cantidad de la sustancia en mg/kg de peso vivo que origina efectos biológicos determinados, en un tiempo dado y en una especie establecida. Existen diversos indicadores de toxicidad, siendo uno de los más

usados la "dosis letal 50" (DL₅₀); este es un indicador estadístico de toxicidad aguda, el cual señala la cantidad del tóxico que causa la muerte del 50% de los animales intoxicados. Con el nombre de "CL₅₀" ("concentración letal 50") se proyecta el indicador anterior a la toxicidad de un gas en el aire, aunque también se le suele referir al agua.¹⁷

2.3.1. Toxicidad aguda:

La toxicidad "aguda" señala los efectos de una o de varias dosis administradas en 24 horas, pudiendo aparecer sus efectos en pocas horas o días. La toxicidad "subcrónica" (que fuera llamada "subaguda" hasta hace poco tiempo) se refiere a los efectos producidos por una exposición prolongada (semanas a 3 meses) a una sustancia, generalmente en dosis inferiores a las necesarias para causar una intoxicación aguda. La toxicidad "crónica" implica la exposición al tóxico durante más de 3 meses, pudiendo llegar a varios años, en los cuales ordinariamente no se aprecian signos de enfermedad durante un período prolongado.^{17,18}

2.4. Genotoxicidad

La genotoxicidad, es la capacidad para causar daño al material genético por agentes físicos, químicos o biológicos; el daño en el material genético incluye no sólo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula.¹⁷ Ejemplos de esto último son las proteínas que intervienen en la reparación, condensación y descondensación del ADN en los cromosomas, u otras estructuras como el huso mitótico, responsable de la distribución de los cromosomas durante la división celular. Este daño puede ser de tipo mutágeno o carcinógeno.^{17,18}

2.4.1. Mecanismos de genotoxicidad

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

Los mutágenos y carcinógenos genotóxicos son compuestos electrófilos muy reactivos y con gran afinidad por el ADN, como los derivados de compuestos orgánicos nitrogenados o halogenados, epóxidos, lactonas o compuestos inorgánicos de níquel, cromo, uranio, etc.¹⁸

Los genotóxicos pueden provocar mutaciones por cambios en algunos nucleótidos debidos a: ¹⁹

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

También, pueden provocar aberraciones cromosómicas como: ¹⁹

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

Tras la lesión producida en el ADN, la célula puede sufrir tres procesos: ¹⁹

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

En cuanto a los carcinógenos genotóxicos, actúan como iniciadores del proceso de carcinogénesis. Ésta comienza con una mutación en una sola célula pudiendo ser: a nivel del metabolismo del xenobiótico, haciendo que una sustancia procancerígena se convierta en cancerígena; en la reparación del ADN, dificultándola o impidiéndola; y/o estimulando la proliferación celular.¹⁹ Este proceso se conoce como iniciación.

Suelen ser sustancias químicas, como compuestos alquilantes (mostazas nitrogenadas), especies reactivas de oxígeno, aflatoxinas, productos de combustión, nitrosaminas, etc. Su mecanismo de acción está basado en la formación de enlaces covalentes con el nitrógeno 7 de la guanina (aducto), produciéndose una mutación irreversible. Algunas características de ellos son: ¹⁹

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

No hay que olvidar que no todos los cancerígenos son genotóxicos, los hay también no genotóxicos y además, aunque todos los cancerígenos genotóxicos son mutágenos, no todos los mutágenos son cancerígenos.

2.5. Micronúcleos

Los micronúcleos (MN) son corpúsculos citoplasmáticos esféricos, detectados en interfase, más pequeños y con las mismas características morfológicas que el núcleo celular; se originan por pérdida de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros durante la división nuclear.²⁰

Se forman espontáneamente o por causa de agentes genotóxicos.^{21,22} En hematología, los micronúcleos se conocen como cuerpos de Howell-Jolly, su forma es generalmente redonda o almendrada y alcanza un diámetro entre 0.4 a 1.6 micras.^{22,23}

Los MN reflejan aberraciones cromosómicas y son expresados en células en división que contienen rupturas de cromosomas por pérdida de los centrómeros (fragmentos acéntricos) y/o pérdida de cromosomas completos, en ambos casos son incapaces de viajar con el resto de los cromosomas a través del huso mitótico, a los polos del núcleo celular durante la anafase de la división celular. En la telofase las estructuras cromosómicas son envueltas por la membrana nuclear y, tanto los cromosomas completos, como los fragmentos de cromosomas retardados, asumen gradualmente la morfología de un núcleo en interfase con la excepción de que son más pequeños que el núcleo principal de la célula, de aquí el término de MN.^{21,24}

2.6. Método para evaluar la toxicidad aguda y genotoxicidad.

2.6.1. Método para evaluar la toxicidad aguda

Existen varios métodos para evaluar la toxicidad aguda, en la presente investigación se usó el método de dosis límite.¹²

El método de toxicidad a dosis límite está referido como el estudio cualitativo y cuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición en función del tiempo tras la administración de una dosis única de la sustancia o de varias dosis fraccionadas en el transcurso de 24 horas.¹¹ Brinda información acerca del potencial tóxico de sustancias que pueden tener interacción directa o indirecta con el hombre, por tanto son exigidas por las agencias regulatorias como parte de las evaluaciones de seguridad y, de estimación de riesgo para la salud de las sustancias químicas, medicamentos, plaguicidas, aditivos alimentarios y comestibles obtenidos por vías no convencionales. Este ensayo tiene entre sus objetivos determinar los signos y síntomas tóxicos que se producen luego de la administración en dosis única a altas concentraciones del compuesto objeto de estudio, así como definir la concentración del mismo que provoca la muerte de los animales sometidos al estudio.¹²

2.6.2. Método para evaluar la genotoxicidad: Test de micronúcleos.

El ensayo de micronúcleos está considerado como un ensayo práctico, universalmente validado y accesible tecnológicamente, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos (físicos o químicos).²⁰

El test de micronúcleos se fundamenta en lo siguiente: Durante la división celular el material genético (ADN) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, a roturas cromosómicas y al efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo. Cuando esto ocurre, el material genético que se desprende y que, por tanto, queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario denominado “micronúcleo” (MN), visible fácilmente al microscopio óptico. El material genético desprendido puede derivar de cromosomas enteros o, más frecuentemente, de fragmentos cromosómicos acéntricos que quedan excluidos de los núcleos de las nuevas células durante anafase mitótica.²⁴

La prueba de micronúcleos permite detectar agentes clastogénicos y aneuploidogénicos. Los agentes aneuploidogénicos (como colchicina, vincristina y vinblastina), se caracterizan por bloquear la polimerización de microtúbulos durante la formación del huso mitótico; originando de esta manera el rezago de

cromosomas completos, que no se incluyen en los núcleos hijos. Mientras que los agentes clastogénicos, como son las radiaciones y algunos medicamentos antineoplásicos (como la ciclofosfamida, la arabinosa-c, el busulfan y el metotrexate), actúan como análogos de base. Por lo tanto se intercalan en el ADN, e inhiben su síntesis y ocasionan posteriormente un debilitamiento de enlace entre las bases, lo que termina por producir una fractura cromosómica. Los compuestos aneuploidogénicos causan micronúcleos más grandes que los causados por los agentes clastogénicos.²²

El micronúcleo apenas se ve en la sangre periférica de ratas y humanos porque el bazo captura y destruye eritrocitos, incluidos micronúcleos, de manera rápida y efectiva. En los ratones, sin embargo, los eritrocitos micronucleados existen exactamente igual que las células normales en la sangre periférica. El ensayo que utiliza médula ósea evalúa un efecto agudo de los productos químicos, pero el método que usa eritrocitos de sangre periférica de ratón puede evaluar un efecto crónico de la sustancia problema analizando los eritrocitos maduros que albergan micronúcleos hasta su vida.²³

2.6.2.1. Factores de variabilidad

Existen diversos factores que pueden influir en la frecuencia basal de MN; la edad ha sido ampliamente estudiada, relacionándose mayor edad con mayor índice de MN.^{18,19} En el caso del análisis del género, las mujeres presentan una frecuencia basal superior a la de los hombres y el número de MN incrementa cuando se superan los 35 años de edad. La presencia de homocisteína en plasma, el déficit de folato de vitamina B12 conducen a un incremento de la frecuencia basal de MN.²¹

2.6.2.2. Utilidad del ensayo de micronúcleos

El ensayo de MN es una alternativa al test de aberraciones cromosómicas convencional, en el que se analizan las alteraciones presentes en metafases mitóticas y permite detectar aberraciones cromosómicas que responden a alteraciones de tipo estructural (efecto clastogénico) o alteraciones numéricas (efecto aneugénico) del agente en estudio.

Además, con el ensayo de MN se consigue:²¹

- Reducir la dificultad a la hora de realizar el recuento.
- Mejorar la sensibilidad del ensayo, ya que los MN sólo se cuentan en células que han completado una división nuclear.

- Incrementar la potencia estadística de los estudios al analizar miles de células en lugar de cientos de ellas.
- Reducir el coste del ensayo.
- El ensayo de MN es, por tanto, un ensayo práctico, universalmente validado y accesible tecnológicamente, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos.

2.6.2.3. Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de ratones

La prueba de micronúcleos in vivo en mamíferos se usa para la detección del daño inducido por la sustancia de prueba a los cromosomas o al aparato mitótico de eritroblastos, mediante análisis de eritrocitos muestreados en médula ósea y / o células de sangre periférica de animales, generalmente roedores (ratones o ratas). El objetivo de la prueba de micronúcleos es identificar sustancias (líquidas o sólidas) que causan daño citogenético que da como resultado la formación de micronúcleos con fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros retardados.²⁴ En este ensayo se emplea habitualmente médula ósea de roedores, pues es en ese tejido donde se forman los eritrocitos policromáticos. La detección de eritrocitos inmaduros policromáticos micronucleados en la sangre periférica también puede llevarse a cabo en otras especies en las que se haya demostrado que el bazo no es capaz de eliminar los eritrocitos micronucleados o que son suficientemente sensibles para detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales. Entre los diversos criterios para distinguir los micronúcleos figura la determinación de la presencia o la ausencia de centrómero o de ADN centromerito en los mismos. El parámetro principal es la frecuencia de eritrocitos inmaduros policromáticos micronucleados.¹³ Si los animales se tratan de forma continua durante cuatro semanas o más, también puede emplearse como parámetro en el ensayo el número de eritrocitos maduros (normocromáticos) con micronúcleos en la sangre periférica respecto a un número determinado de eritrocitos maduros.¹³ Este ensayo está especialmente indicado para evaluar el riesgo mutagénico, ya que permite tomar en consideración factores del metabolismo in vivo, de la farmacocinética y de los procesos de reparación del ADN, si bien dichos factores pueden variar según la especie, el tejido y el aspecto genético considerado. Los ensayos in vivo también resultan útiles para ahondar en el estudio de los efectos mutagénicos detectados en ensayos in vitro. Por lo general si hay pruebas de

que la sustancia de ensayo o su metabolito activo no llegan al tejido diana, no procede realizar el presente ensayo.¹³

2.6.2.4. Criterios de selección

La iniciativa internacional The International Collaborative Project on Micronucleus Frequency in Human Populations (HUMN), busca uniformizar el test de micronúcleos; allí se comparan resultados y se recopilan datos de frecuencias y variaciones de diferentes laboratorios en todo el mundo para establecer un protocolo estándar. El HUMN establece ciertos criterios de selección para considerar una célula apta para el análisis estadístico (Tabla 1).²¹

Tabla 1. Criterios definidos por el *HUMN* para considerar una célula apta para el análisis estadístico.

Criterios para células binucleadas	Criterios para micronúcleos
El citoplasma debe distinguirse claramente	El diámetro oscila entre 1/16-1/3 de la media del diámetro del núcleo principal
Membranas citoplasmática y nuclear intactas	No refractarios
Núcleos con similar grado de condensación de la cromatina	Intensidad de tinción similar a los núcleos principales o superior
Igual tamaño, forma (ovalados) y patrón de tinción	Forma similar a los núcleos de la célula binucleadas
Pueden estar unidos por puentes nucleoplasmáticos	No conectados con ninguno de los núcleos de la célula binucleadas
Pueden tocarse pero no solaparse	Pueden tocar los núcleos de la célula binucleadas pero no solaparse con ellos
Ninguno de los núcleos debe encontrarse en etapas de apoptosis	

Fuente: Zalacain M, Sierrasesúмага L, Patiño A. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. 2005.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga durante los meses de julio a diciembre de 2017.

3.2. Definición de la población y muestra

3.2.1. Población: *Chuquiragua spinosa* “huamanpinta”, que crecen a 3150 msnm en el distrito de Vinchos en la provincia de Huamanga departamento de Ayacucho.

3.2.2. Muestra: 2 kg de hojas de *Chuquiraga spinosa* “huamanpinta”, que se obtuvo por conveniencia en el mes de julio de 2017.

Criterios de inclusión: hojas en buen estado, maduras

Criterios de exclusión: hojas en mal estado, inmaduras

3.2.3. Unidades Experimentales

60 ratones de ambos sexos de 25 a 30 g de peso corporal seleccionados aleatoriamente, mantenidos en un ambiente y una alimentación balanceada y agua de forma ad libitum, obtenido en el bioterio de la Universidad Cayetano Heredia de la ciudad de Lima.

3.3. Tipo de investigación

Básico – experimental

3.3.1. Diseño de investigación.²⁵

El diseño usado es un diseño con pos prueba únicamente y grupo control.²⁶ El diseño incluye dos grupos, uno recibió el tratamiento experimental y el otro no (grupo de control). Cuando concluyo la manipulación, a ambos grupos se les hizo una medición sobre la variable dependiente en estudio. En el estudio se concluyeron tres concentraciones de extractos hidroalcohólicos de las hojas de *chuquiragua spinosa* “huamanpinta” para evaluar la toxicidad aguda y el efecto

genotóxico (100, 250, 500 µg /ml).

Se hicieron las comparaciones entre las pos pruebas (O1 y O2).

En ese sentido para saber si hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las concentraciones estudiadas y el control positivo (ciclofosfamida) se hará un análisis de varianza.

El diseño se grafica de la siguiente manera:

Ge	X	O
Gcn	-	O
Gcp	X	O

Dónde:

Ge: Grupo experimental

Gcn: Grupo control negativo

Gcp: Grupo control positivo

X: Tratamientos

Ho: El extracto hidroalcohólico de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta" no presenta efecto tóxico ni genotóxico en ratones.

H1: El extracto hidroalcohólico de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta" presenta efecto tóxico y genotóxico en ratones.

3.4. Metodología y recolección de datos

3.4.1. Recolección de la muestra

El procedimiento para la recolección, clasificación de las muestras se realizarán de acuerdo a los procedimientos de recolección y conservación dadas por Villar del Fresno.²⁷

Las hojas fueron recolectadas en el distrito de Vinchos en la provincia de Huamanga en horas de la mañana. Se seleccionaron las hojas que no estuvieron dañadas ni maltratadas y fueron transportadas en bolsas de papel para evitar su descomposición, luego se procedió a su secado a sombra con buena ventilación durante 10 días, previa limpieza de las mismas cuidando extenderlas para evitar su descomposición. Una parte de la planta con hojas y flor fue llevada al Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para la identificación taxonómica.

3.4.2. Preparación del extracto hidroalcohólico

Se pesaron 500 g de hojas secas trituradas fueron macerados con 2,5 litros de alcohol al 80% por siete días con agitación constante. Durante el proceso se agitó periódicamente para su distribución homogénea de la muestra.

El extracto hidroalcohólico fue concentrado en baño maría a 50 °C y guardados en frascos de color ámbar para su posterior análisis²⁸.

3.4.3. Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico

El extracto seco que se obtuvo se diluyó con agua destilada (0,5 mg/5mL) para luego realizar las respectivas identificaciones de metabolitos presentes en cada concentrado siguiendo el protocolo presente en el anexo 2. Las reacciones de identificación se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Miranda M y Cuellar A.²⁹ del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana-Cuba mediante ensayos de coloración y precipitación.

3.4.4. Determinación de la toxicidad aguda y genotoxicidad (test de micronúcleos)

3.4.4.1. Determinación de la toxicidad aguda

Se ha utilizado el método de la clase tóxica aguda descrito en la normativa N° 423 de la OECD²⁶ y usado por Bermúdez D¹¹ y Rivadeneira A.¹²

- Para la determinación de la toxicidad aguda del extracto, se emplearon 20 ratones (10 machos y 10 hembras), previamente acondicionados. para lo cual previamente los animales fueron aclimatados y alojados con libre acceso a agua y alimento con temperatura ambiental entre 21-25 °C y 50 y 60% de humedad con 12 horas de luz/oscuridad. Posteriormente, los animales fueron sometidos a ayuno con libre acceso de agua seis horas antes del ensayo.

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos (grupo control y grupo experimental) con igual número de hembras y machos en ambos grupos. La sustancia experimental fue administrada en una sola dosis de 2000 mg/kg de acuerdo al peso corporal por vía oral, usando una cánula adecuada. Al grupo control se les administró 0,3 mL de agua destilada. Terminada la dosificación se volvió a colocar la comida 2 horas después.

- Se observaron a los animales individualmente, después de la dosificación con atención especial durante las primeras 4 horas, periódicamente durante las primeras 24 horas y después diariamente, hasta un total de 14 días.
- Los pesos individuales de los animales, se determinaron antes de administrar la sustancia experimental, a los 7 días y 14 días.

3.4.4.2. Determinación de la genotoxicidad (test de micronúcleos)

Tets N° 474 (ensayo de micronúcleos en eritrocitos de mamífero 1997) ^{30,31}

- El ensayo de micronúcleos se realizó en 40 ratones de 25 a 30 g de peso corporal
- Los animales fueron aclimatados siete días antes de iniciado el experimento y durante los 14 días de ensayo, en las condiciones adecuadas del bioterio (temperatura controlada de 22 ± 2 °C, ciclos de luz-oscuridad de 12 h, cama con viruta y cambio cada 48 horas)
- Se formaron cinco grupos de ocho animales cada uno las cuales fueron distribuidas de manera aleatoria, cada grupo estuvo formado por cuatro machos y cuatro hembras.
- Posteriormente fueron pesadas y marcadas
- Luego se calcularon y administraron las dosis de los extractos objeto de estudio a cada uno de los grupos a ensayar por la vía oral, empleando para ello una cánula intragástrica, y se procedió de la siguiente manera: el primer grupo recibió solución salina 0,9% 10 mL/kg, el segundo ciclofosfamida 40 mg/kg diluido en NaCl 0,9% en dosis única administrado inmediatamente después de ser resuspendido, el tercero, cuarto y quinto los extractos preparados en agua a la dosis de 100 mg/kg, 250 mg/kg y 500 mg/kg respectivamente.
- Los tratamientos fueron dados dos veces al día durante 48 horas, los animales fueron sacrificados 24 horas después de la última administración con Pentobarbital 100 mg/kg, este tiempo de estudio está basado en la cinética de maduración de los eritrocitos en ratones.
- El procedimiento empleado para la obtención de las preparaciones de sangre periférica fue realizado de la siguiente manera: Se tomó una pequeña muestra de sangre periférica pudiendo realizar un frotis de sangre (3 frotis por unidad experimental), se fijaron con etanol 95% (v/v) durante 5 min y se secaron al aire durante 24 horas, posteriormente se tiñeron con colorante Giemsa al 5% en agua corriente durante 10 minutos.

- Las muestras de médula ósea obtenidas se recogieron en 0,5 ml de suero fisiológico y se fijaron con etanol al 95% (v/v) durante 5 min y se secaron al aire libre por una hora. Posteriormente se tiñeron con Giemsa al 5% (v/v) en agua corriente durante aproximadamente 10 min. Se contó aproximadamente 1000 eritrocitos por animal, en campos oculares a 400 aumentos a fin de observar la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos maduros o inmaduros.
- Los datos fueron expuestos en porcentaje de micronúcleos.

3.5. Análisis de datos

Los datos obtenidos se expresaron en forma de medias y desviación estándar, y se representaron mediante tablas y figuras. La significancia estadística de la variación de peso corporal de los ratones tanto del grupo tratado en relación al grupo control se realizó con la prueba T Student. El porcentaje de micronúcleos en sangre periférica y en medula ósea se analizó mediante la prueba de Dunnett con un nivel de confianza del 95%, utilizando el software SPSS versión 22.

IV. RESULTADOS

Tabla 3. Identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P) D. Don “huamanpinta”. Ayacucho 2018.

Metabolitos Secundarios	Reactivo usado	Resultado	Observaciones
Alcaloides	Dragendorff	++	Precipitado de color naranja marrón
Lactonas y cumarinas	Mayer	+	Precipitado de color blanco crema
Flavonoides	Bajlet	++	Coloración naranja
Quinonas	Shinoda	++	Coloración rojo ladrillo
Catequinas	Borntrager	+	Precipitado de color rojo pálido
Saponinas	Na ₂ CO ₃	+	Coloración verde carmelita a luz UV
Fenoles	Agitación	++	Formación de espuma
Aminoácidos libres	Cloruro ferrico 5%	+++	Coloración verde oscuro intenso
Cardenólidos	Ninhidrina	+++	Coloración azul violáceo intenso
Triterpenos y esteroides	Kedde	++	Coloración violácea
	Lieberman-Burchart	++	Coloración verde azul

LEYENDA:

- (+) : Escaso/Leve
 (++) : Moderada
 (+++) : Abundante/Intensa

Tabla 4. Comportamiento general de los ratones a la dosis de 2000 mg/kg con extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta". Ayacucho 2018.

Dosis/Comportamiento general	Grupo control	Extracto 2000 mg/kg
Disminución actividad motora	0/10	0/10
Aumento de actividad motora	0/10	0/10
Perdida de reflejos de enderezamiento	0/10	0/10
Lagrimación	0/10	0/10
Mucosas pálidas	0/10	0/10
Mucosas hiperémicas	0/10	0/10
Erección de la cola	0/10	1/10
Piloerección	1/10	3/10
Diarrea	0/10	0/10
Agresivo	0/10	2/10
Atemorizado	0/10	0/10

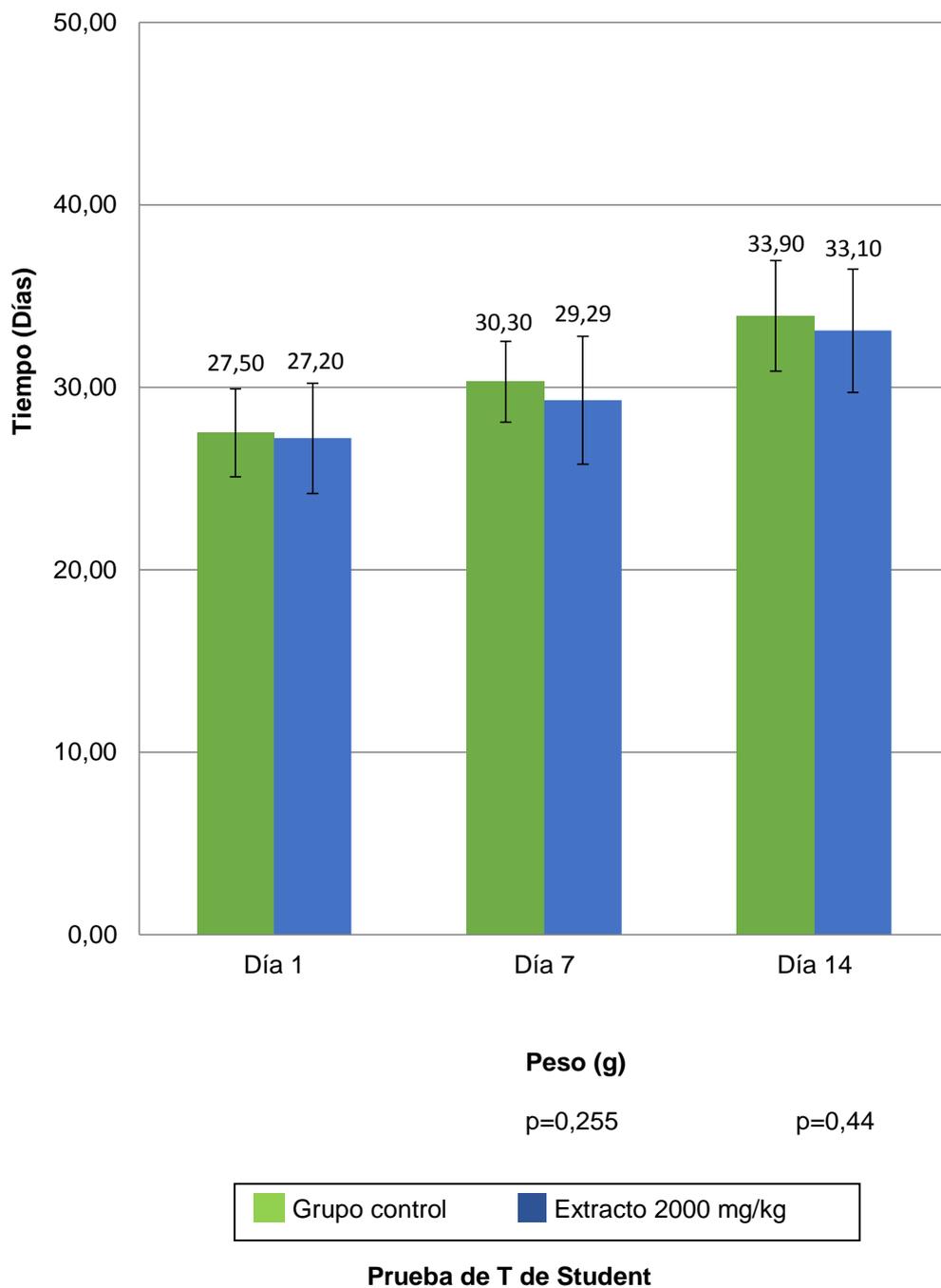
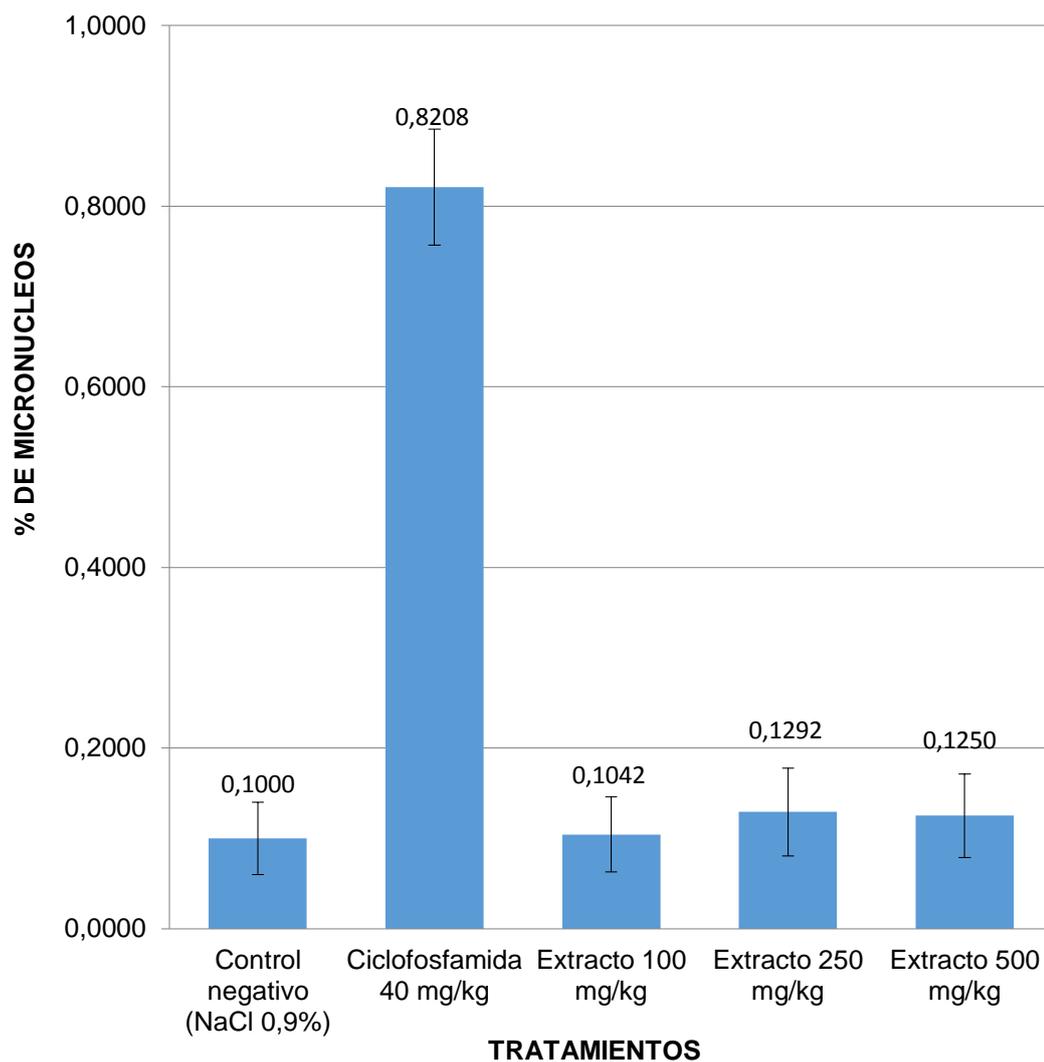
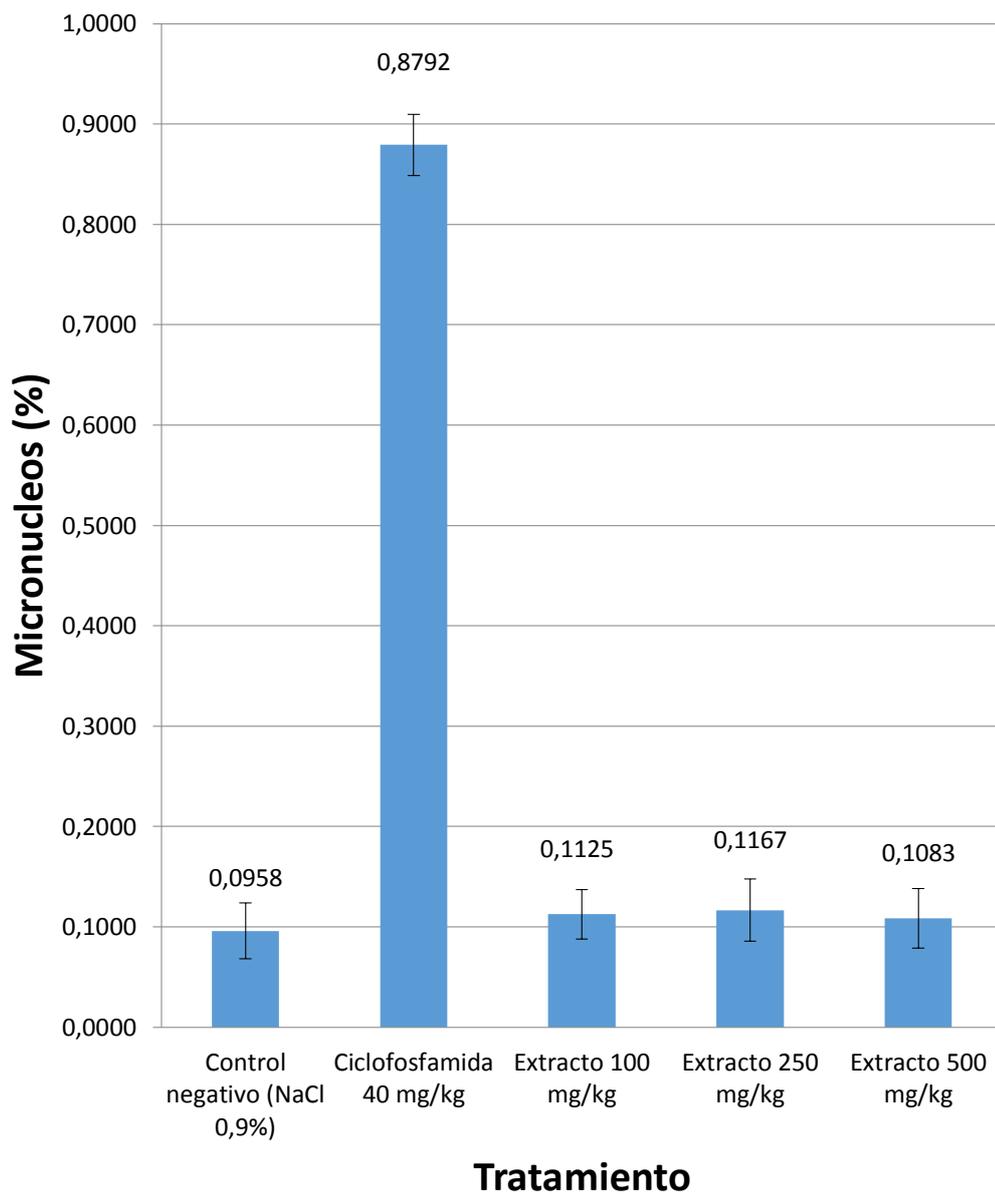


Figura 2. Variación del peso corporal de los ratones por efecto de la administración de 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huampinta". Ayacucho 2018.



ANOVA: $p = 2,25 \times 10^{-27}$

Figura 3. Porcentaje de micronúcleos analizados en sangre periférica de ratón por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta". Ayacucho 2018.



$$p = 1,40 \times 10^{-36}$$

Figura 4. Porcentaje de micronúcleos analizados en médula ósea de ratón por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta". Ayacucho 2018.

V. DISCUSIÓN

En nuestro país la medicina tradicional representa una práctica médica alternativa desde tiempos prehispánicos por razones culturales, pero además por aspectos socioeconómicos, por lo que en la actualidad su uso cotidiano es fundamental para resolver problemas de salud, principalmente en comunidades indígenas.

Uno de los problemas más frecuentes asociados con el uso de plantas medicinales es la ausencia de evidencias farmacológicas, toxicológicas y clínicas. La existencia de plantas con elevado potencial terapéutico constituye una alternativa farmacológica de marcado interés en el tratamiento de muchas enfermedades, de ahí la importancia de realizar estudios preclínicos con el propósito de detectar posibles efectos tóxicos post administración.⁸ Con esta finalidad se desarrolló el ensayo de micronúcleos, capaz de detectar indirectamente rotura o pérdida cromosómica y que actualmente se encuentra en gran auge dada su utilización en líneas de investigación sobre mutagénesis, para conocer *in vitro* o *in vivo* el efecto genotóxico de nuevos agentes químicos tanto a nivel ambiental con nuevos plaguicidas y pesticidas, como en el ámbito sanitario con la utilización de nuevas drogas citostáticos en los tratamientos antitumorales.²¹ Por otra parte dentro de la batería de ensayos de primera barrera se encuentran los estudios de toxicidad a dosis límite, imprescindibles en la estimación del potencial tóxico de una sustancia, referidos como estudios cuali-cuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición en función del tiempo tras la administración de una dosis única de la sustancia o de varias dosis fraccionadas en el transcurso de 24 horas.¹¹

Así mismo la Organización Mundial de la Salud (OMS) apoya el uso adecuado de medicamentos a base de plantas y promueve el uso de los recursos que han demostrado ser seguros y eficaces. Algunas plantas medicinales han resistido la

prueba científica, pero otras son utilizadas sólo por razones tradicionales para proteger, restaurar o mejorar la salud, necesitando ser estudiadas a pesar de la experiencia registrada con su uso tradicional en los últimos años.¹³ por otra parte según las estadísticas de la OMS el 80% de la población mundial depende de las plantas para su atención primaria de la salud en los países en desarrollo. Así mismo, se estima que la población mundial será de 7500 millones de persona para el año 2020, de las cuales el 75% vivirá en países en desarrollo y consumirá solo el 15% de los medicamentos totales del mercado. Estos datos permiten predecir que la mayoría de la población dependerá aún más de las plantas medicinales.¹³ Dicha necesidad hace necesario evaluar el potencial toxico de las plantas medicinales para avalar su uso como agente terapéutico.

Al realizar el tamizaje fitoquímico, extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* “huamanpinta” presento alcaloides, triterpenos, esteroides, saponinas, flavonoides, fenoles, lactonas, aminoácidos, quinonas y cardenolidos (Tabla 3), encontrándose abundante cantidad de fenoles y flavonoides, como describe Ramirez,⁷ quien identifico la presencia de alcaloides, taninos, flavonoides, compuestos fenólicos, triterpenos, esteroides, lactonas, antranas, naftoquinonas y principios amargos. También otros autores al evaluar el extracto etanólico y acuso de *Chuquiraga spinosa* “huamanpinta” encontraron la presencia de taninos, compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides, quinonas, triterpenos, y saponinas.^{5,6}

Los resultados muestran que son los fenoles, flavonoides, los triterpenos, y esteroides los más abundantes en este extracto y serían los responsables del efecto antioxidante, antiinflamatorio, inmunomodulador, cicatrizante y antiséptico vaginal según los estudios realizados por Ramírez E⁷, Casado et al.⁶ y Condorhuamán et al.⁸ Se coloca 15 g de las hojas para un litro de agua, hervir por 3 a 5 minutos y se toma una taza tres veces al día y se emplea como: Antiinflamatorio de las vías urinarias, antiinflamatorio prostático, cicatrizante, antiséptico vaginal.⁷

Respecto al ensayo de toxicidad aguda a dosis límite la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* “huamanpinta” confirmó la hipótesis planteada, al no presentarse signo alguno que indicara la toxicidad en los grupos de ratas a las cuales les fue administraba la dosis máxima de 2000 mg/kg. Los resultados no arrojaron una diferencia significativa entre los grupos (control y extracto 2000 mg/kg) debido a que la concentración

de componentes de la planta (metabolitos secundarios) no fue suficiente para provocar un efecto que se reflejara en el promedio de ganancia diaria de peso de los animales, es decir no se observaron signos de toxicidad durante los 14 días pos administración en los animales en estudio, solo un ratón en el grupo tratado presento erección en la cola, tres ratones presentaron piloerección y dos mostraron conducta agresiva en las primeras horas tras la administración en el día 1. Posteriormente, no se evidenció ninguna anormalidad ni en el grupo control, ni en el grupo tratado, durante los 14 días del experimento (Tabla 4). Hubo ganancia de peso en todos los animales del grupo control y experimental. En la figura 2, se aprecia que la ganancia de peso corporal, tanto del grupo tratamiento como del grupo control es creciente en función del tiempo, siendo estadísticamente no significativo ($p=0,225$)

Los resultados de estudios de toxicidad aguda para el extracto en la presente investigación indican que, la Dosis letal 50 (DL50) estaría encima de los 2000 mg/kg de peso corporal, clasificándose en la categoría 5 según el Sistema Globalmente Armonizado (SGA), calificándose como “No clasificadas”. Por lo que se considera de muy baja toxicidad vía oral, lo que ayuda a descartar la toxicidad de este extracto. Esto demuestra resultados similares a los presentados por Rivadeneira et al. Al usar el mismo método y la misma dosis de extracto.¹²

Los animales se mantuvieron bajo ciclos de luz y oscuridad controlados, alojados con libre acceso a agua y alimento con temperatura ambiental entre 21-25 °C y 50 y 60%, lo cual contribuyó a que los animales se mantuvieran tranquilos y sin signos de estrés. Con ello se descartaron problemas o factores externos atribuibles a los modelos biológicos que pudiesen interferir con los resultados.

Por lo tanto los datos obtenidos demuestran una ausencia de toxicidad de la planta *Chuquiraga spinosa* “huamanpinta” en base a los parámetros de peso y comportamiento analizados. Estos resultados ayudan a descartar posibles efectos secundarios derivados de su utilización en la medicina tradicional en humanos según las condiciones experimentales del estudio.

Respecto a la genotoxicidad, decimos que es la capacidad para causar daño al material genético por agentes físicos, químicos o biológicos; el daño en el material genético incluye no sólo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula.¹⁷ Ejemplos de esto último son las proteínas que intervienen en la reparación, condensación y

descondensación del ADN en los cromosomas, u otras estructuras como el huso mitótico, responsable de la distribución de los cromosomas durante la división celular. Este daño puede ser de tipo mutágeno o carcinógeno.^{17,18} existen métodos *in vivo* como *in vitro* para evaluar la genotoxicidad de diversas sustancias, en la presente investigación se usó en ensayo *in vivo* de micronúcleos que está validada internacionalmente como bioensayo para evaluar genotoxicidad de sustancias, exposiciones agudas y crónicas, y es una de las más usadas para identificar agentes cancerígenos. En comparación con el test de micronúcleos, el análisis de aberraciones cromosómicas en metafases proporciona más detalle del daño, sin embargo la complejidad del análisis cromosómico requiere de personal entrenado y mayor tiempo para el diagnóstico. Por otra parte, el análisis de micronúcleos provee mayor validez estadística ya que se registra miles de células binucleadas, mientras que las metafases se cuentan por cientos o menos.²⁰

En los resultados del ensayo de micronúcleos, se observa en la figura 3, el porcentaje de micronúcleos analizados en sangre periférica de ratón por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* "humanpinta". Cuyo resultado muestra una mayor inducción de micronúcleos del 0,129% a 250 mg/kg de extracto respecto al 0,821% de la ciclofosfamida y 0,100% del control negativo (NaCl 0,9%). De la misma forma se puede observar en la figura 4 el porcentaje de micronúcleos analizados en medula ósea de ratón por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* "humanpinta". Obteniéndose una mayor inducción de micronúcleos del 0,117% a 250 mg/kg de extracto respecto al 0,879% de la ciclofosfamida y 0,096% del control negativo (NaCl 0,9%).

Del análisis estadístico (Anexo 14, 15, 16 y 17), se demuestra que no hay diferencia estadística significativa ($p > 0,05$) en la inducción del porcentaje de micronúcleos ejercida por las diferentes concentraciones de extracto de *Chuquiraga spinosa* "humanpinta". (100, 250 y 500 mg/kg) respecto al control negativo (NaCl 0,9%), evaluadas en sangre periférica y medula ósea de ratón, esto se evaluó mediante prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Por otra parte si se aprecia diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) del control positivo (ciclofosfamida 40 mg/kg) con el control negativo (NaCl 0,9%) y con los extractos, tanto en el análisis de sangre periférica como en medula ósea de ratón. Obteniendo como resultado final que el extracto no induce

significativamente la formación de micronúcleos en el animal de experimentación. Ya que la respuesta de la prueba se considerará positiva o indicador de daño cromosómico, si hay un aumento estadísticamente significativo en los eritrocitos micronucleados y el aumento es significativamente dependiente de la dosis, todo ello respecto al control negativo. Si no se cumple ninguna de las condiciones anteriores, la respuesta de prueba se clasifica como negativa.³¹ Cuando la sustancia genotóxica es expuesta a los ratones, se toman muestras 24 y 48 horas después. Debido a que los eritrocitos policromáticos aparecen en la circulación en este tiempo; su aparición o presencia indica la certeza de que los eritrocitos policromáticos micronucleados son originados por la exposición al agente probado. Los eritrocitos policromáticos son los eritrocitos jóvenes que posteriormente maduran a eritrocitos normocromáticos, y por esta razón, cuando son expuestos a genotóxicos en forma continua, es notable el incremento de eritrocitos micronucleados, por su acumulación.²²

El objetivo de la prueba de micronúcleos es identificar sustancias (líquidas o sólidas) que causan daño citogénético que da como resultado la formación de micronúcleos que contienen fragmentos de cromosomas rezagados o cromosomas completos. En el cual los animales se exponen a la sustancia de prueba por una ruta apropiada (generalmente mediante alimentación forzada usando un tubo estomacal o una cánula de intubación adecuada, o mediante inyección intraperitoneal). La médula ósea y/o las células sanguíneas se recogen, preparan y tiñen. Las preparaciones se analizan para determinar la presencia de micronúcleos, en cual es indicador de daño inducido por la sustancia de ensayo en los cromosomas o el aparato mitótico de eritroblastos.³¹

En el ensayo de micronúcleos se eligió usar como animal de prueba al ratón porque, el micronúcleo apenas se ve en la sangre periférica de ratas y humanos porque el bazo captura y destruye eritrocitos, incluidos micronúcleos, de manera rápida y efectiva. En los ratones, sin embargo, los eritrocitos micronucleados existen exactamente igual que las células normales en la sangre periférica lo que hace más fácil el conteo de los micronúcleos y provee menos errores a la prueba.²³ Además que en el ratón se presenta un número importante de eritrocitos micronucleados espontáneos, y se recomienda usarlo como un biomonitor de genotóxicos, mediante el conteo de eritrocitos policromáticos y reticulocitos en pruebas a corto tiempo y de exposición aguda a genotóxicos. En un estudio realizado para determinar la frecuencia de eritrocitos micronucleados

en 35 especies de mamíferos, con el objetivo de seleccionar a aquellas que presenten el mayor número de éstos, para proponerlos como probables biomonitores de daño genotóxico; mostró que las especies con valores más altos por cada 10,000 eritrocitos, son: el ratón con $21,4 \pm 6,5$; la jirafa con $18,0 \pm 0,0$ y el gato con $8,4 \pm 2,5$.²² todo ello intervino en la elección del ratón como biomonitor en la evaluación de la genotoxicidad mediante el ensayo de micronúcleos.

Otro aspecto importante a señalar es que el ensayo que utiliza médula ósea evalúa un efecto agudo de los productos químicos, pero el método que usa eritrocitos de sangre periférica de ratón puede evaluar un efecto crónico de la sustancia problema analizando los eritrocitos maduros que albergan micronúcleos hasta su vida.²³ por ende en la presente investigación se analizó el efecto genotóxico agudo y crónico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* "huamanpinta".

Se usó ciclofosfamida como inductor de micronúcleos o como control positivo porque estudios previos mencionan que es uno de los mejores diseños para inducir un número considerable de micronúcleos en células de la médula ósea de ratones, siendo estos resultados útiles para evaluar drogas con efecto antígenotóxico y pudiera servir también como control positivo en estudios de mutagénesis o genotoxicidad.³²

También es importante señalar que los compuestos genotóxicos afectan con mayor frecuencia a las células normales que proliferan rápidamente, como son las células epiteliales y de médula ósea; por lo tanto, existe un gran número de células susceptibles a estos efectos dañinos, y una causa por el daño con sustancias genotóxicas es la formación de micronúcleos en la células expuestas.¹⁷

Los micronúcleos (MN) son corpúsculos citoplasmáticos esféricos, detectados en interfase, más pequeños y con las mismas características morfológicas que el núcleo celular; se originan por pérdida de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros durante la división nuclear.²⁰ por ello se puede señalar que la presencia estadísticamente significativa de micronúcleos indican daño cromosómico y/o actividad genotóxica de la sustancia a la cual se está expuesta. Pero no olvidar que los micronúcleos también se incrementan de manera espontánea, se ve incrementada a mayor edad, sexo femenino, en déficit de folato y Vit B12, en procesos fisiológicos (menopausia y osteoporosis), etc.²¹

El conteo de los micronúcleos en los frotis de sangre periférica y e medula ósea se llevaron a cabo según los criterios de selección planteados por Zalacain et al.²¹ (tabla 1)

La ausencia de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* “huamanpinta”, se debe a que los componentes presentes no tienen efecto sobre los procesos hereditarios como reporta al evaluar el efecto genotóxico de los extractos fluidos de *Plantago lanceolata* L. (llantén menor) y *Matricaria recutita* L. (manzanilla).⁴

Se concluye que en las condiciones experimentales el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* “huamanpinta, no presentan efecto genotóxico en ratones, porque no llego a producir variación significativa del porcentaje de micronúcleos respecto al control negativo (NaCl 0,9%) en sangre y médula ósea de ratón y por otra parte según el resultado de la toxicidad aguda, se catalogó como No Clasificado según la metodología de la OMS y como Categoría 5 por la GHS, OECD, ubicándose en el rango de toxicidad de una $DL_{50} > 2000$ mg/kg de peso por lo que se considera de muy baja toxicidad vía oral.

VI. CONCLUSIONES

1. Se identificó la presencia de alcaloides, triterpenos, esteroides, saponinas, flavonoides, fenoles, lactonas, aminoácidos, quinonas y cardenólidos en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta".
2. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta" no presenta toxicidad aguda en ratones, según el modelo de dosis límite, ubicándose en el rango de toxicidad de una $DL_{50} > 2000$ mg/kg de peso corporal.
3. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta" no presenta efecto genotóxico por ensayo de micronúcleos.

VII. RECOMENDACIONES

- 1.** Desarrollar investigaciones de la toxicidad crónica y genotoxicidad en cultivos celulares con el "ensayo cometa" y/o ensayos *in vitro* para asegurar la inocuidad de la planta.
- 2.** Realizar estudios que propongan su conservación, propagación y uso racional.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Li E. El futuro de los productos andinos en la región alta y los valles centrales de los andes. Estado del arte del sector de plantas medicinales en Perú. Ministerio de la Producción. 2008.
2. García A, Ávila Y, Alonso L, López P, Ruiz A, Morón F. Reacciones adversas reportadas por consumo de productos naturales en Cuba durante 2003 y 2007. Revista Cubana de Plantas Medicinales [revista en Internet] 2009 [acceso febrero 2018]; 14(3): 1-11. Disponible en: <http://www.oalib.com/paper/2290449#.uznruah5PvE>.
3. Carballo, M, Cortada C, Galano A. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. Revista teoría, historia y fundamentos de la Ciencia [revista en Internet] 2005 [acceso febrero 2014]; 14(2): 95-108. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=29914211>.
4. Vizoso A, Ramos A, Villaescusa A, Décalo M, Betancourt J. Evaluación del efecto genotóxico en extractos fluidos de *Plantago lanceolata* "llantén menor" y *Matricaria recutita* "manzanilla". Rev Cubana Plant Med. 2000; 5(2): 59-63.
5. Chávez H, Molina A, Ramos R, Ferreyra C, Revatta L. Aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios bioactivos de Chuquiraga spinosa "huamanpinta". I Congreso Internacional y III Congreso Nacional de investigación científica tecnológica. Libro de resúmenes. Ica-Perú. 2011.
6. Casado R, Landa A, Calvo J, Garcia J, Marston A, Hostettmann K, Calvo M. Antiinflammatory, antioxidant and antifungal activity of *Chuquiraga spinosa*. Biol. Pharm. 2011; 49 (6): 620-626.
7. Ramírez E. Actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de Chuquiraga lessing "Huamanpinta" [Tesis para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
8. Condorhuamán M, Rojas L, Collado A, Contreras E, Ortiz J, Córdova J, Ruiz E, Herrera O. Toxicidad subcrónica y posible efecto teratogénico en ratas del extracto etanólico de *Chuquiraga spinosa* "huamanpinta". Ciencia e Investigación. 2016; 19(2): 74-78.
9. Cursi O. Toxicología. Editorial López librerías editores S.R.L. Buenos Aires Argentina. 1994.
10. Sponchiado G, Adam M, Dadalt C, Silva B, Mello-Sampayo D, Almeida C, Januário C, Fleith m. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review, Journal of Ethnopharmacology, 2016; 178, :289-296
11. Bermúdez D, Monteagudo E, Boffill M, Diaz L, Roca A, Betancourt E, Silveira E. Evaluation of acute toxicity of extracts of medicinal plants by an alternative testing. Revista electrónica de Veterinaria [En Línea] febrero 2018. <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n030307/030706.pdf>
12. Rivadeneira A. Cortés R, Marrero O, Pérez J, Olazábal E. Toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de la planta Chuquiraga jussieui, administrado vía oral en ratas. Rev. La Técnica. 2013; 30(5): 12-17.
13. Organización Mundial de la Salud. Guías para el asesoramiento y la regulación de las medicinas tradicionales, Ginebra; 2012.
14. Contreras C. Tamizaje fitoquímico y evaluación de los extractos bencénico, alcohólico y acuoso de las hojas de *Chuquiraga spinosa* "jarisirwi". Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga-Ayacucho. 2003.

15. Arenas, J. Marcha Fitoquímica y Efecto Diurético de *Chuquiraga spinosa* (Asteraceae) en *Cavia porcellus* (cobayos). Universidad Nacional San Agustín. Arequipa-Perú. 2000.
16. Torres M. Actividad antiinflamatoria prostática del extracto atomizado de la especie *Chuquiraga spinosa* “qarisirwi” en Canis familiares. Tesis de Químico Farmacéutico. Ayacucho-Perú. 2004.
17. Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Undécima edición. Edit. Mc Graw Hill Interamericana – México. 2007.
18. Bello J, López A. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Madrid: Díaz de Santos; 2001.
19. Repetto M, Repetto G. Toxicología fundamental. 4ª Edición. Madrid: Díaz de Santos; 2009.
20. Castillo E, Guevara M, Fujita R. Optimización del test de micronúcleos en linfocitos cultivados usando una metodología de gradiente y frotis. Rev.peru. biol. 2011; 18(2): 261-263.
21. Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. An. Sist. Sanit. Navar. 2005; 28(2): 227-236.
22. Cedano A, Martínez S, Escalera F, Salgado S, Carrillo F, Macías H, Peña B. La prueba de micronúcleos en sangre como bioindicador de genotóxicos. Abanico Veterinario. 2012; 2(2):43-54.
23. Hayashi M. The micronucleus test most widely used in vivo genotoxicity test. Genes and Environment. 2016; 38 (1): 18.
24. Arencibia D, Rosario L. Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos in vitro. Revista Iberoamericana de toxicología [En Línea] febrero 2018. http://www.sertox.com.ar/img/item_full/20003.pdf.
25. Hernández R, Fernández C. Baptista P. metodología de la investigación. 4a Ed. Editorial McGraw Gill Interamericana. México 2008.
26. Organization For Economic Cooperation and Development. “Acute Oral Toxicity-Acute toxic class methods”, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals and Health effects, Series on Testing and Assessment, No. 423, OECD Publishing, Paris.
27. Villar de Fresno M. Farmacognosia General. Editorial Síntesis. España. 1999.
28. Aguilar E. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunomoduladora. [Tesis de Maestría]. UNMSM. 2007.
29. Miranda M y Cuellar A. Manual de prácticas de Laboratorio: “Farmacognosia y Productos Naturales” Edit. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana Habana-Cuba. 2000.
30. Arroyo J, Cisneros C. Modelos experimentales de investigación farmacológica. Asdimor publicaciones SAC. 2012: 139-140
31. Organization For Economic Cooperatiun and Development. “Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test”, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals and Health effects, Series on Testing and Assessment, No. 474, OECD Publishing, Paris.
32. Arencibia D, Vidal A, Rosario L, Suárez Y, Delgado L. Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. VacciMonitor. 2011; 20(1):28-33.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de identificación botánica de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta". Ayacucho 2017.



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

C E R T I F I C A

Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, Srta. Lucy Leonor, AQUINO 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	:	Chuquiraga
ESPECIE	:	<i>Chuquiraga spinosa</i> (R.& P.) D. Don
N.V.	:	"huamanpinta"

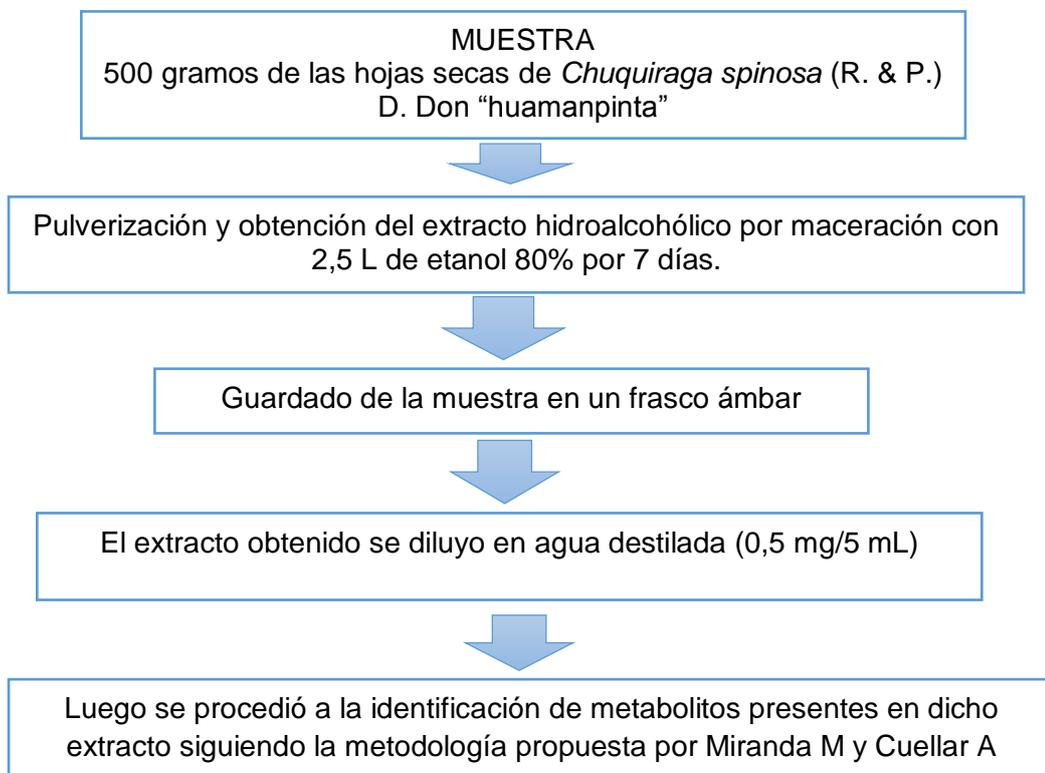
Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 14 de Julio del 2017

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

Dra. María Purificación Sánchez
JEFE

Anexo 2. Flujograma del procedimiento para la obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta" y tamizaje fitoquímico. Ayacucho 2018.



Anexo 3. Esquema de identificación fitoquímica propuesta por Miranda M y Cuellar A.

Metabolitos Secundarios	Ensayos con Reactivos	Resultados
		Observación
Alcaloides	Dragendorff	Hay formación de precipitado en todas las reacciones.
	Mayer	
	Hager	
	Wagner	
Lactonas y Cumarinas	Bajlet	Formación de una coloración roja.
Flavonoides	Shinoda	Hay coloración amarilla, naranja, carmelita o rojo en la fase amíllica.
Quinonas	Borntrager	Si es positivo la fase amoniacal es de color rojizo o rosada.
Catequinas	Catequinas	Coloración verde carmelita a luz UV, indica un ensayo positivo.
Saponinas	Espuma	Si es positivo hay formación de espuma en la superficie.
Azucres reductoras	Fehling	Si es positivo hay formación de precipitado rojo ladrillo.
Taninos y Fenoles	Cloruro Férrico	Formación de una coloración negruzca.
Aminas (aminoácidos)	Ninhidrina	Hay coloración azul violáceo.
Cardenólidos	Kedde	Coloración violácea.
Resinas	Resinas	Hay formación de precipitado.

Anexo 4. Hojas recolectadas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta". Ayacucho 2017.



Anexo 5. Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta". Ayacucho 2018.



Extracto filtrado y concentrado en baño maría

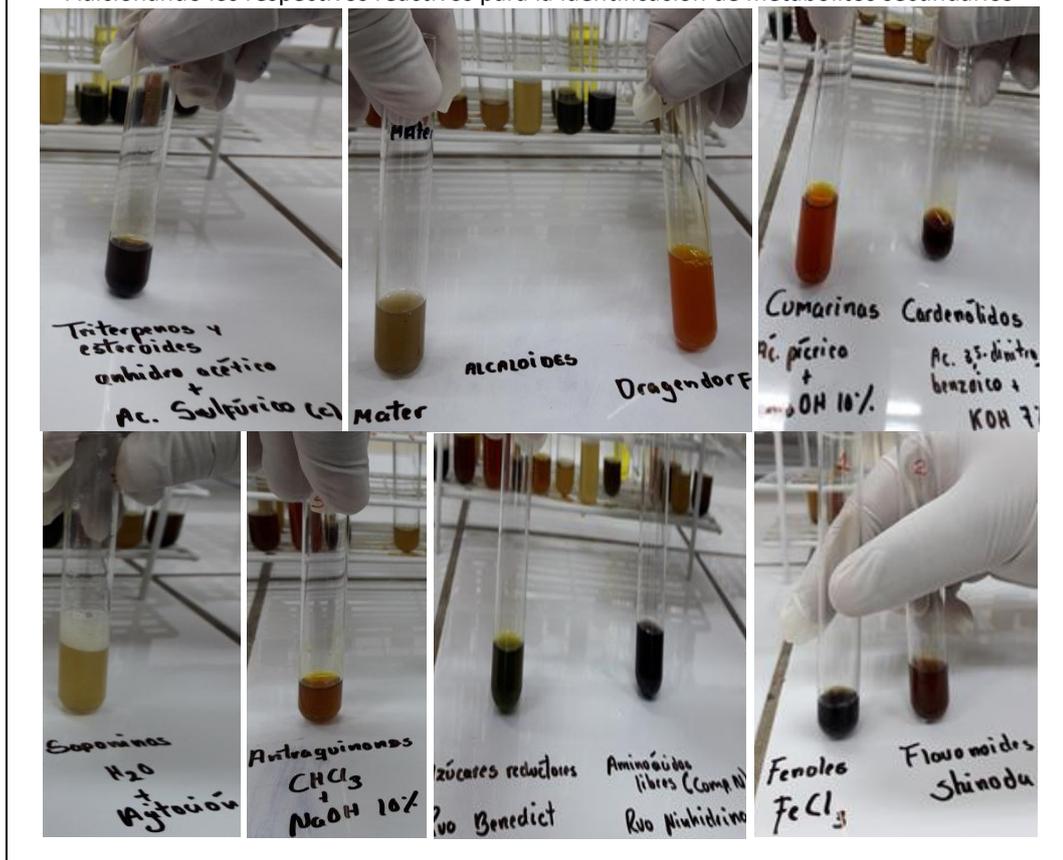


Extracto seco de de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta"

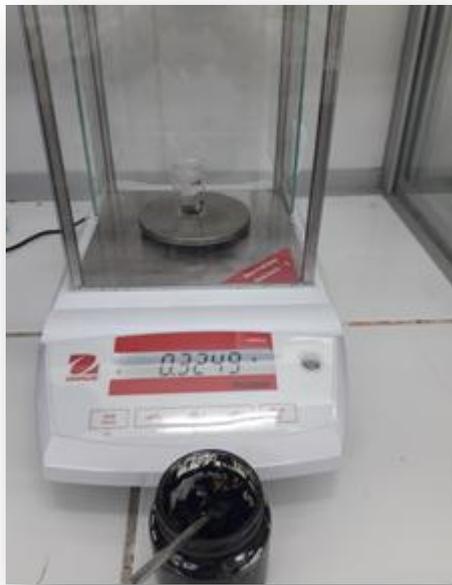
Anexo 6. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta" en el laboratorio de farmacognosia. Ayacucho 2018.



Adicionando los respectivos reactivos para la identificación de metabolitos secundarios



Anexo 7. Preparación de las concentraciones a ensayar del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta" en el laboratorio de toxicología. Ayacucho 2018.



Pesando el extracto seco



Diluyendo los extractos con agua destilada



Enrazando las respectivas diluciones

Anexo 8. Procedimiento de la determinación de la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta" en el laboratorio de toxicología. Ayacucho 2018.



Grupo control y grupo experimental



Pesaje de los animales



Administrando el extracto a 2000 mg/kg al grupo experimental y 0,3 mL de agua destilada al grupo control

Anexo 9. Procedimiento de la determinación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta" en el laboratorio de toxicología. Ayacucho 2018.



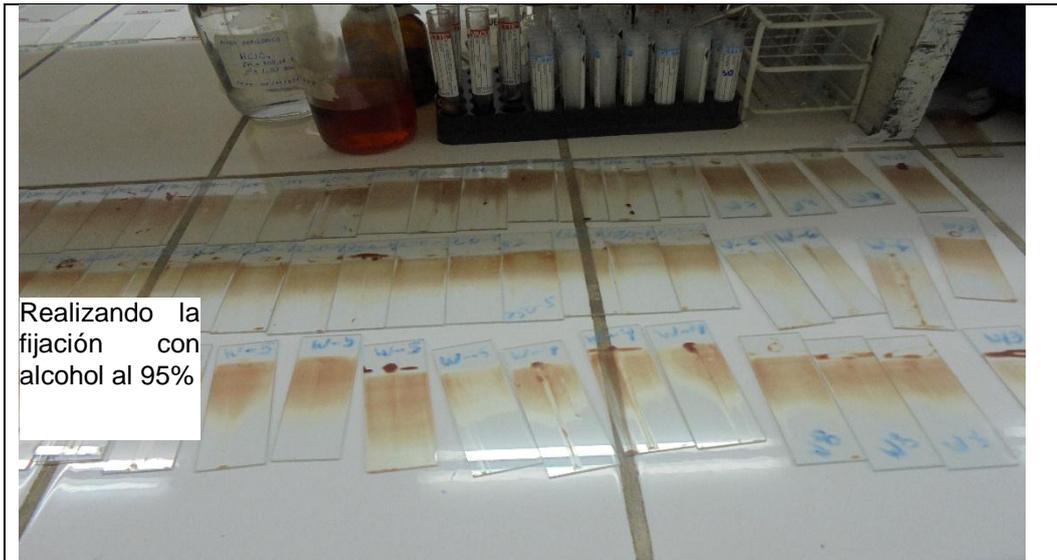
Distribución en forma aleatoria de los animales y pesaje de los mismos



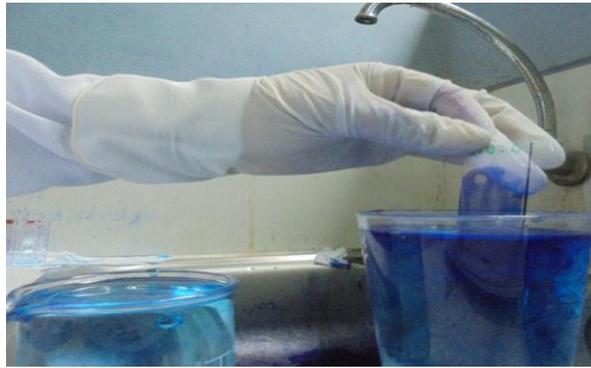
Administración de los tratamientos



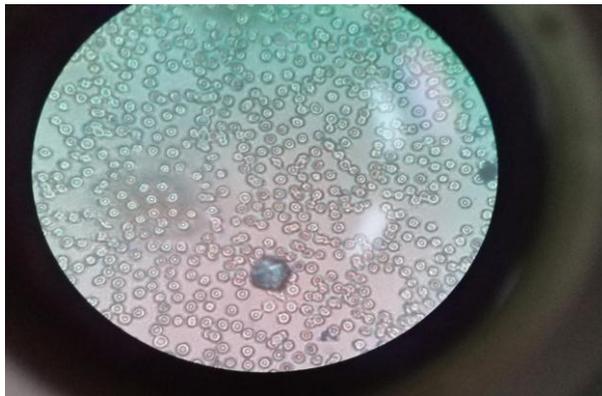
Obtención de la sangre para realizar el frotis en la lámina portaobjetos



Tinción con colorante Giemsa al 5% en agua corriente durante 10 minutos



Conteo de micronúcleos en el microscopio óptico a 400 aumentos



Anexo 10. Variación del peso de los animales administrados con extracto hidroalcohólico de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don “huamanpinta” por vía oral en la evaluación de la toxicidad aguda. Ayacucho 2018.

Sexo	Peso (g)				
	día 0	día 7	Δ peso	día 14	Δ peso
Macho (1)	29	32	3	36	4
Macho (2)	31	33	2	38	5
Macho (3)	29	31	2	35	4
Macho (4)	28	32	4	34	2
Macho (5)	30	32	2	38	6
Hembra (6)	24	27	3	30	3
Hembra (7)	26	28	2	33	5
Hembra (8)	28	31	3	34	3
Hembra (9)	26	30	4	32	2
Hembra (10)	24	27	3	29	2

Tabla 11. Variación del peso de los animales usados como control en la evaluación de la toxicidad aguda de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta". Ayacucho 2018.

Sexo	Peso (g)				
	día 0	día 7	Δ peso	día 14	Δ peso
Macho (1)	27	31	4	34	3
Macho (2)	27	30	3	35	5
Macho (3)	32	35	3	37	2
Macho (4)	32	36	4	39	3
Macho (5)	28	31	3	35	4
Hembra (6)	25	27	2	30	3
Hembra (7)	22	25	3	29	4
Hembra (8)	26	27	1	30	3
Hembra (9)	27	29	2	31	2
Hembra (10)	26	28	2	31	3

Anexo 12. Resultados del ensayo de micronúcleos en eritrocitos y médula ósea de ratón por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don “huamanpinta”. Ayacucho 2018.

Tratamientos	Células analizadas	Número de micronúcleos	% de micronúcleos ±DE
Sangre periférica			
Control negativo NaCl 0,9% 10 mL/kg	24000	24	0,1000
Ciclofosfamida 40 mg/kg	24000	197	0,821
Extracto 100 mg/kg	24000	25	0,104
Extracto 250 mg/kg	24000	31	0,129
Extracto 500 mg/kg	24000	30	0,125
Médula ósea			
Control negativo NaCl 0,9% 10 mL/kg	24000	23	0,096
Ciclofosfamida 40 mg/kg	24000	211	0,879
Extracto 100 mg/kg	24000	27	0,113
Extracto 250 mg/kg	24000	28	0,117
Extracto 500 mg/kg	24000	26	0,108

Anexo 13. Prueba T del peso corporal de ratones al administrar 2000 mg/kg de peso corporal del extracto hidroalcohólico de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don "huamanpinta". Ayacucho 2018.

Prueba de muestras independientes										
7 días		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
peso (g)	Se han asumido varianzas iguales	1,380	0,255	0,305	18	0,764	0,40	1,31233	-2,35	3,157
	No se han asumido varianzas iguales			0,305	15,180	0,765	0,40	1,31233	-2,39	3,194

Prueba de muestras independientes										
14 días		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
peso (g)	Se han asumido varianzas iguales	0,63	0,44	0,56	18,00	0,58	0,80	1,44	-2,22	3,82
	No se han asumido varianzas iguales			0,56	17,79	0,58	0,80	1,44	-2,22	3,82

Anexo 14. Análisis de varianza del porcentaje de micronúcleos en la evaluación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don “huamanpinta” en sangre periférica. Ayacucho 2018.

ANOVA

Micronúcleos (%)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3,197	4	0,799	335,220	0,000
Dentro de grupos	0,083	35	0,002		
Total	3,281	39			

Anexo 15. Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett del porcentaje de micronúcleos en la evaluación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don “huamanpinta” en sangre periférica. Ayacucho 2018.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Micronúcleos (%)

T de Dunnett (bilateral)^a

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Ciclofosfamida 40 mg/Kg	Control negativo (NaCl 0,9%)	0,720838*	0,024416	0,000	0,65838	0,78329
Extracto 100 mg/Kg	Control negativo (NaCl 0,9%)	0,004162	0,024416	0,999	-0,05829	0,06662
Extracto 250 mg/Kg	Control negativo (NaCl 0,9%)	0,029150	0,024416	0,579	-0,03330	0,09160
Extracto 500 mg/Kg	Control negativo (NaCl 0,9%)	0,025000	0,024416	0,697	-0,03745	0,08745

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

Anexo 16. Análisis de varianza del porcentaje de micronúcleos en la evaluación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don “huamanpinta” en médula ósea. Ayacucho 2018.

ANOVA

Micronúcleos (%)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3,805	4	0,951	1147,500	0,000
Dentro de grupos	0,029	35	0,001		
Total	3,834	39			

Anexo 17. Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett del porcentaje de micronúcleos en la evaluación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don “huamanpinta” en medula ósea. Ayacucho 2018.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Micronúcleos (%)

T de Dunnett (bilateral)^a

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Ciclofosfamida 40 mg/Kg	Control negativo (NaCl 0,9%)	0,7833500*	0,0143957	0,000	0,746527	0,820173
Extracto 100 mg/Kg	Control negativo (NaCl 0,9%)	0,0166625	0,0143957	0,604	-0,020160	0,053485
Extracto 250 mg/Kg	Control negativo (NaCl 0,9%)	0,0208375	0,0143957	0,413	-0,015985	0,057660
Extracto 500 mg/Kg	Control negativo (NaCl 0,9%)	0,0125125	0,0143957	0,798	-0,024310	0,049335

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

Anexo 18. Matriz de consistencia. Ayacucho 2017.

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	MARCO TEORICO	VARIABLE	DISEÑO METODOLOGICO
Toxicidad aguda y genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don. "huamanpinta". Ayacucho 2017.	¿Presentará toxicidad aguda y genotoxicidad el extracto hidroalcohólico de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don. "huamanpinta".?	<p>Objetivo general. Evaluar la toxicidad aguda y el efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don "huamanpinta".</p> <p>Objetivos específicos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Caracterizar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don "huamanpinta". • Evaluar la toxicidad aguda por el método de dosis límite del extracto hidroalcohólico de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.)D. Don "huamanpinta". • Comparar el efecto genotóxico a diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.)D. Don "huamanpinta". 	<p>Hi: El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don "huamanpinta" no presenta efecto tóxico ni genotóxico en ratones.</p>	<p><i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don "huamanpinta" Descripción botánica. Habitad y distribución Composición química. Usos tradicionales</p> <p>Toxicidad. Toxicidad aguda</p> <p>Genotoxicidad Mecanismos de genotoxicidad</p> <p>Micronúcleos. Método para evaluar la toxicidad aguda y genotoxicidad Método de dosis límite Test de micronúcleos Criterios de selección Factores de variabilidad Utilidad del test de micronúcleos</p>	<p>Variable independiente Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don "huamanpinta"</p> <p>Indicador: Extracto a 2000 mg/kg para toxicidad aguda y Extracto a 100, 250 y 500 mg/kg para genotoxicidad</p> <p>Variable dependiente Toxicidad aguda y genotoxicidad</p> <p>Indicador:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Signos de toxicidad y variación de peso corporal • % de micronúcleos 	<p>Tipo de investigación: Básico-Experimental</p> <p>Población: Hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don "huamanpinta" que crece a 3150 msnm en el distrito de Vinchos-Ayacucho.</p> <p>Tipo de muestreo: por conveniencia</p> <p>Muestra: 2 kg de hojas de <i>Chuquiraga spinosa</i> (R. & P.) D. Don "huamanpinta"</p> <p>Unidad experimental: Ratones de ambos sexos</p> <p>Determinación de la toxicidad aguda Se realizó por el método de dosis límite descrito por la OCDE.</p> <p>Determinación de la genotoxicidad. Mediante el test de micronúcleos.</p> <p>Análisis de datos: Los datos obtenidos se expresaron en forma de medias y desviación estándar, y se representaron mediante tablas y figuras. La significancia estadística del peso corporal de los ratones, se estimaron haciendo uso de la prueba Dunnett al igual que el % de micronúcleos con un nivel de confianza del 95%, utilizando el software SPSS versión 22.</p>

