

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE
HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE
FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



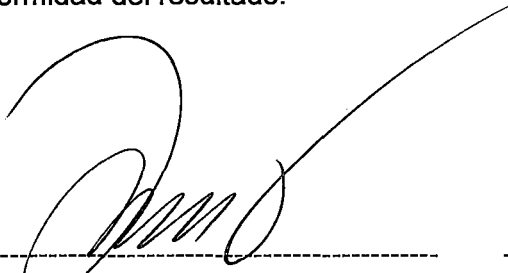
**Efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales
antibacterianas *Spartium junceum* L. “retama”,
Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze “tara” y *Eucaliptus
globulus* Labill “eucalipto”. Ayacucho - 2013.**

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

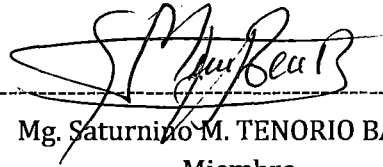
**PRESENTADO POR:
Bach. AYALA PÉREZ, ERIKA
AYACUCHO – PERÚ**

2014

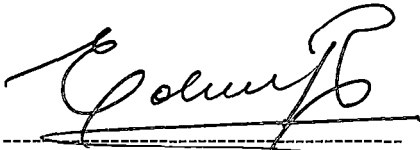
Se culminó el acto siendo las seis (06) de la tarde, firmando al pie en conformidad del resultado.



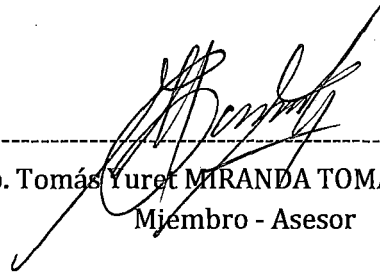
Dr. Segundo Tomás CASTRO CARRANZA
Decano - Presidente



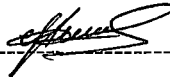
Mg. Saturnino M. TENORIO BAUTISTA
Miembro



Dr. Edwin Carlos ENCISO ROCA
Miembro



Blgo. Tomás Yuret MIRANDA TOMASEVICH
Mjembro - Asesor



Blgo. Elbert HERMOZA VALDIVIA
Secretario - Docente

DEDICATORIA

A Dios por permitirme culminar una etapa más en el ámbito académico, a mis maravillosos padres y hermanos por su apoyo y cariño incondicional.

AGRADECIMIENTO

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

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

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

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

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

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

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. <i>Spartium junceum</i> L. "retama"	9
2.3. <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara"	11
2.4. <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto"	14
2.5. Bacterias grampositivas: <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.6. Modelo tridimensional del ADN	18
2.7. Cuantificación y determinación de pureza de ADN	20
2.8. Evaluación de genotoxicidad	20
2.9. Electroforesis en gel	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Lugar de trabajo de investigación	24
3.2. Población y muestra	24
3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos	25
3.3.1. Recolección de muestra	25
3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico	25
3.3.3. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico	26
3.4. Extracción de ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.5. Cuantificación de ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i>	27
3.5.1. Espectrofotometría	27
3.5.2. Electroforesis	28
3.6. Ensayos de la genotoxicidad <i>in vitro</i>	29
3.7. Análisis de datos	31
IV. RESULTADOS	33

V.	DISCUSIÓN	49
VI.	CONCLUSIONES	56
VII.	RECOMENDACIONES	57
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
IX.	ANEXOS	61

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Preparación de las diluciones de ADN a diferentes concentraciones para patrones de banda en electroforesis. Ayacucho, 2013.	28
Tabla 2. Preparación de las soluciones para la prueba de genotoxicidad <i>in vitro</i> . Ayacucho, 2013.	30
Tabla 3. Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.	31
Tabla 4. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Spartium junceum</i> L. "retama". Ayacucho, 2013.	34
Tabla 5. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara". Ayacucho, 2013.	35
Tabla 6. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto". Ayacucho, 2013.	36
Tabla 7. Cuantificación de ADN genómico extraído de <i>Staphylococcus aureus</i> por espectrofotometría ultra violeta. Ayacucho, 2013.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Electroforesis del ADN genómico extraído de <i>Staphylococcus aureus</i> . Ayacucho, 2013.	38
Figura 2. Electroforesis de patrones de bandas de ADN genómico extraído de <i>Staphylococcus aureus</i> . Ayacucho, 2013.	39
Figura 3. Electroforesis de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Spartium junceum</i> L. "retama". Ayacucho, 2013.	40
Figura 4. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Spartium junceum</i> L. "retama", a una hora de incubación. Ayacucho, 2013.	41
Figura 5. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Spartium junceum</i> L. "retama", a cuatro horas de incubación. Ayacucho, 2013.	42
Figura 6. Electroforesis de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara". Ayacucho, 2013.	43
Figura 7. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara", a una hora de incubación. Ayacucho, 2013.	44
Figura 8. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara", a cuatro horas de incubación. Ayacucho, 2013.	45
Figura 9. Electroforesis de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Eucaliptus globulus</i> Labill "eucalipto". Ayacucho, 2013.	46
Figura 10. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Eucaliptus globulus</i> Labill "eucalipto", a una hora de incubación. Ayacucho, 2013.	47
Figura 11. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Eucaliptus globulus</i> Labill "eucalipto", a cuatro horas de incubación. Ayacucho, 2013.	48

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de clasificación taxonómica de <i>Spartium junceum</i> L. "retama". Ayacucho, 2013.	62
Anexo 2. Certificado de clasificación taxonómica de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara". Ayacucho, 2013.	63
Anexo 3. Certificado de clasificación taxonómica de <i>Eucaliptus globulus</i> Labill "eucalipto". Ayacucho, 2013.	64
Anexo 4. Esquema de la obtención del extracto hidroalcohólico y tamizaje fitoquímico de retama, tara y eucalipto para evaluar la genotoxicidad. Ayacucho, 2013.	65
Anexo 5. Características producidas en los ensayos para la identificación de los metabolitos secundarios.	66
Anexo 6. Secado a temperatura ambiente de las flores de <i>Spartium junceum</i> L. "retama", vainas de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y hojas de <i>Eucaliptus globulus</i> Labill "eucalipto". Ayacucho, 2013.	67
Anexo 7. Tamizaje fitoquímico (reacción de Shinoda) del extracto hidroalcohólico de <i>Spartium junceum</i> L. "retama", <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y <i>Eucaliptus globulus</i> Labill "eucalipto". Ayacucho, 2013.	68
Anexo 8. Cultivo de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y obtención del ADN genómico para la evaluación de genotoxicidad de plantas medicinales en estudio. Ayacucho, 2013.	69
Anexo 9. Cuantificación por espectrofotometría UV de ADN genómico extraída de <i>Staphylococcus aureus</i> , para la evaluación de genotoxicidad de plantas medicinales en estudio. Ayacucho, 2013.	70
Anexo 10. Ensayo <i>in vitro</i> y electroforesis en gel de agarosa al 1%, para la evaluación de genotoxicidad de plantas medicinales en estudio. Ayacucho, 2013.	71
Anexo 11. Registro fotográfico de la genotoxicidad de plantas medicinales evaluadas. Ayacucho, 2013.	72
Anexo 12. Valores numéricas del grado de genotoxicidad de las	73

plantas medicinales en estudio, según la concentración del extracto hidroalcohólico y tiempo de incubación. Ayacucho, 2013.

- Anexo 13. Resultados de la prueba de Mann-Whitney, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la flor de *Spartium junceum* L. “retama”, según el tiempo de incubación. Ayacucho 2013. 74
- Anexo 14. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la flor de *Spartium junceum* L. “retama”, según la concentración. Ayacucho, 2013. 75
- Anexo 15. Resultados da la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la flor de *Spartium junceum* L. “retama”, según la concentración a dos tiempos de incubación. Ayacucho, 2013. 76
- Anexo 16. Resultados de la prueba de Mann-Whitney, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la vaina de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara”, según el tiempo de incubación. Ayacucho, 2013. 77
- Anexo 17. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la vaina de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara”, según la concentración. Ayacucho, 2013. 78
- Anexo 18. Resultados da la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la vaina de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara”, según la concentración a dos tiempos de incubación. Ayacucho, 2013. 79
- Anexo 19. Resultados de la prueba de Mann-Whitney, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la hoja de *Eucaliptus globulus* Labill “eucalipto”, según el tiempo de incubación. Ayacucho, 2013. 80
- Anexo 20. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la hoja de *Eucaliptus globulus* Labill “eucalipto”, según la 81

concentración. Ayacucho, 2013.

- Anexo 21. Resultados da la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la hoja de *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto".según la concentración a dos tiempos de incubación. Ayacucho, 2013 82
- Anexo 22. Matriz de consistencia. 83

Resumen

Los estudios de genotoxicidad, se realizan con el fin de identificar posibles daños para el ser humano, debido a que se ha detectado extractos de plantas medicinales que poseen actividad embriotóxica, teratogénica, mutagénica y carcinogénica, con una correlación positiva entre la ocurrencia de enfermedades y su consumo. Los objetivos planteados fueron determinar el efecto genotóxico *in vitro* de las plantas medicinales antibacterianas: flores de *Spartium junceum* L. "retama", vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y hojas de *Eucaliptus globulus* Labill. "eucalipto", e identificar sus metabolitos secundarios. Este estudio descriptivo, se desarrolló en el laboratorio de Farmacognosia y 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 2013 y marzo del 2014 en la ciudad de Ayacucho. Los extractos hidroalcohólicos fueron obtenidos con alcohol a 80°, realizándose el tamizaje fitoquímico y la determinación genotóxica a diferentes concentraciones, exponiéndose éstos sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*; la estimación del daño genotóxico *in vitro* fue determinado con el "método Tomasevich", mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% y visualizado en radiación de luz ultra violeta dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra UVsolo TS. Los metabolitos secundarios identificados fueron: alcaloides, lactonas y/o cumarinas, taninos, flavonoides y quinonas. Los extractos hidroalcohólico presentaron una importante actividad genotóxica sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, siendo los extractos de "tara" y "eucalipto" con mayor efecto genotóxico a concentraciones de 50 mg/mL y 100 mg/mL con respecto a la "retama". Se concluye que el daño genotóxico depende directamente de la concentración de los extractos hidroalcohólico; mas no así del tiempo de incubación, a excepto del extracto de "retama" que depende de este tiempo.

Palabras clave: Genotoxicidad, *Staphylococcus aureus*, *Spartium junceum* L., *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, *Eucaliptus globulus* Labill.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un gran interés por los complementos alimenticios de origen vegetal, ya que se cree que dichos productos tienen la capacidad de disminuir los factores de riesgo para casi todas las enfermedades; esto permite que tengan una amplia acogida entre los consumidores que a menudo consideran que lo "natural" está libre de compuestos químicos y por lo tanto es "seguro" para la salud; premisa que debe reconsiderarse y controlarse conociendo de antemano que muchos ingredientes de origen botánico contienen toxinas que incluso pueden tener efectos genotóxicos, pues la integridad del ADN constituye un aspecto fundamental para la salud.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

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 teratogénica, y se ha reportado actividad mutagénica y carcinogénica en productos de origen vegetal (flavonoides y

taninos), encontrándose que existe una correlación positiva entre la ocurrencia de enfermedades y tumores en la población.³

Los compuestos genotóxicos producen efectos que pueden manifestarse en el propio individuo o en su descendencia originando enfermedades genéticas. Tales razones justifican que las investigaciones de genotoxicidad sean tan necesarias y en este sentido se amplían los conocimientos de *Spartium junceum* L. "retama", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto" respecto a los posibles efectos perjudiciales. Estas plantas han sido usadas en la medicina tradicional en el tratamiento de diversas afecciones respiratorias, las mismas que fueron demostradas por trabajos de investigación. El daño genotóxico *in vitro* fue evaluado con el "método Tomasevich", mediante electroforesis en gel de agarosa, utilizando el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*.

Como parte del estudio farmacológico y toxicológico de estas plantas, en el presente trabajo se formuló los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Evaluar el efecto genotóxico *in vitro* de las plantas medicinales antibacterianas *Spartium junceum* L. "retama", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto".

Objetivos Específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en las plantas medicinales antibacterianas *Spartium junceum* L. "retama", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto".
- Caracterizar el efecto de la genotoxicidad de las plantas medicinales antibacterianas en estudio, con ensayos *in vitro* sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus* mediante electroforesis.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

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

Miranda et al en el año 1994 realizaron un estudio fitoquímico y farmacológico de las flores de *Spartium junceum* "retama", se detectó la presencia de: alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos libres y taninos. La actividad antimicrobiana (técnica de Kirby Bauer) fue demostrada sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus* alfa y beta hemolíticos, mostrando mayores efectos con los extractos del machacado fresco y transpirado de la flor, mas no así de la flor seca molida, ni extractos acuoso y etanólico. Frente a los enteropatógenos *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophyla*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella tiphy*, *Shigella dysenteriae* y Klebsiella, no presenta actividad antimicrobiana.⁴

Cconocc en el año 2004 determinó y comparó la actividad inhibitoria del extracto acuoso de la flor de *Spartium junceum*, "retama" y la ampicilina USP frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, se encontró diferencia significativa entre la CMI de la ampicilina USP, 0,125 µg/mL; y la CMI del extracto acuoso de la flor de *Spartium junceum*, 12,0 µg/mL, indicándose mayores purificaciones de los principios bioactivos de este extracto. La determinación de los principios

activos responsables de la actividad inhibitoria sobre *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 son los flavonoides, taninos gálicos y compuestos fenólicos.⁵

Añanca en el año 2009 determinó el efecto antibacteriano del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa*, en concentraciones que corresponden a 17,5; 16,25; 15; 13,75; 12,5; 11,25; 10; 8,75; 7,5; 6,25 µg/mL, en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, usando inóculos estandarizados con el Nefelómetro de McFarland N° 0.5. Se encontró efecto sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* cuyo CMI fue de 12,5 µg/mL y la CMB fue de 15 µg/mL, mientras que frente a *Staphylococcus pyogenes* la CMI fue de 13,7 µg/mL y la CMB fue de 16,25 µg/mL. Se determinó que el extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* "tara" tiene actividad antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus pyogenes*.⁶

Kloucek et al en el año 2005 realizaron un ensayo antibacteriano sobre extractos etanólicos al 80% de nueve plantas obtenidos por maceración durante cinco días, una de las muestras ensayadas fue las vainas de *Caesalpinia spinosa*; se utilizaron cinco cepas Gram positivas y tres Gram negativas usando el método de microdilución del caldo de cultivo (broth microdilution). Los resultados son poco relevantes para la muestra mencionada a excepción del ensayo contra *Enterococcus faecalis* en el que se observó una CMI de 0,5 µg/mL, mientras que para *Bacillus cereus* fue de 8 µg/mL y de 16 µg/mL para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacteroides fragilis*.⁷

López en el año 1998 demostró la actividad antimicrobiana *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* "tara" bajo la forma de uso popular (cocimiento) contra bacterias Gram positivo y Gram negativo, *Candida albicans*, *Penicillium sp* y *Aspergillus sp*. El tamizaje fitoquímico del extracto de las vainas que mostraron altas concentraciones de taninos, fueron provenientes de Ayacucho y Cajamarca, no así las de Churin. Los vainas y semillas procedentes de

Ayacucho y Cajamarca, mostraron alta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se concluyó que la presencia de taninos, flavonoides, alcaloides y péptidos son los responsables de la acción antimicrobiana de la tara.⁸

Liu et al en el año 2002 evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de *Caesalpinia spinosa* "tara" y *Eucalyptus sp.* "eucalipto" utilizando cepas bacterianas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* y *Shigella flexneri*). Utilizó como solvente de extracción una mezcla de alcohol-acetona (1:1) y la actividad biológica de los extractos obtenidos se evaluó mediante la técnica de difusión en disco. La vaina de *Caesalpinia spinosa* y las hojas del *Eucalyptus sp.* mostraron una actividad selectiva sobre las bacterias Gram positivas evaluadas.⁹

Damjanovic et al en el año 2011 realizaron un estudio con *Eucalyptus globulus Labill* en Montenegro, analizaron por gas cromatografía-espectrometría de masas y su actividad antimicrobiana se evaluó contra 17 microorganismos, incluyendo bacterias que causan intoxicación alimentaria y el deterioro. Los resultados en la identificación de un total de 11 constituyentes, cineol (85,8%), α -pineno (7,2%) y β -mirceno (1,5%) son los componentes principales y los ensayos de actividad antimicrobiana reveló que el aceite esencial de *Eucalyptus globulus Labill* tiene lugar una fuerte actividad antimicrobiana, especialmente contra *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*. La CMI reveló la menor actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella infantis* (3,13 mg/mL) mientras que la mayor actividad fue contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus pyogenes* (0,09 mg/mL).¹⁰

Orihuela et al en el año 2012 evaluaron el efecto citotóxico y genotóxico del extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* "tara" en células del meristemo radicular

de *Allium cepa* "cebolla", utilizaron vainas de "tara" colectadas en la provincia de Tarma, Junín. Se hicieron diluciones al 0,01%; 0,1% y 1% con las cuales fueron tratados bulbos de cebolla durante tres días. El control positivo fue CuSO_4 0,01 M y el control negativo fue agua potable esterilizada con radiación UV. La citotoxicidad se evidenció mediante la diferencia de longitudes de las raíces antes y después de los tratamientos. Luego, con dichas raíces se hicieron preparaciones citogenéticas que permitan evidenciar la genotoxicidad mediante daños visibles en la cromatina. La citotoxicidad se cuantificó mediante porcentajes de inhibición de crecimiento de raíces, los cuales fueron de 27,63%; 83,33% y 94,30% para las concentraciones 0,01%; 0,1% y 1%, respectivamente. Para la genotoxicidad, el porcentaje de células normales fue de 75% y 14 % para las concentraciones 0,01% y 1%, respectivamente. Se concluye que el extracto acuoso de "tara" produce citotoxicidad en raíces de cebolla, directamente proporcional a la concentración, y la genotoxicidad del extracto es mayor a concentraciones de 0,1% y 1%.¹¹

Miyamoto et al en el año 2009 evaluaron la genotoxicidad del aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, usando un ensayo de segregación somática y una cepa diploide de los hongos *Aspergillus nidulans*, heterocigotos para los marcadores nutricionales y de color de conidios. Los principales compuestos de la muestra actual de aceite esencial fueron eucaliptol (49,0%), α -pineno (8,9), β -pineno (1,5), globulol (6,9), α -eudesmol (1,12), spathulenol (1,42), γ -cadineno (1,45), trans- β -elemenone (1,23) y aromandendrene (2,3), por un total de 74% de aceite. Aceite en 0,12 y 0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ fue encontrado para aumentar la inestabilidad mitótica de la cepa diploide original y el número de recombinantes mitóticos diploides de *Aspergillus nidulans*. La genotoxicidad del aceite se asoció con la inducción de sobrecruzamiento mitótico.¹²

Reynoso en el año 2011 evaluó la genotoxicidad utilizando la prueba de cometa en linfocitos humano y en los núcleos estaminales de *Tradescantia* (*Tradescantia subacaulis* y *Tradescantia hirsutiflora*) a concentraciones de (0,01; 0,1; 0,5 y 1,0 mM). La migración de la cauda en linfocitos humanos expuestos a los extractos de *Lupinus mexicanus* (6,17 a 6,75 μ), lupanina (3,44 a 5,94 μ) y flavonoides (2,54 a 2,68 μ), fue mayor estadísticamente al testigo negativo ($p < 0,01$), y por tanto, mostraron actividad genotóxica, en todas las concentraciones. La migración de la cauda en los núcleos estaminales de *Tradescantia* expuestos a los extractos de *Lupinus mexicanus* (19,12 a 25,99 μ), *Lupinus montanus* (15,29 a 24,28 μ) y la lupanina (12,33 a 32,06 μ) mostraron significancia estadística ($p < 0,01$) respecto al testigo negativo y por tanto, genotoxicidad en todas las concentraciones. Es clara la genotoxicidad detectada, principalmente en las concentraciones (0,01 y 0,1 mM).¹³

Guevara et al en el año 2008 evaluaron el extracto fluido obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. en un sistema de ensayo a corto plazo *in vitro* utilizando *Aspergillus nidulans* cepa UH-223 para conocer la potencialidad del extracto como reductor del crecimiento de las colonias e inductor de daño genético en este microorganismo. Los estudios se realizaron por el método de incorporación en placa y como resultado se obtuvo una disminución considerable del tamaño de las colonias del microorganismo a causa del efecto tóxico del extracto y a su vez aumentó el índice de segregación mitótica como expresión de genotoxicidad para el microorganismo de ensayo, se obtuvieron valores incluso superiores al control positivo utilizado.¹⁴

Brugés et al en el año 2007 realizaron una evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. a la cual se evaluó la toxicidad de extractos y fracciones utilizando como organismos de prueba *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* y *Artemia salina*. La actividad biológica

fue evaluada mediante la prueba de sensibilidad a antimicrobianos y la genotoxicidad con el ensayo Cometa. Los ensayos de toxicidad aguda con los organismos de prueba muestran que los extractos acuosos son prácticamente no tóxicos (CL50 >1000 ppm). Los extractos etanólicos y las fracciones de acetato de etilo y cloroformo presentaron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* que puede ser atribuida a los metabolitos secundarios (terpenoides, flavonoides) que están presentes en esta especie. 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).¹⁵

Carballo et al en el año 2005 realizaron un estudio a nivel genotóxico de las plantas medicinales: *Chenopodium multifidum* L. (Chenopodiaceae); *Lithraea molleoides* Vell. Engl. (Anacardiaceae); *Styphnolobium japonicum* L Schott. (Fabaceae); *Prosopis alba* Gris (Mimosaceae); *Schkuhria pinnata* (Lam.) (Asteraceae); *Solanum sysimbriifolium* Lam. (Solanaceae), mediante el ensayo de electroforesis de una sola célula. Se determinó que cuatro de ellas, *Chenopodium multifidum* (paico); *Schkuhria pinnata* (canchalagua), *Solanum sysimbriifolium* (espino colorado) y *Lithraea molleoides* (molle de beber), indujeron daño al ADN, induciendo roturas de cadena simple y doble.¹⁶

2.2. *Spartium junceum* L. “retama”.

2.2.1. Clasificación taxonómica

Se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Rosidae
Orden	:	Fabales
Familia	:	Papilionaceae
Género	:	<i>Spartium</i>
Especie	:	<i>Spartium junceum</i> L.
Nombre vulgar	:	“retama”

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

2.2.2. Descripción botánica

Arbusto alto, que puede alcanzar los 5 m de altura, muy ramificados con ramas de aspecto junciforme: verde y aparentemente sin hojas. De hecho las hojas son pequeñas y lanceoladas o lineares y se caen rápidamente. Inflorescencia, las flores dispuestas en racimos laxos, ubicados en las puntas de las ramas. Las flores son grandes de más de 2 cm, de color amarillo muy vivo que crecen de la parte superior de las ramas y que hacen inconfundible a esta especie. Además la reconocemos porque el cáliz parece estar formado por una sola pieza, sin dientes, que abraza la flor por debajo y se abre por arriba. Los frutos son unas legumbres muy comprimidas que se vuelven de color negro al madurar. Semillas casi circulares, de color café-rojizo y con la superficie porosa. Puede florecer en diferentes momentos del año aunque la floración principal se da a finales de primavera.¹⁷

2.2.3. Distribución geográfica

Esta especie no es propia de nuestra flora, es de origen mediterráneo. Su distribución geográfica abarca desde México hasta Bolivia. En el Perú se encuentra en mayor cantidad en las regiones de Loreto, Amazonas y Junín.¹⁷

2.2.4. Usos en la medicina tradicional

La raíz, corteza del tallo, flor y semilla constituyen material farmacéutico con propiedades amargas, laxantes y poco eméticas. Soasando las flores y aplicando en forma de cataplasma en la frente y cerebro, alivian los dolores de cabeza, el cocimiento de las flores se usa como diurético.¹⁸

Las flores en forma de sauma, inhalando los vapores alivian afecciones nasales conocidas como sinusitis, la cual se manifiesta con expulsión de gran cantidad de mucosidad nasal.¹⁹

2.2.5. Composición química

Presenta alcaloides como la esparteína y citisina. En la corteza y las ramas se encuentra un alcaloide llamado retamina que se encuentra en una concentración del 0,4%, así como otro denominado paquicarpina que es, en realidad, la d-esparteína, estructuralmente afín al anterior. Sus flores contienen un alcaloide cardiotónico. Presenta alcaloides como la esparteína y citisina.²⁰

Los flavonoides compuestos fenólicos, son en su mayoría pigmentos responsables de la coloración de numerosas flores y de algunos frutos. La importancia de los taninos que tienen la propiedad de precipitar alcaloides y proteínas.⁵

2.2.6. Estudios farmacológicos

La acción de esta planta y, sobre todo, de la esparteína sobre el corazón ha sido muy discutida en términos médicos sin embargo las propiedades diuréticas de las flores a las que también se atribuyen propiedades purgantes están comprobadas por su gran eficacia. La esparteína, bloquea la transmisión al

impedir la despolarización de la membrana pos sináptica, tiene también actividad oxitócica aumentando ligeramente el tono y la potencia de las contracciones uterinas. La importancia de los taninos está ligada a sus propiedades al precipitar las proteínas, originando un efecto antimicrobiano y antifúngico.²⁰

2.3. *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara”.

2.3.1. Clasificación taxonómica

Se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Sub clase	:	Rosidae
Orden	:	Fabales
Familia	:	Caesalpinaceae
Género	:	Caesalpinia
Especie	:	<i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze
Nombre Vulgar	:	“tara”

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

2.3.2. Descripción botánica

Es un árbol pequeño, de dos a tres metros de altura, de fuste corto, cilíndrico y a veces tortuoso, y su tronco está provisto de una corteza gris espinosa, con ramillas densamente pobladas. En muchos casos las ramas se inician desde la base dando la impresión de varios tallos. La copa de la tara es irregular, aparasolada y poco densa, con ramas ascendentes. Sus hojas son en forma de plumas, ovoides y brillantes ligeramente espinosa de color verde oscuro y miden 1,5 cm de largo. Sus flores son de color amarillo rojizo, dispuestos en racimos de 8 cm a 15 cm de largo. Sus frutos son vainas explanadas e indehiscentes de

color naranja de 8 cm a 10 cm de largo y 2 cm de ancho aproximadamente, que contienen de cuatro a siete granos de semilla redondeada de 0,6 cm a 0,7 cm de diámetro, pero conforme madura va tomando tonalidades que van del amarillo al anaranjado- rojizo y de textura esponjosa. Sus semillas son pequeñas miden aproximadamente 0,8 cm de ancho por 1 cm de largo. Inflorescencia con racimos terminales de 15 a 20 cm de longitud, de flores ubicadas en la mitad distal, flores hermafroditas, zigomorfas, cáliz irregular provisto de un sépalo muy largo de alrededor de 1 cm, con numerosos apéndices en el 22 borde, cóncavo, corola con pétalos libres de color amarillento, dispuestas en racimos de 8 a 20 cm de largo, con pedúnculos pubescentes de 56 cm de largo, articulado debajo de un cáliz corto y tubular de 6 cm de longitud; los pétalos son aproximadamente dos veces más grandes que los estambres.²¹

2.3.3. Distribución geográfica

La tara crece en los climas secos, cálidos y sub cálidos de la costa, en la vertiente occidental de los andes y valles interandinos. La tara es una especie muy plástica en clima y suelo. La tara se distribuye en los departamentos de Ancash, Apurímac, Ayacucho, Cuzco, Huánuco, Junín, Moquegua, Tacna y Lima.²²

2.3.4. Usos en la medicina tradicional

La tara tiene diversos usos tradicionales, la infusión de las vainas maduras se utiliza para la amigdalitis en forma de gárgaras, la infusión de las hojas se utiliza para la estomatitis, la cocción de las ramas tiernas se usa como abortivo, igualmente se prepara una bebida que se toma como depurativo del colesterol, el cocimiento de las vainas se usan para secar las llagas de las piernas. En general es también muy utilizada para el tratamiento de infecciones vaginales y micóticas, para el lavado de ojos inflamados, para el dolor de estómago y diarreas, para el reumatismo y resfriado, para curar úlceras, como cicatrizante,

entre otros. En alimentación, originan el característico sabor astringente a los vinos tintos (de cuyo bouquet son en parte responsables), al té, al café, debemos mencionar que la astringencia se explica al acomplejarse los taninos con macromoléculas y provocar la precipitación de las glicoproteínas ricas en prolina que contiene la saliva. En la cosmética se utiliza para la evitar la caída del cabello, para su tintura y para la elaboración de champús y bronceadores; también se usa como biocida contra piojos y otros insectos. A pesar del uso tan amplio no se encuentra literatura científica que avale estos usos tradicionales. Igualmente las recetas son solamente "recetas caseras".²³

2.3.5. Composición química

Hojas: Contiene glicósidos, gomas, mucílagos, taninos (12,7% en la forma de taninos gálicos), antraquinonas: reina, sennósido, agliconas libres, C-glicósidos, aloe-emodina e iso-emodina, esteroides y flavonoides.²⁴

Vainas: Contiene taninos hidrolizables (galotaninos) en un rango de 40% a 60% según las condiciones ecológicas en las que vegeta, la hidrólisis de estos taninos conduce a la separación del ácido gálico; así mismo se han aislado galato de etilo y cuatro galatos del ácido quínico correspondiendo a los ésteres metílicos de 4,5-di-Ogaloilquínico y de 3,4,5- tri-O-galoilquínico, y a los ácidos 3,4-di-O-galoilquínico y 3,4,5-tri-O-galoilquínico.²⁴

Semillas: Del endospermo se ha separado la goma o hidrocoloide galactomanánico en la que los componentes monoméricos galactosa y manosa se encuentran en una relación de 41:70. La viscosidad intrínseca permitió determinar su peso molecular promedio en 351400, así mismo la goma da lugar a soluciones acuosas con característica de fluido pseudoplástico con una viscosidad promedio de 4000 cp.²⁴

2.3.6. Estudios farmacológicos

La propiedad del tanino para precipitar proteínas aplicadas en los tejidos vivos, constituye la base para su acción terapéutica, empleándolos en medicina, en tratamientos del tracto gastrointestinal, para las excoiaciones y quemaduras de la piel, en este último caso las proteínas forman una capa protectora antiséptica bajo la cual se regeneran los tejidos; se usa como astringente debido a su capacidad para precipitar proteínas de la piel, proteínas salivares, por tal propiedad se usa por vía externa como cicatrizante y por vía interna antidiarreicos; como antioxidante, por su capacidad de captar radicales libres e inhibir la peroxidación lipídica, inhiben la autooxidación del ácido ascórbico; hipocolesterolémicos, porque disminuyen los niveles de colesterol en sangre y aumentan su metabolismo; como antídotos en intoxicaciones por metales pesados y alcaloides.²⁴

2.4. *Eucaliptus globulus* Labill “eucalipto”.

2.4.1. Clasificación taxonómica

Se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Sub clase	:	Rosidae
Orden	:	Myrtales
Familia	:	Myrtaceae
Género	:	Eucaliptus
Especie	:	<i>Eucaliptus globulus</i> Labill
Nombre Vulgar	:	“eucalipto”

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH (2013) (Anexo 3).

2.4.2. Descripción botánica

Los eucaliptos son árboles perennes, de porte recto pudiendo llegar a medir hasta 60 m de altura, la corteza exterior (ritidoma) es marrón clara con aspecto de piel y se desprende a tiras dejando manchas grises o parduscas sobre la corteza interior, más lisa.¹⁷

Las hojas jóvenes de los eucaliptos son sésiles, ovaladas y grisáceas, alargándose y tornándose coriáceas de un color verde azulado brillante de adultas; contienen un aceite esencial, de característico olor balsámico, que es un poderoso desinfectante natural. Presenta flores blancas y solitarias con el cáliz y la corona unidos por una especie de tapadera que cubre los estambres y el pistilo (de esta peculiaridad procede su nombre, eu-kalypto en griego significa "bien cubierto") la cual, al abrirse, libera multitud de estambres de color amarillo. Los frutos son grandes cápsulas de color casi negro con una tapa gris azulada que contiene gran cantidad de semillas.¹⁷

2.4.3. Distribución geográfica

El eucalipto es originario de Australia y de Tasmania. Actualmente, crece en todas las regiones de clima subtropical. Habita en zonas bajas próximas al litoral hasta los 300 m.s.n.m.¹⁷

2.4.4. Usos en la medicina tradicional

El aceite esencial del eucalipto es antitusivo, mucolítico y expectorante, aumentando el volumen de producción del flujo del tracto respiratorio. Es también antiséptico. El extracto acuoso de la hoja tiene propiedades hipoglucemiantes. También tiene propiedades repelentes de insectos. El aceite esencial administrado indistintamente de forma interna o externa, está indicado en el tratamiento sintomático de los catarros de las vías respiratorias altas y congestión nasal, mientras que la aplicación tópica se emplea también para afecciones reumáticas.²²

2.4.5. Composición química

Las hojas contienen aceite esencial en una cantidad que varía entre el 1,5 y el 3 %. En el aceite esencial, el eucaliptol (1,8-cineol) representa el 75-85 %. Otros componentes activos en la hoja son los taninos, ácidos polifenólicos, flavonoides, ceras.²⁰

En el aceite esencial se han identificado los monoterpenos canfeno, cineol, para-cimeno; euglobal IB, IC y II A, alfa y betafelandreno, geraniol y su acetato, isofenchona, limoneno, mirceno, alfa y betapineno, trans-pineocarvol, terpineol, el alfa-isómero y su acetato, y valeraldehído; además de los sesquiterpenos aromandreno, allo-aromandreno, cariofileno, euglobal III, IV A y IV B, globulol, epiglobulol, ledol y viridiflorol. Además se han detectado en las hojas los flavonoides, eucalptín, hiperósido, procianidín B-2 galoil, prodelfinidín B-2 galoil, prodelfinidín B-5, y su digaloil, quercetín, iso quercetín, rutín, sewderoxilín y 8-dimetil sideroxilín. El aceite esencial del fruto contiene los monoterpenos 1-8 cineol, óxido de linalol, beta-pineno, piperitona, terminen-4-ol, alfa, beta y gamma-terpineno; y los sesquiterpenos aromandreno y el alfa-isómero, gama-cadineno, eremofileno, globulol y alfa-gurguneno.²⁵

2.4.6. Estudios farmacológicos

La esencia de Eucaliptus se encuentra entre las más activas como expectorante frente a otros aceites esenciales, Se ha demostrado experimentalmente el aumento manifiesto de la secreción traqueobronquial que produce. El mecanismo por el que actúa es por acción directa sobre las células secretoras del tracto respiratorio, lo que obedece a que las esencias se eliminan por dicho tracto .²²

Se ha encontrado diversos estudios sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial del eucalipto que muchas veces presentan resultados contradictorios. Se cree que esto puede deberse a variaciones en la metodología y los

materiales empleados. El aceite esencial es vermífugo por la presencia de carvona. Las hojas en infusión al 2% son hipoglucemiantes a causa de fenol glicósidos.²⁶

2.5. Bacterias grampositivas: *Staphylococcus aureus*.

Se conoce como bacterias Gram Positivas al grupo de bacterias que no posee una membrana externa capaz de proteger el citoplasma bacteriano, que tienen una gruesa capa de peptidoglicano y que presentan ácidos teicoicos en su superficie.²⁷

Una especie representativa viene a ser el *Staphylococcus aureus*, es un coco que crece agrupado en racimos (de ahí su raíz "Staphylo"), es aerobio y anaerobio facultativo por lo que puede crecer tanto en una atmósfera con oxígeno y también sin el mismo, no presenta movilidad ni forma cápsula. Es capaz de crecer hasta con un 10% de sal común. Por esto puede crecer en el agua del mar. Produce la fermentación láctica. Es catalasa positivo y coagulasa positivo, es la única especie estafilocócica humana que produce coagulasa, esta enzima es también producida por *Staphylococcus hyicus* y *Staphylococcus intermedius*, pero estas son cepas de animales y no están asociadas a infecciones humanas. El *Staphylococcus aureus* es un agente patogénico que actúa como microorganismo saprófito, se encuentra en la piel del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas de la piel caen puede causar enfermedad. Estas bacterias también viven sin causar daño en los pasajes nasales. Pueden causar desde infecciones leves y graves e incluyen abscesos, impétigos, forúnculos, carbunco e infecciones sistémicas "graves que pueden asociarse con exfoliación superficial de la epidermis". Puede producir enfermedades que ponen en peligro la vida como neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome del shock tóxico (SST) y sepsis.²⁷

La patogenicidad de *Staphylococcus aureus* se manifiesta por elaborar una variedad de toxinas extracelulares, incluyendo alfa-, beta-, sigma- hemilisin, coagulasa, hialuronidasas, exfoliatina, leucocidina y lipasa. La coagulasa puede proteger a las células bacterianas de la fagocitosis cubriendo los neutrófilos con fibrina, la proteína A, un componente de la pared celular puede unirse a la región Fc, de las moléculas de la inmunoglobulina e interferir en la opsonización y fagocitosis. Las hialuronidasas son enzimas que hidrolizan el cemento intercelular de los tejidos, facilitando la diseminación de los microorganismos. Las exfoliatinas también tienen esta capacidad, pero su acción está limitada al estrato granuloso de la piel, produciendo ampollas y escaras en la epidermis. Las leucocidinas son exotoxinas que ejercen efectos tóxicos directos sobre los neutrófilos, granulación de los lisosomas celulares y muerte celular. Las cepas recuperadas de carbunclos y forúnculos en general producen lipasas capaces de hidrolizar los lípidos de la piel, lo que permite la diseminación de los microorganismos. Las enterotoxinas estafilocócicas, un grupo de proteínas termoestables de cadena simple con un peso molecular de 28000 a 35000 dalton, se dividen en siete tipos: A, B, C, C2, D, E y F. Las enterotoxinas A y B habitualmente se asocian con envenamiento estafilocócico de alimentos humanos; la enterotoxina B por lo común es producida por cepas relacionadas con infecciones hospitalarias.²⁷

2.6. Modelo tridimensional del ADN

En 1953, Watson y Crick postularon un modelo tridimensional para la estructura de ADN que estaba de acuerdo con todos los datos disponibles. Consiste en dos cadenas helicoidales de ADN enrolladas alrededor del mismo eje, que forman una doble hélice dextrógira. Los esqueletos hidrofílicos formados por unidades alternas de desoxirribosas y grupos fosfato cargados negativamente se hallan en el exterior de la doble hélice, en contacto con el agua circundante. Las bases

purínicas y pirimidínicas de ambas cadenas están apiladas en el interior de la doble hélice, con sus estructuras en anillo hidrofóbicas y prácticamente planas situadas a muy corta distancia las unas de las otras y en posición perpendicular con relación al eje longitudinal de la hélice.²⁸

La relación espacial entre las dos cadenas da lugar a la formación de un surco mayor y un surco menor en la doble hélice. La doble hélice o el dúplex de DNA se mantiene por dos tipos de fuerzas: enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias e interacciones por apilamiento de bases.²⁸

Las dos hebras tienen orientación antiparalela; o sea que sus direcciones 5' → 3' son opuestas. Las hebras mantienen un registro exacto debido al apareamiento regular de las hebras: A se aparea con T a través de dos enlaces de hidrógeno; G se aparea con C mediante tres enlaces de hidrógeno. Esta complementariedad de pares de bases es consecuencia del tamaño, la forma y la composición química de las bases. La presencia de miles de estos enlaces de hidrógeno en una molécula de DNA contribuye en gran parte a la estabilidad de la doble hélice. Las interacciones hidrofóbicas y de van der Waals entre los pares de bases adyacentes apilados también contribuyen a la estabilidad de la estructura del DNA.²⁹

En principio, dos hebras de polinucleótidos pueden formar una hélice que gira hacia la derecha o hacia la izquierda, dado que la geometría de la columna vertebral de azúcar-fosfato se mas compatible con el DNA natural, es una hélice que gira hacia la derecha. Los patrones de difracción por rayos X del DNA indican que las bases apiladas están separadas por un espacio regular de 0,34 nm, a lo largo del eje de la hélice. La hélice completa un giro cada 3,4 nm; en consecuencia, hay unos 10 pares por giro. Esto se denomina la forma B del DNA, la forma normal presente en la mayoría del DNA celular.²⁹

Las dos cadenas antiparalelas de polinucleótidos en el DNA en doble hélice no son idénticas ni en secuencia ni en composición de bases. En cambio, son complementarias entre ellas, la característica fundamental del modelo de las dos hebras de DNA. El proceso de copia de la estructura (replicación) podría proceder de una manera lógica a través de (1) separación de las dos hebras y (2) la síntesis de una hebra complementaria para cada una de ellas mediante las concatenadas de nucleótidos en la secuencia especificada por las reglas de apareamiento de bases comentadas anteriormente. Cada hebra preexistente podría funcionar como un molde para dirigir la síntesis de la hebra complementaria.²⁸

2.7. 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.³⁰

2.7.1. 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. Las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 (principalmente por residuos de triptófano), así las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existen 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 a espectrofotometría.³⁰

2.8. Evaluación genotóxica

La genética toxicológica estudia los efectos mutagénicos de sustancias químicas y radiaciones, así como las consecuencias para la salud humana de la exposición a mutágenos, considerando como tal a cualquier agente que induzca mutaciones génicas (cambio de uno o pocos pares de bases), aberraciones cromosómicas estructurales (cambios en la estructura) o numéricas (aneuploidías y poliploidías por afecciones en los componentes del aparato mitótico o meiótico) o alteraciones al ADN (formación de aductos, alquilación de bases, intercalamiento de bases), a los mecanismos de reparación (incrementando la sensibilidad a los efectos de muchos mutágenos), a los eventos de recombinación mitótica. Las plantas medicinales no llevan una indicación metodológica especial para su evaluación genotóxica, por lo que deben ser sometidas a las mismas regulaciones que rigen los fármacos en general. La evaluación genotóxica de extractos de plantas medicinales deben ser realizadas, en primera instancia, mediante ensayos *in vitro*, validados internacionalmente, que midan el daño en los niveles de mutaciones genéticas y cromosómicas.³¹

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

En los últimos años las pruebas para medir daño a nivel primario del ADN, han alcanzado gran importancia entre los análisis de genotoxicidad. Con el fin de detectar en sus etapas iniciales la acción sobre el material genético se utilizan las siguientes determinaciones *in vitro* que son muy utilizadas en nuestro medio para detectar genotoxicidad inicial: aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas, micronúcleos, mutaciones genéticas a nivel de Locus HPRT, síntesis de ADN no programada y electroforesis de una célula (ensayo del cometa).³¹

Actualmente se cuenta con una gran variedad de pruebas con las que se puede determinar daño genético o detectar compuestos genotóxico, estas pueden ser bioquímicas, *in vitro*, con microorganismos, células vegetales o animales *in vivo* o con roedores para determinar daño a nivel molecular.³²

2.9. Electroforesis en gel

La electroforesis es la aplicación de las técnicas de separación de macromoléculas en un campo eléctrico en función de su tamaño y carga eléctrica superficial, se define como el método de separación de sustancias cargadas al aplicar un campo eléctrico, de modo que se diferencian en el comportamiento en un campo eléctrico. Aquellas partículas cargadas positivamente (cationes) migraran hacia el cátodo y las cargadas negativamente (aniones) hacia el ánodo.³⁰

Entre las macromoléculas, las más utilizadas son las proteínas seguidas de los ácidos nucleicos, ya que ambos tipos presentan una carga importante, algo que no presentan los lípidos, sin contar con que son insolubles. El método consiste en inmovilizar las muestras en estudio en un material gelatinoso (gel). El gel se somete a una corriente eléctrica durante un período de tiempo determinado. Cada muestra comenzará a migrar a través de los poros del gel con una velocidad diferencial, que dependerá de la carga eléctrica y del tamaño

molecular. Cuando las separaciones se han completado se interrumpe el paso de corriente y las muestras separadas se tiñen para visualizarse. Cada muestra se encontrará a una distancia distinta respecto al origen. Los ácidos nucleicos presentan carga y son solubles ya que tienen un grupo fosfato, parte que confiere la carga, y está presente de forma regular en la estructura. Los ácidos nucleicos tienen la capacidad de migrar en un campo eléctrico y por tanto, son susceptibles de ser separados por electroforesis. El gel se encuentra sumergido en un electrolito tamponado con tris-Borato (no glicina), para garantizar que los ácidos nucleicos estén cargados negativamente; por esto a la técnica se le denomina electroforesis de inmersión. Las moléculas migrarán hacia el polo positivo, de modo que viajarán en esa dirección por el gel, separándose por tamaño (nº de nucleótidos), a la hora de cargar la muestra se colocan unos marcadores de frente (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.³⁰

La electroforesis en gel es muy utilizada en la detección, control de pureza, caracterización, cuantificación (por comparación con controles) así como preparación y purificación (por extracción de bandas desde el gel) de moléculas y fragmentos de DNA y RNA. Tiene dos mecanismos de separación: la electroforesis, que separa por la relación carga/tamaño y el tamizado por el gel, que separa mayormente por tamaño. Los geles más comunes son agarosa y poliacrilamida.³⁰

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación se desarrolló en los Laboratorios de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de octubre del 2013 a marzo del 2014. La obtención de los extractos y tamizaje fitoquímico de las plantas en estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Farmacognosia de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica; la obtención de ADN de *Staphylococcus aureus* y los ensayos de genotoxicidad se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.2. Definición de población y muestra

Población: Plantas de *Spartium junceum* L. "retama", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto", que crecen en la comunidad de Colpa del distrito de Acos Vinchos de la provincia de Huamanga del departamento de Ayacucho.

Muestra:

- 500 g de flores de *Spartium junceum* L. "retama".
- 500 g de vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara".

- 500 g de hojas de *Eucalyptus globulus Labill* "eucalipto".

3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos

3.3.1. Recolección e identificación de la muestra.

Las muestras fueron recolectadas en la comunidad de Colpa del distrito de Acos Vinchos de la provincia de Huamanga del departamento de Ayacucho, en horas de la mañana y fueron inmediatamente transportadas al Laboratorio de Farmacognosia, donde fueron secadas a temperatura ambiente bajo sombra previamente acondicionada, teniendo como base papel Kraft que fue cambiada constantemente y volteando la muestra para un secado uniforme, evitando el deterioro por la humedad y separando aquellas que cambien de color o muestren signos de alteración. Una vez secada la muestra, se trituró empleando un mortero, con la finalidad de reducir hasta un polvo fino y se procedió a realizar la preparación de los extractos hidroalcohólico. Para la identificación taxonómica se emplearon muestras con flores, vainas y hojas lo que corresponde a cada planta, lo cual se realizó en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas por la Blga. Laura Aucasime Medina (Anexo 1, 2 y 3)

3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico

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

3.3.3. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Spartium junceum* L. “retama”, vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” y hojas de *Eucaliptus globulus* Labill “eucalipto”.

Se realizó una marcha fitoquímica a los extractos 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.^{33,34} (Anexo 4 y 7).

3.4. Extracción de ADN genómico de *Staphylococcus aureus*:

A partir de esta etapa del estudio se desarrolló en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática, se realizó la reactivación y cultivo de la cepa *Staphylococcus aureus*, en caldo Trypticase soya y luego en Agar Trypticase soya, respectivamente, con la finalidad de obtener una masa celular bacteriana y extraer el ADN genómico con el siguiente protocolo:³⁵

1. Se colocó 400 µL de buffer TE 1X a un tubo eppendorf de 2 mL y en ella se transfirió con un asa de kolle aproximadamente 100 mg de masa celular del cultivo joven de *Staphylococcus aureus*.
2. Se añadió 60 µL de lisozima (10 mg/mL) y se incubó a 37 °C por dos horas en baño maría.
3. Luego se adicionó SDS/proteinasa K (75 µL SDS 10% + 5 µL PK 10 mg/mL) y se incubó a 65 °C por 15 minutos.
4. Se aumentó 100 µL NaCl 5 M más 5 µL de CTAB (N-cetil-N, N, N-Trimetil bromuro de amonio), y se incubó a 65 °C por 15 minutos.
5. Se agregó 750 µL de cloroformo : alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó agitando suavemente con la mano durante cinco minutos y se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos.

6. Luego de la formación de dos capas en el tubo eppendorf, se trasvasó cuidadosamente el sobrenadante a otro tubo eppendorf.
7. Se adicionó 600 μ L isopropanol helado, luego se llevó a refrigeración a -20 $^{\circ}$ C por una noche.
8. Se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante.
9. Se añadió 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 14000 rpm por diez minutos.
10. Se descartó el sobrenadante y se rehidrató el sedimento con 100 μ L de agua bidestilada estéril, luego se guardó a -20 $^{\circ}$ C hasta su posterior análisis.

3.5. Cuantificación de ADN genómico de *Staphylococcus aureus*:

3.5.1. Por espectrofotometría

Procedimiento:

1. Se homogenizó lentamente las muestras de ADN con una micropipeta de 100 μ L, por diez veces.
2. Se preparó el espectrofotómetro UV marca Eppendorf Bio Photometer plus, con la opción de cuantificar el ADN.
3. Para limpiar la superficie de muestra del adaptador se depositó 2 μ L de agua bidestilada estéril y se absorbió el agua utilizando papel tizú, para mejor limpieza se repitió por dos veces.
4. Nuevamente se depositó 2 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 para calibrar y obtener “cero de Absorbancia” (0.000 A $^{\circ}$).
5. Se absorbió el agua utilizando papel tizú, luego se depositó 2 μ L de la muestra de ADN, se colocó la tapa y presionó la opción SAMPLE para ver el resultado de la cuantificación y pureza de ADN en la pantalla del equipo; luego se absorbió la muestra con papel “tizú”.
6. Se repitió los pasos 4 y 5 para la cuantificación de cada muestra de ADN.

7. Terminada la cuantificación de ADN, se depositó 2 μL de agua bidestilada estéril, se secó con papel "tizú" y se apagó el equipo.

3.5.2. Por electroforesis

A partir del ADN cuantificado por espectrofotometría, se realizó diluciones siguiendo los siguientes pasos:

1. Conociendo la concentración de ADN de una muestra, se realizó diluciones sucesivas al décimo con agua bidestilada estéril, hasta obtener una concentración final de 15 $\text{ng}/\mu\text{L}$, en un volumen final de 100 μL .
2. A partir de ésta dilución de la muestra de ADN, se procedió a preparar volúmenes de carga para electroforesis en gel de agarosa al 1%, según la siguiente tabla:

Tabla 1. Preparación de diluciones de ADN a diferentes concentraciones para patrones de banda en electroforesis. Ayacucho, 2013.

Nº de carril en gel de agarosa	ADN stock (15 $\text{ng}/\mu\text{L}$) (μL)	Buffer Loading 6X (μL)	Volumen final de carga (μL)	Concentración final de ADN (ng)
1	4	2	6	60
2	8	2	10	120
3	12	2	14	180
4	16	2	18	240

3. Se cargó todo el contenido de las mezclas a cada uno de los pocillos del gel de agarosa al 1%, en sus respectivos carriles.
4. Luego se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se dejó correr a 50 voltios por dos horas.
5. Se coloreó el gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% por diez minutos y dos enjuagues suaves con agua corriente, luego se visualizó por radiación en UV en el sistema de registrador de imágenes marca Biometra UV solo TS. Adicionalmente se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1

mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; en ambos casos para visualizar las bandas de ADN a diferentes concentraciones.

3.6. Ensayos de la genotoxicidad *in vitro*, “método Tomasevich”:

Se desarrolló siguiendo el “método Tomasevich” propuesto por Miranda³⁵; con las siguientes fases:

- **Fase de cuantificación y preparación de Stock de ADN genómico de *Staphylococcus aureus*.**

El ADN genómico bacteriano obtenido, fue cuantificado por espectrofotometría UV marca Eppendorf BioPhotometer plus; luego se preparó un stock a concentración de 500 ng/μL en volumen final de 150 μL, para cada planta medicinal en estudio.

- **Fase de prueba de genotoxicidad *in vitro* de ADN genómico de *Staphylococcus aureus*.**

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

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

Tabla 2. Preparación de las soluciones para la prueba de genotoxicidad *in vitro* de ADN genómico, por efecto de extractos de plantas medicinales. Ayacucho, 2013.

Condiciones		Soluciones para prueba de genotoxicidad <i>in vitro</i>									
N° de tubo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stock de ADN (500 ng/ μ L) Volumen en μ L		14	14	14	14	14	14	14	14	-	14
Extracto hidroalcohólico	Concentración (mg/mL)	5	10	50	100	5	10	50	100	100	-
	Volumen (μ L)	6	6	6	6	6	6	6	6	20	-
Agua bidestilada estéril		-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
Volumen total (μ L)		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

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

- **Fase de electroforesis para la detección de genotoxicidad.**

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

Para el volumen de carga en gel de agarosa, se utilizó las siguientes cantidades: 1 μ L de loading (colorante señalizador de migración de las bandas), 4 μ L de la solución para la prueba de genotoxicidad *in vitro* y 2 μ L de agua bidestilada estéril, volumen final 7 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 programó a 30 voltios (V) por cinco horas.

- **Fase de 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 diez minutos aproximadamente, se enjuagó con agua corriente dos veces y para visualizar las bandas y/o fragmentos de ADN productos de la genotoxicidad, se colocó el gel en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra *UVsolo TS*.

- **Fase de interpretación y clasificación del registro visual de genotoxicidad.**

La escala de los valores numéricos correspondientes a los niveles de fragmentación del ADN como producto de la genotoxicidad, visualizados en el registro fotográfico, fueron basados en la clasificación del “ensayo cometa” propuesto por Speit (1995) y Collins (2004), en tesis de Mónica Marisol Larrea Poma.³⁶

Tabla 3. Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.

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

Fuente: Larrea Poma M., 2007

3.7. Análisis de datos

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

IV. RESULTADOS

Tabla 4. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Spartium junceum* L. "retama". Ayacucho, 2013.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Wagner	+++	Turbidez
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	++	Precipitado naranja
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+++	Verde intensa
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración amarilla
Quinonas	Borntrager	+++	Coloración roja

Leyenda:

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

Tabla 5. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara". Ayacucho, 2013.

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

Leyenda:

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

Tabla 6. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus Labill* "eucalipto". Ayacucho, 2013.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Wagner	+++	Turbidez
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	++	Precipitado naranja
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+++	Verde intensa
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración roja
Quinonas	Borntrager	++	Coloración roja

Leyenda:

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

Tabla 7. Cuantificación de ADN genómico extraído de *Staphylococcus aureus* por espectrofotometría ultra violeta marca Eppendorf Bio Photometer plus. Ayacucho, 2013.

Muestra	Concentración ADN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ADN	Proteínas	Pureza de ADN
		A 260	A 280	A260/A280
1	1907,6	0,763	0,399	1,91
2	2280,0	0,912	0,480	1,90
3	2446,2	0,978	0,557	1,76
4	1634,7	0,654	0,352	1,86
5	1458,6	0,583	0,300	1,94
6	2620,7	1,048	0,596	1,76

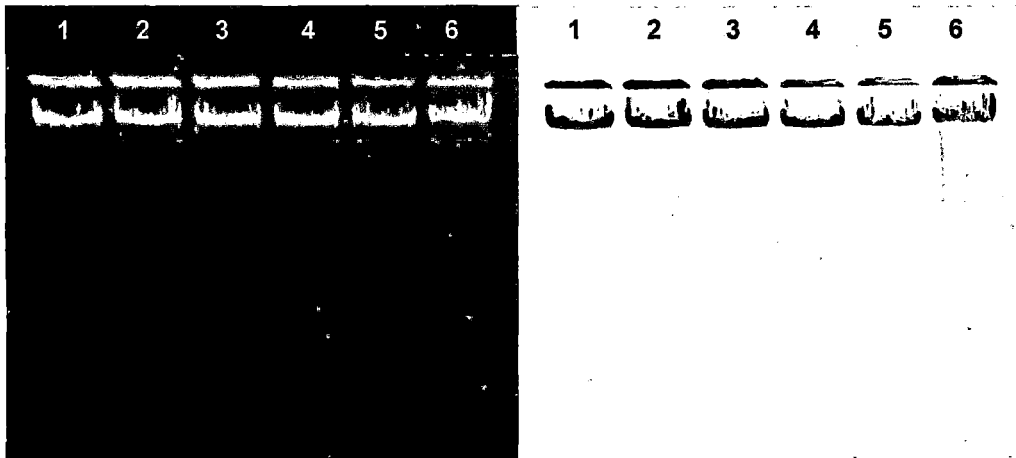


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de seis muestras del ADN genómico extraído de *Staphylococcus aureus*. Ayacucho, 2013.

Leyenda:

Carril 1: cultivo 1.

Carril 2: cultivo 2.

Carril 3: cultivo 3

Carril 4: cultivo 4.

Carril 5: cultivo 5.

Carril 6: cultivo 6.

Volumen de carga:

Muestra (1 μL) + loading (1 μL) + agua bidestilada estéril (9 μL) = 11 μL .

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por 1 hora con 30 minutos.

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

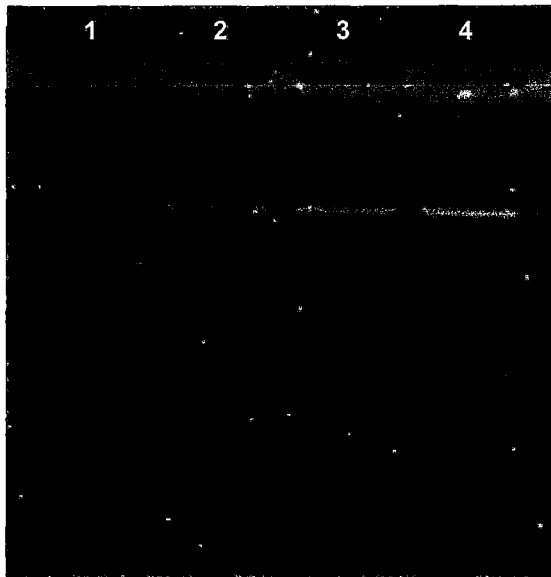


Figura 2. Electroforesis de patrones de bandas de ADN genómico extraído de *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones. Ayacucho, 2013.

Leyenda:

Carril 1: 60 ng de ADN genómico de *Staphylococcus aureus*.

Carril 2: 120 ng de ADN genómico de *Staphylococcus aureus*.

Carril 3: 180 ng de ADN genómico de *Staphylococcus aureus*.

Carril 4: 240 ng de ADN genómico de *Staphylococcus aureus*.

Volumen de carga:

Muestra (4 μ L, 8 μ L, 12 μ L, 16 μ L en carril 1, 2, 3 y 4, respectivamente) + loading (2 μ L).

Condiciones de electroforesis: 50 voltios por dos horas.

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

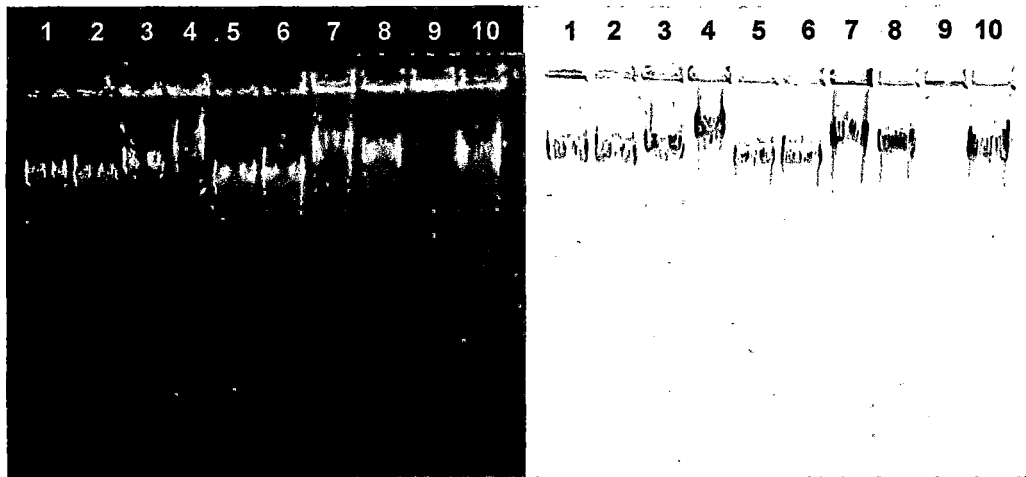


Figura 3. Electroforesis del producto de la genotoxicidad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, con extracto hidroalcohólico de *Spartium junceum* L. "retama" a diferentes concentraciones y tiempos de incubación. Ayacucho, 2013.

Leyenda:

- Carril 1: Con 5 mg/mL de extracto, durante una hora.
 - Carril 2: Con 10 mg/mL de extracto, durante una hora.
 - Carril 3: Con 50 mg/mL de extracto, durante una hora.
 - Carril 4: Con 100 mg/mL de extracto, durante una hora.
 - Carril 5: Con 5 mg/mL de extracto, durante cuatro horas.
 - Carril 6: Con 10 mg/mL de extracto, durante cuatro horas.
 - Carril 7: Con 50 mg/mL de extracto, durante cuatro horas.
 - Carril 8: Con 100 mg/mL de extracto, durante cuatro horas.
 - Carril 9: Extracto de "retama" a concentración de 100 ng/mL (blanco).
 - Carril 10: ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a 500 ng/ μ L (control).
- Volumen de carga:
 Muestra (4 μ L) + loading (1 μ L) + agua bidestilada estéril (2 μ L) = 7 μ L.
 Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.
 Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% por diez minutos.

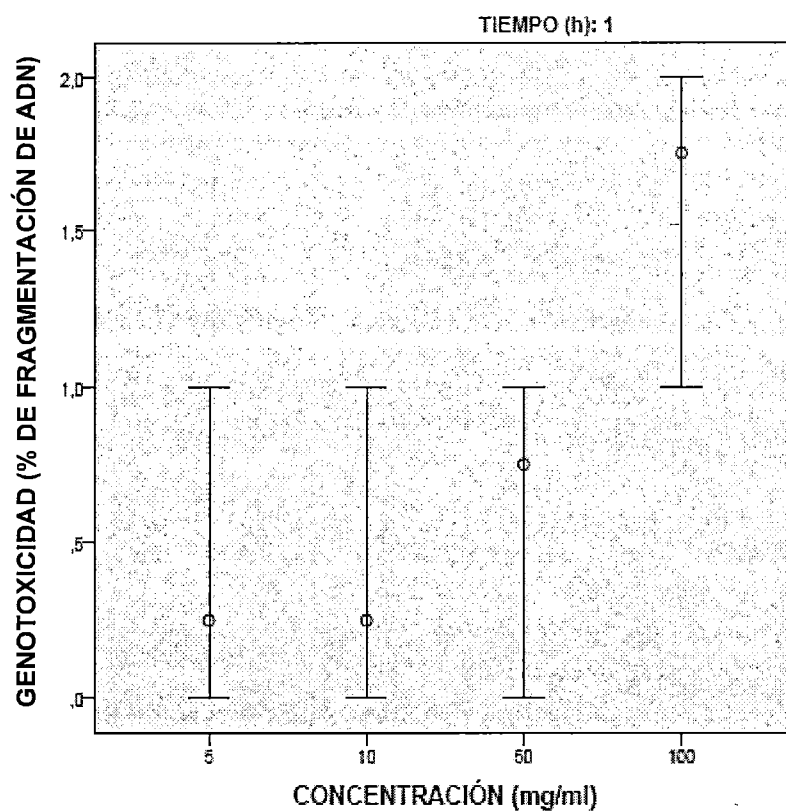


Figura 4. Genotoxicidad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, con extracto hidroalcohólico de *Spartium junceum* L. "retama" a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación. Ayacucho, 2013.

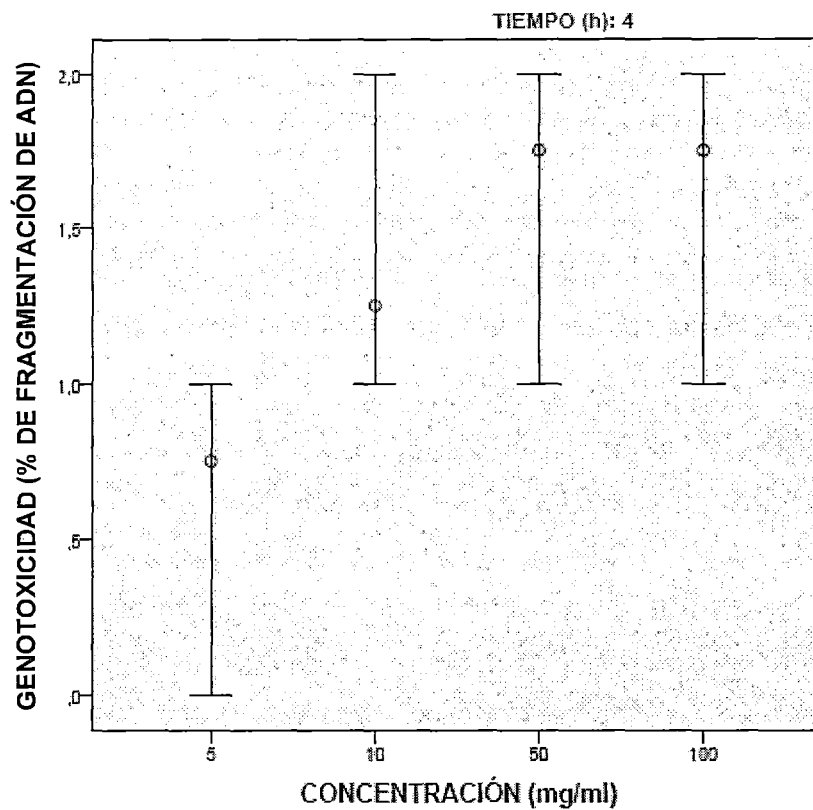


Figura 5. Genotoxicidad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, con extracto hidroalcohólico de *Spartium junceum* L. "retama" a diferentes concentraciones, durante cuatro horas de incubación. Ayacucho, 2013.

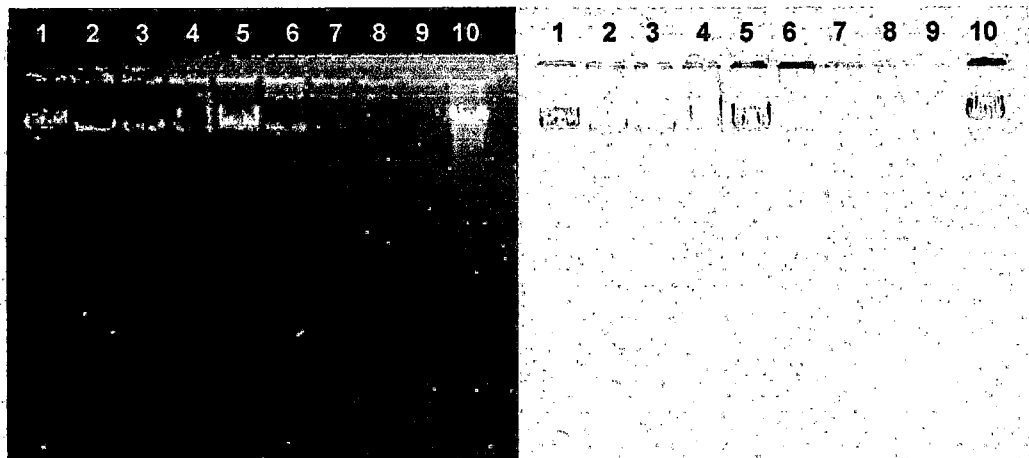


Figura 6. Electroforesis del producto de la genotoxicidad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, con extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a diferentes concentraciones y tiempos de incubación. Ayacucho, 2013.

Leyenda:

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

Carril 2: Con 10 mg/mL de extracto, durante una hora.

Carril 3: Con 50 mg/mL de extracto, durante una hora.

Carril 4: Con 100 mg/mL de extracto, durante una hora.

Carril 5: Con 5 mg/mL de extracto, durante cuatro horas.

Carril 6: Con 10 mg/mL de extracto, durante cuatro horas.

Carril 7: Con 50 mg/mL de extracto, durante cuatro horas.

Carril 8: Con 100 mg/mL de extracto, durante cuatro horas.

Carril 9: Extracto de "tara" a concentración de 100 mg/mL (blanco).

Carril 10: ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a 500 ng/ μ L (control).

Volumen de carga:

Muestra (4 μ L) + loading (1 μ L) + agua bidestilada estéril (2 μ L) = 7 μ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

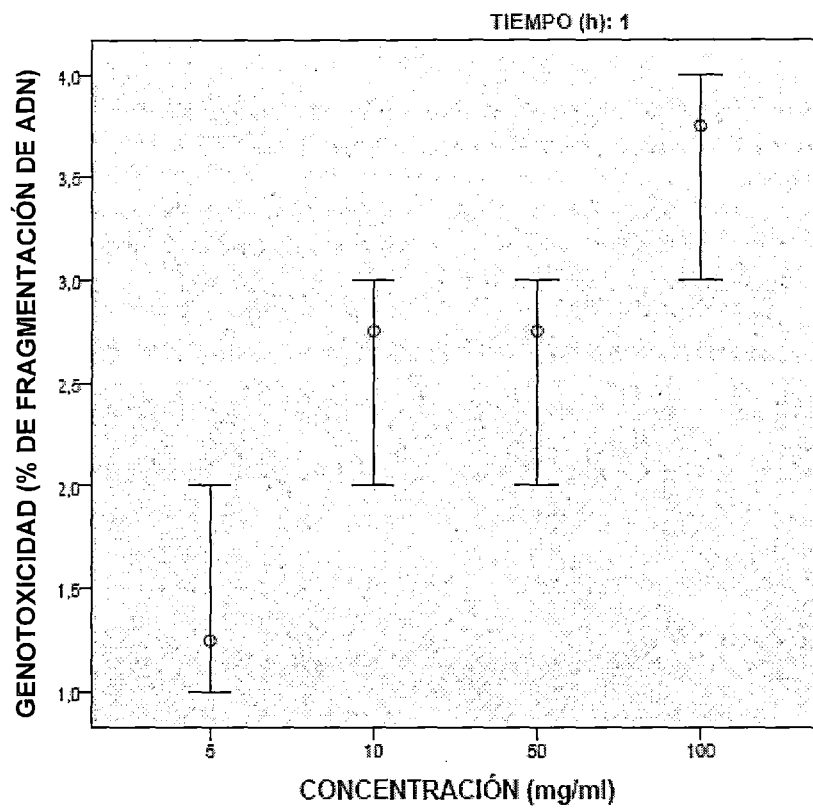


Figura 7. Genotoxicidad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, con extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación. Ayacucho, 2013.

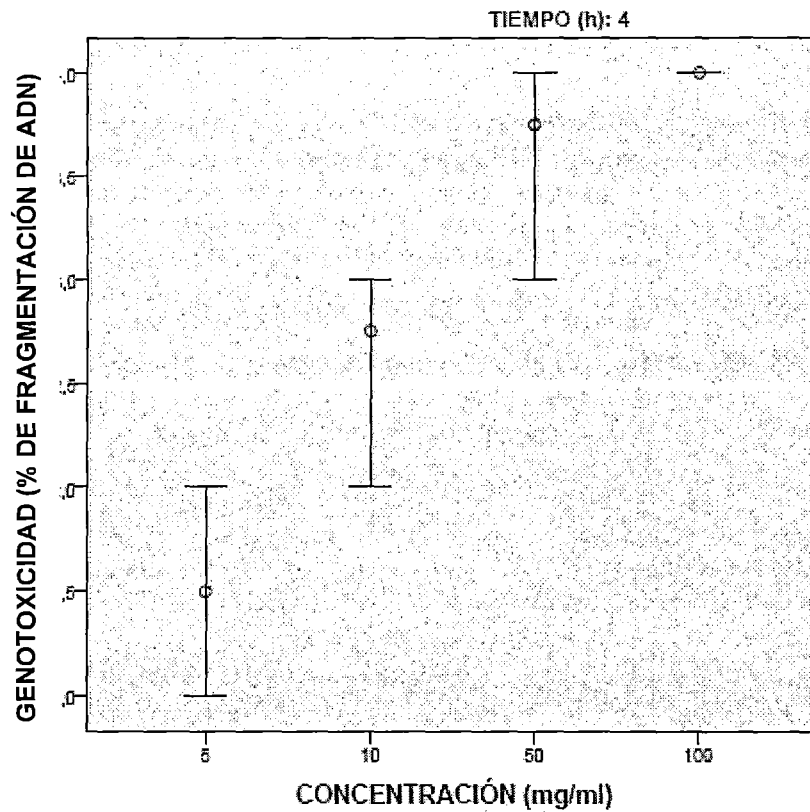


Figura 8. Genotoxicidad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, con extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a diferentes concentraciones, durante cuatro horas de incubación. Ayacucho, 2013.

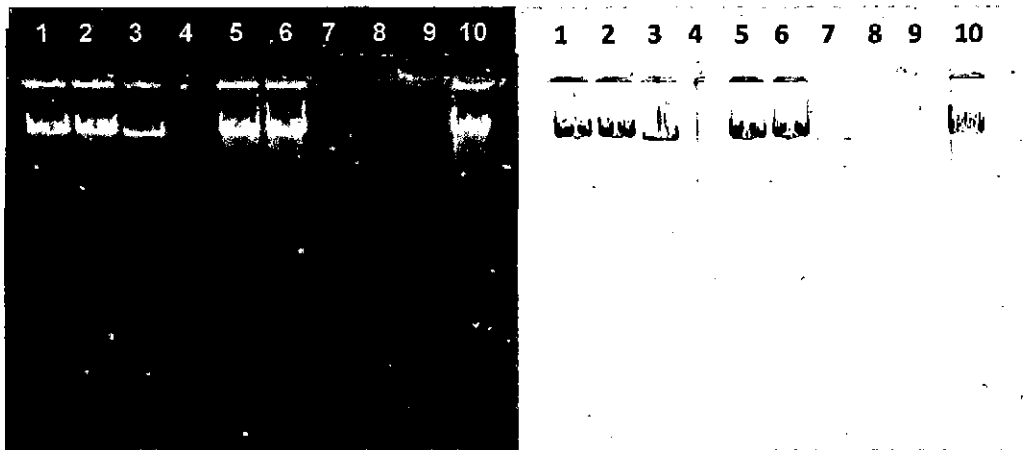


Figura 9. Electroforesis del producto de la genotoxicidad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, con extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a diferentes concentraciones y tiempos de incubación. Ayacucho, 2013.

Leyenda:

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

Carril 2: Con 10 mg/mL de extracto, durante una hora.

Carril 3: Con 50 mg/mL de extracto, durante una hora.

Carril 4: Con 100 mg/mL de extracto, durante una hora.

Carril 5: Con 5 mg/mL de extracto, durante cuatro horas.

Carril 6: Con 10 mg/mL de extracto, durante cuatro horas.

Carril 7: Con 50 mg/mL de extracto, durante cuatro horas.

Carril 8: Con 100 mg/mL de extracto, durante cuatro horas.

Carril 9: Extracto de "eucalipto" a concentración de 100 mg/mL (control).

Carril 10: ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a 500 ng/ μ L (control).

Volumen de carga:

Muestra (4 μ L) + loading (1 μ L) + agua bidestilada estéril (2 μ L) = 7 μ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

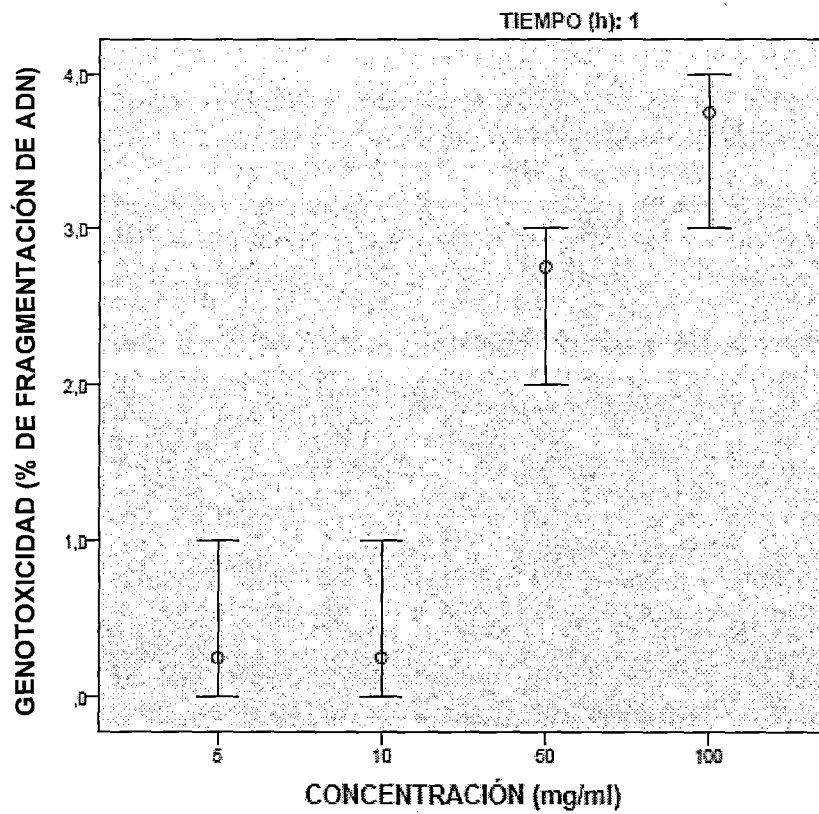


Figura 10. Genotoxicidad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, con extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación. Ayacucho, 2013.

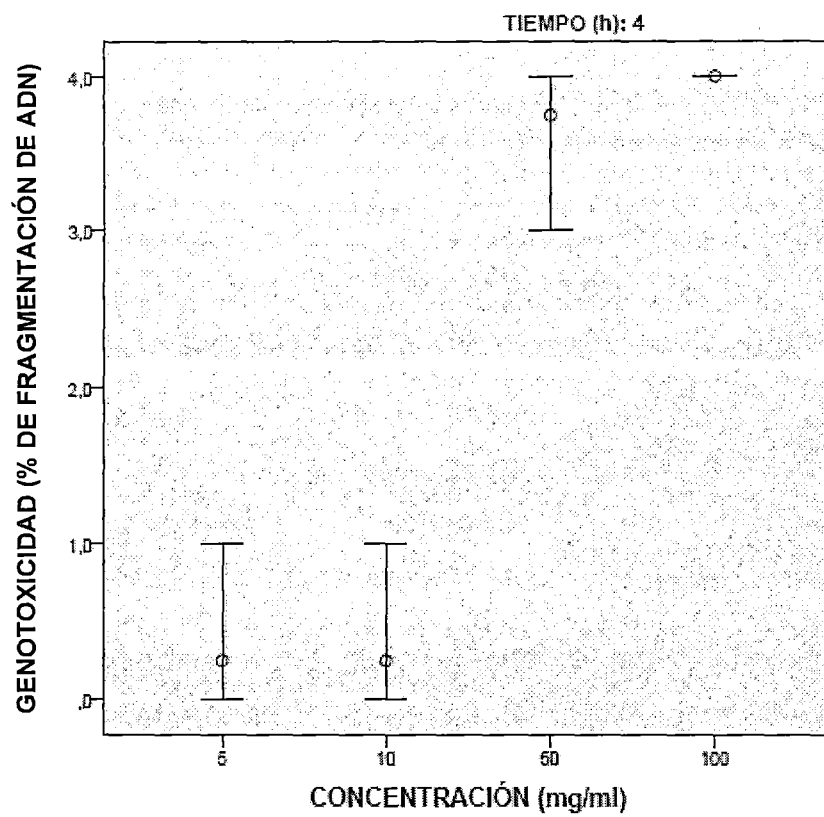


Figura 11. Genotoxicidad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, con extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a diferentes concentraciones, durante cuatro horas de incubación. Ayacucho, 2013.

V. DISCUSIÓN

El tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las flores de *Spartium junceum* L. "retama", muestra la tabla 4, la presencia de alcaloides, fenoles y/o taninos, flavonoides y quinonas en concentración abundante, un resultado positivo para identificar alcaloides debe ser la presencia de precipitado, los compuestos fenólicos pueden ser detectados por el intenso color verde, azul o negro que producen cuando se le agrega el cloruro férrico al 1%, con la reacción de Shinoda el cambio de color de amarillo a roja indica la presencia de flavonoides, en la identificación de quinonas indican que una coloración rojiza al realizar la prueba de Borntrager es considerado positivo y en concentraciones moderadas se identificó lactonas y/o cumarinas, con la prueba de Baljet se identifica cúmarinas que dan un precipitado de color naranja a rojo.³⁴ Estudios realizados por otros autores corroboran la presencia de algunos metabolitos encontrados al realizar el tamizaje fitoquímico de *Spartium junceum* L.^{4,5}

La tabla 5 muestran los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara", encontrados en abundancia fueron: alcaloides, lactonas y/o cumarinas, fenoles y/o taninos, flavonoides, quinonas. Estudios realizados nos confirma la presencia de estos metabolitos encontrados.^{8,24}

La tabla 6 muestran los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Eucalyptus globulus Labill* "eucalipto", fueron encontrados en abundancia: alcaloides, fenoles y/o taninos, flavonoides y en concentraciones moderadas se identificó lactonas y/o cumarinas, quinonas. Otros estudios nos afirma la presencia de estos metabolitos secundarios encontrados.^{20, 25}

La tabla 7 es referido a la cuantificación del ADN genómico extraído del *Staphylococcus aureus* mediante espectrofotometría, hemos tenido seis cultivos de los cuales se ha procedido extraer el ADN para cuantificar con A 260 la concentración de ADN y A 280 las proteínas, la concentración de ADN obtenida va desde valores de 1458,6 µg/mL hasta 2620,7 µg /mL, el nivel de pureza óptimo debe ser entre 1,8 a 2,0 y se observa que cuatro de ellas están dentro de ese rango con excepción de la tercera y sexta muestra, pero las concentraciones obtenidas son altas y el nivel de pureza es aceptable.³⁰

La figura 1 es el registro fotográfico con cámara digital a colores y con registrador de imágenes, que nos muestra los niveles de concentración de ADN que se ha obtenido de los seis cultivos utilizados para el presente estudio, fue corrido en gel de agarosa 0,8%, las concentraciones en los carriles 1, 2, 3 y 4 son muy similares igual que el 6, con una menor concentración en el carril 5, estas bandas coinciden directamente con las concentraciones determinadas por el método de espectrofotometría UV. Para hacer el corrido electroforético en el gel de agarosa 0,8% se realizó una dilución de 1 en 10 de la muestra de ADN obtenido de cada cultivo y esto nos permite ver las bandas bien definidas, aun así se ve que es bastante concentrado el contenido de ADN motivo por el que éstas quedan en los pocillos donde se ha sembrado.

La figura 2 muestra patrones de bandas de ADN extraído de *Staphylococcus aureus* los mismos que han sido llevados a concentraciones conocidas a partir de la solución madre del ADN que obtenido de los cultivos y determinado su

concentración por espectrofotometría UV, fue corrido en agarosa al 1%; en el carril 1 tenemos el corrido de ADN a una concentración de 60 ng, en el carril 2 de 120 ng, en el carril 3 de 180 ng y en el 4 de 240 ng, estas fueron sembradas a partir de un solo tubo de ADN que nos permita ver la relación directa entre la concentración de ADN, el tamaño de las bandas y la intensidad del color del bromuro de etidio por efecto de la luz ultravioleta, así como la distancia que ha recorrido con 50 voltios durante dos horas.

Los registros fotográficos de la figura 3, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a concentración inicial de 500 ng/ μ L, por efecto de los extractos hidroalcohólico extraídos de las flores de *Spartium junceum* L. "retama" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, que fueron realizados con dos tiempos de incubación a 37°C; los carriles 1 y 2 muestran el producto de la genotoxicidad de menor a 5%, el carril 3 fragmentación entre 5% a 20% y el carril 4 entre 20% a 40%, durante una hora de incubación. Los carriles 5, 6, 7 y 8 muestran productos de la genotoxicidad durante cuatro horas de incubación, podemos observar claramente que existen una disminución en la intensidad del color que va directamente proporcional a la concentración de ADN, así mismo, se puede apreciar que gradualmente se forma las "colas" que obedecen al corrido de fragmentos de ADN cada vez mayores que las anteriores; el carril 9 muestra el corrido del extracto hidroalcohólico a 100 mg/mL que no muestra la presencia de ADN, el carril 10 es el ADN control a 500 ng/ μ L con el que se empezó a trabajar la genotoxicidad.

Al analizar de manera general los dos tiempos de incubación, podemos corroborar que el tiempo influye en el efecto genotóxico ($p=0,021$) del *Spartium junceum* L. "retama", es así que la fragmentación es notoria a mayor tiempo

(Anexo 13). La concentración de igual manera influye directamente en la actividad genotóxica ($p=0,005$). (Anexo 14)

La figura 4 muestra la gráfica de genotoxicidad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, con extracto hidroalcohólico de la flores de *Spartium junceum L.* "retama" a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación a 37°C, que resulta ($p=0,025$), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 15)

La figura 5 muestra la gráfica de genotoxicidad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, con extracto hidroalcohólico de las flores de *Spartium junceum L.* "retama" a diferentes concentraciones, durante cuatro horas de incubación a 37°C, que resulta ($p=0,068$), por tanto las concentraciones ya no influyen en el efecto genotóxico. (Anexo 15)

Se reportan estudios realizados, de las plantas medicinales de otras familias, ya que no se encontró estudios de la familia de papilionaceae, ello nos refiere que la actividad genotóxica se le atribuye a los flavonoides, alcaloides.¹³ La actividad antibacteriana de *Spartium junceum L.* "retama" se evaluó en varios estudios, asignando la actividad antimicrobiana a los flavonoides, alcaloides, taninos.^{4,5}

Los registros fotográficos de electroforesis en gel de agarosa al 1% de la figura 6, son productos de la genotoxicidad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a 500 ng/ μ L por efectos del extracto hidroalcohólico de vainas de *Caesalpinea spinosa (Molina) Kuntze* "tara", a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL en dos tiempos de incubación a 37°C, podemos observar notoriamente que la intensidad del color de las bandas de ADN decaen relacionados directamente de la concentración y el tiempo de incubación, cuanto mayor es la concentración de extracto es mayor la fragmentación. El carril 1 (5 mg/mL) muestra una fragmentación entre 5 al 20%, los carriles 2 y 3 (10 mg/mL y 50 mg/mL) aumenta la fragmentación del ADN a una escala entre 40 a 95% y

el carril 4 (100 mg/mL) alcanza una fragmentación mayor a 95%, en una hora de incubación. Con cuatro horas de incubación, el carril 5 muestra fragmentación de ADN entre 20 a 40%, carril 6 entre 40 y 95%, mientras que los carriles 7 y 8 muestran una fragmentación mayor a 95%; el carril 9 es del extracto de tara que no contiene ADN (blanco) y el carril 10 el ADN control mostrando la cantidad con la cual se inició el proceso de genotoxicidad.

Al evaluar el tiempo de incubación (Anexo 16), resultando ($p=0,271$), nos indica que el tiempo no influye en el grado de fragmentación, como se observa en la figura 6, que a menor tiempo de incubación la genotoxicidad es muy notoria. Mientras que la concentración es muy influyente en el efecto genotóxico de la "tara", ($p=0,000$). (Anexo17)

La figura 7 muestra la gráfica de genotoxicidad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, con extracto hidroalcohólico de vaina de *Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze* "tara" a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación a 37°C, que resulta ($p=0,008$), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 18)

La figura 8 muestra la gráfica de genotoxicidad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, con extracto hidroalcohólico de vaina de *Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze* "tara" a diferentes concentraciones, durante cuatro horas de incubación a 37°C, que resulta ($p=0.004$), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 18)

Estudios revelan que efectivamente *Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze* "tara" muestra actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*.^{6, 7, 8, 9}. En uno de ellos indica que la presencia de taninos, flavonoides, alcaloides y péptidos son los responsables de la acción antimicrobiana de la tara.⁸

Un estudio nos afirma el efecto genotóxico del extracto acuoso de las vainas de *Caesalpinia spinosa* "tara" en células del meristemo radicular de *Allium cepa*

“cebolla”, la genotoxicidad se evidenció mediante la observación de anomalías en el núcleo y se concluye que la genotoxicidad del extracto es mayor a concentraciones de 0,1% y 1%.¹¹

La figura 9 muestra los registros fotográficos de electroforesis en gel de agarosa al 1% de la genotoxicidad de ADN genómico de *Staphylococcus aureus* de 500 ng/ μ L, por efecto del extracto hidroalcohólico obtenido de *Eucalyptus globulus Labill* “eucalipto” a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL con dos tiempos de incubación a 37°C, cuanto menor es la concentración del extracto como en los carriles 1 y 2 con 5 mg/mL y 10 mg/mL la genotoxicidad es mínima (menor de 5%), a concentración de 50mg/mL es entre 40% y 95%, mientras que con 100 mg/mL durante una hora, la fragmentación del ADN es mayor a 95%.

Se puede observar además, con cuatro horas de incubación, la fragmentación es similar entre 5 mg/mL y 10 mg/mL (menor a 5%), pero con 50 mg/mL la fragmentación del ADN es mayor a 95% y con 100mg/mL queda prácticamente fragmentado la totalidad de ADN (mayor a 95%); el carril 9 muestra el recorrido del extracto de “eucalipto” que no contiene ADN y en el carril 10 es el ADN control con el cual se inicio el proceso de genotoxicidad en todas estas condiciones.

El tiempo de incubación no es significativo en la actividad genotóxica ($p=0,515$), de “eucalipto” (Anexo 19). En cambio la concentración si influye ($p=0,00$). (Anexo 20)

La figura 10 muestra la gráfica de genotoxicidad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, con extracto hidroalcohólico de hojas de *Eucalyptus globulus Labill* “eucalipto” a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación a 37°C, que resulta ($p=0,004$), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 21)

La figura 11 muestra la gráfica de genotoxicidad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, con extracto hidroalcohólico de hojas de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a diferentes concentraciones, durante cuatro horas de incubación a 37°C, que resulta ($p=0,004$), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 21)

Eucalyptus globulus Labill "eucalipto" presenta actividad antibacteriana de acuerdo a los estudios realizados al igual que las dos plantas mencionadas anteriormente.^{9,10} La genotoxicidad se le puede atribuir a la presencia de flavonoides, taninos como se ha reportado en un estudio, encontrándose que existe una correlación positiva entre la ocurrencia de enfermedades y tumores en la población.³

Existen estudios que nos evidencia la genotoxicidad de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto", evaluó la genotoxicidad del aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, usando un ensayo de segregación somática y una cepa diploide de los hongos *Aspergillus nidulans*, la genotoxicidad del aceite se asoció con la inducción de sobrecruzamiento mitótico.¹² Así mismo se realizó de otras especies por el mismo tipo de ensayo, encontrándose daño genotóxico.¹⁴

Estos estudios realizados nos permite corroborar la genotoxicidad hallada en el presente trabajo de investigación, los cuales se realizaron con diferentes ensayos: ensayo cometa, prueba de *Allium cepa*, *Aspergillus nidulans*.^{11, 12, 13,}

Observando los registros fotográficos de las plantas medicinales en estudio, nos revela que con "retama" se presenta menor nivel de fragmentación de ADN, mientras que con "eucalipto" los niveles de degradación son altos a concentraciones mayores, quien presenta mayor capacidad degradativa de ADN viene a ser el extracto de "tara" puesto que aun sin dejar fragmentos degrada totalmente al ADN en proporción a la concentración de extracto.

VI. CONCLUSIONES

- Los extractos hidroalcohólico de las plantas medicinales antibacterianas estudiadas: flores de *Spartium junceum* L. "retama", vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y hojas de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto", presenta efecto genotóxico *in vitro* sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*.
- Los metabolitos secundarios presentes en la "retama", "tara" y "eucalipto" son alcaloides, lactonas y/o cumarinas, fenoles y/o taninos, flavonoides, quinonas.
- El daño genotóxico del extracto de "retama", depende del tiempo de incubación ($p=0,021$), la concentración influye a una hora de incubación ($p=0,025$) pero a cuatro horas de incubación ya no influye en el efecto genotóxico ($p=0,068$). La "tara" no presentó diferencia estadística significativa en el tiempo de incubación ($p=0,271$), pero la concentración es significativo a una y cuatro horas de incubación ($p=0,008$; $0,004$) respectivamente. El mismo caso para "eucalipto", el tiempo de incubación no influye ($p=0,515$), mientras que la concentración si interviene en el efecto genotóxico tanto a una y cuatro horas de incubación ($p=0,004$; $0,004$) respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

- Desarrollar trabajos de genotoxicidad en cultivos celulares con el “ensayo cometa” y ensayos *in vivo* para continuar con el conocimiento de estos efectos.
- Ampliar estudios de genotoxicidad con otras plantas medicinales de uso común en nuestra sociedad.
- Identificar los metabolitos secundarios de los extractos que presentaron actividad genotóxica en este estudio.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ángel Castañeda A. Evaluación de la actividad genotóxica de propóleos recolectados en diferentes apiarios de Cundinamarca y Boyacá. [tesis maestría]. Bogotá. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. 2012.
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 2014]; 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. Miranda T, Yarlequé J, Vila P, Ramírez A. Contribución al Estudio Fitoquímico y Farmacológico de la Flor de *Spartium junceum* "retama". XI Congreso Nacional de Biología. V Simposio Nacional de Educación en Ciencias Biológicas. Tacna – Perú; 1994.
5. Conoc Flores J. Estudio comparativo de la actividad inhibitoria de la flor de *Spartium junceum*, retama y ampicilina USP frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. [tesis de grado]. Ayacucho. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga; 2001.
6. Añanca Cotrado E. Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* "tara" en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* [tesis de grado]. Tacna – Perú; 2009.
7. Kloucek P, Polezny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska, L. Antibacterial Screening of Some Peruvian Medicinal Plants Used in Callería 96 District. J. of Ethnopharm [revista en Internet] 2005 [acceso febrero 2014]; 99(2):309-312. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894143>.
8. López C, Garró V, Yrei V. Acción antimicrobiana *Caesalpinia tintórea* (Molina) Kuntze "tara" de diferentes regiones del Perú. Centro Latinoamericano de enseñanza e investigación de Bacteriología alimentaria CLEIBA [revista en Internet] 1998 [acceso febrero 2014]; 1(1): 27-31. Disponible en: http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v01_n1/accoina.htm.
9. Liu H, Lengua L, León G, La Torre C, Huapaya J, Chauca J. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de los Extractos de *Caesalpinia spinosa* "tara" y *Eucalyptus sp.* "eucalipto". Revista Horizonte Médico [revista en Internet] 2002 [acceso febrero 2014]; 2(1). Disponible en: http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2002/Art7_Vol2_N1-2.pdf.
10. Damjanović B, Dakov T, Sukovic D, Damjanović J. Antimicrobial Effect of Essential Oil Isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. Czech J. Food Sci [revista en Internet] 2011 [acceso febrero 2014]; 29(3): 277-284. Disponible en: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/39925.pdf>.
11. Orihuela D, Villafani Y, Bonilla H, Marin L, Jiménez A, Romero Y, et al. Evaluación del efecto citotóxico y genotóxico de extractos acuosos de *caesalpinia spinosa* "tara" en células del meristemo radicular de *allium cepa*. Grupo estudiantil CIRGEN [revista en Internet] 2012 [acceso marzo 2014]; 21(5). Disponible en: http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/congres/basic/icbar_xxi/cap05.pdf

12. Miyamoto C, Rocha J, Da Silva C, Cunico M, Miguel OG, Cocco LC et al. Actividad genotóxica de aceite esencial de *Eucalyptus globulus* en *Aspergillus nidulans* células diploides. revised versión [revista en Internet] 2009 [acceso marzo 2014]; 54(6): 493-498. Disponible en: <http://www.link.springer.com/article/10.1007%2Fs12223-009-0070-1>
13. Reynoso Silva M. Evaluación de la genotoxicidad de compuestos aislados de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus* [tesis maestría]. Guadalajara. Universidad de Guadalajara; 2011.
14. Guevara E, González L, González R, Cabrera T, Medina R. Efecto genotóxico "in vitro" en *Melaleuca leucadentron* L. Revista médica Electrónica [revista en Internet] 2008 [acceso marzo 2014]; 30(2). Disponible en: <http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/año%202008/vol2/tema05>
15. Brugés K, Reguero M. Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. Revista Colombiana de Biotecnología [revista en Internet] 2007 [acceso febrero 2014]; 9(1): 5-13. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77690102>
16. Carballo M, Cortada C, Gadano A. Citogenética Humana y Genética Toxicológica. CIGETOX. Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA. Buenos Aires- Argentina; 2005.
17. Sung, I. Plantas Medicinales. 7ª ed. Lima: Isabel; 2000.
18. Font Quer. Plantas medicinales. El Dioscórides renovado. 7ª ed. España: Labor S.A.; 1981.
19. Yarlequé J, Aucasime L, Magallanes C, León E, Anaya R. El medicamento vegetal en la provincia de Huamanga y Lima Metropolitana. Instituto de Investigación de la FCB-UNSCH; 1990.
20. Bruneton J. Elementos de fitoquímica y farmacognosia. 1ª ed. Madrid: Acribia S.A.; 1991.
21. Cabello Liu I. Monografía para el cultivo de la tara, *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. Perúbiodiverso. Lima; 2009.
22. Cueva, A. Plantas medicinales: Propiedades y usos. 1ª ed. Lima: A.F.A.; 2003.
23. Andía H. Extracción de gomas de semillas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "Tara" procedentes de las provincias de Cañete, Lima y Sucre [tesis de grado]. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1994.
24. Huarino Acho M. Efecto antibacteriano de *Caesalpinia spinosa* "tara" sobre flora salival mixta [tesis de grado]. Lima: Facultad de Odontología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2011.
25. Velázquez Morales M. Evaluación del efecto antibiótico *in vivo* del *eucalyptus globulus labill* en *oryctolagus cuniculus* con pasteurellosis [tesis de grado]. Morelia: Universidad de San Nicolás de Hidalgo; 2013.
26. Janssen A, Scheffer J, Baerheim A. Antimicrobial activity of Essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the tests methods [revista en Internet] 1987 [acceso marzo 2014]; 53 (5): 395-398. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3324126>.
27. Madigan M, Martinko J, Parker J. Biología de los Microorganismos. 8ª ed. Madrid: Printice Hall Iberia; 1997.
28. Lehninger A, Nelson D, Cox M. Principios de Bioquímica. 2ª ed. Barcelona: Omega; 1995.
29. Lodish H, Berk A, Lawrence Z, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Biología celular y molecular. 4ª ed. Madrid: Médica Panamericana S.A.; 2002.

30. Carranza Díaz Z. Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del estado de Hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido [tesis pregrado]. Tulancingo de Bravo: Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2006.
31. Yoc A, Soto E, Gutiérrez J, Arriola M. Estudios de actividad biocida, citotóxica y genotóxica de tres plantas medicinales de la familia euphorbiaceae: *euphorbia lancifolia*, *cnidoscolus aconitifolius var. mansa* y *cnidoscolus aconitifolius var. estrella* [tesis de grado]. Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos; 2012.
32. Ramírez M. Mutágenos, químicos, físicos y biológicos. Guadalajara. Genética Ambiente y Salud. Universidad de Guadalajara; 2001.
33. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. 2ª ed. Lima: Fondo editorial; 1994.
34. 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. .
35. Miranda T, Valer G. Protocolos de Biología Molecular-Guía de práctica. Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2013.
36. Larrea Poma M. Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay [tesis de grado]. La Paz. Universidad Mayor de San Andrés; 2007.

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 8. Certificado de clasificación taxonómica de *Spartium junceum* L. "retama". Ayacucho, 2013.



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. Erika, AYALA PÉREZ, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis. Dicha muestra ha sido determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist, A. 1988, y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	FABALES
FAMILIA	:	PAPILIONACEAE
GENERO	:	<i>Spartium</i>
ESPECIE	:	<i>Spartium junceum</i> L.
N.V.	:	"retama"

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

Ayacucho, 10 de Octubre Mayo del 2013



Anexo 2

Tabla 9. Certificado de clasificación taxonómica de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara". Ayacucho, 2013.



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. Erika, AYALA PÉREZ, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	ROSIDAE
ORDEN	FABALES
FAMILIA	CAESALPINIACEAE
GENERO	Caesalpinia
ESPECIE	<i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze.
N. V.	"tara"

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

Ayacucho, 10 de Octubre Mayo del 2013



Anexo 3

Tabla 10. Certificado de clasificación taxonómica de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto". Ayacucho, 2013.



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. Erika, AYALA PÉREZ, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis. Dicha muestra ha sido determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist A 1968, y es como sigue:

DIVISIÓN	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	ROSIDAE
ORDEN	MYRTALES
FAMILIA	MYRTACEAE
GENERO	<i>Eucalyptus</i>
ESPECIE	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.
N.V.	"eucalipto"

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

Ayacucho, 10 de Octubre Mayo del 2013

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

Dra. Luzmila Huamán-Morales
2013

Anexo 4

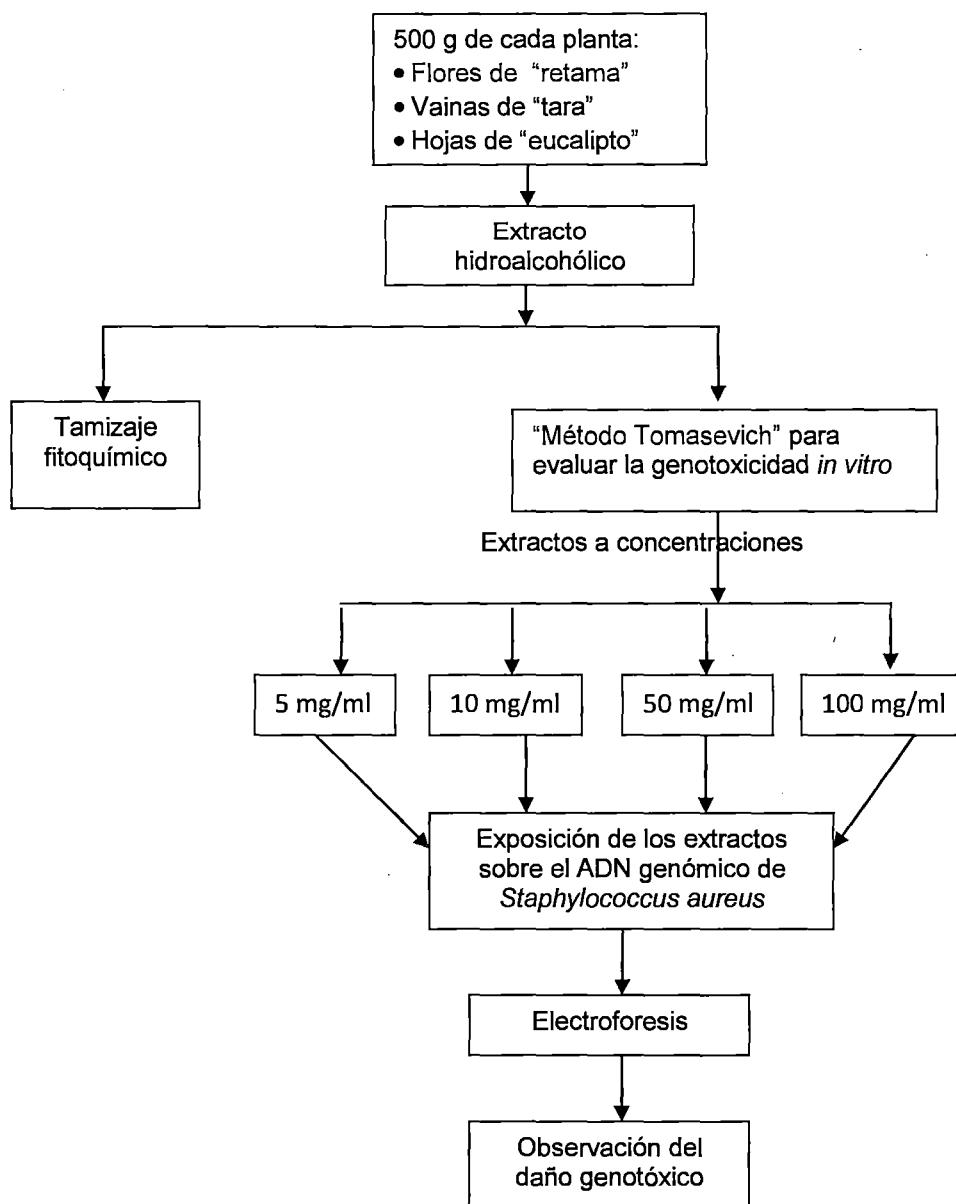


Figura 12. Esquema de la obtención del extracto hidroalcohólico y tamizaje fitoquímico de retama, tara y eucalipto para evaluar la genotoxicidad. Ayacucho, 2013.

Anexo 5

Tabla 11. Características producidas en los ensayos para la identificación de los metabolitos secundarios.

Metabolitos Secundarios	Ensayos con Reactivos	Observación
Alcaloides	Dragendorff	Hay formación de precipitado en todas las reacciones.
	Mayer	
	Hager	
	Wagner	
Lactonas y Cumarinas	Baljet	Formación de una coloración roja.
Flavonoides	Shinoda	Hay coloración amarilla, naranja, carmelita o rojo en la fase amílica.
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.
Azúcares reductoras	Benedict	Si es positivo hay formación de precipitado rojo ladrillo.
Taninos y Fenoles	Cloruro Férrico	Formación de una coloración negruzca.
Aminas (aminoácidos)	Ninhidrina	Hay coloración violeta.
Cardenólidos	Kedde	Coloración violácea.

Fuente: Miranda M., 2000

Anexo 6

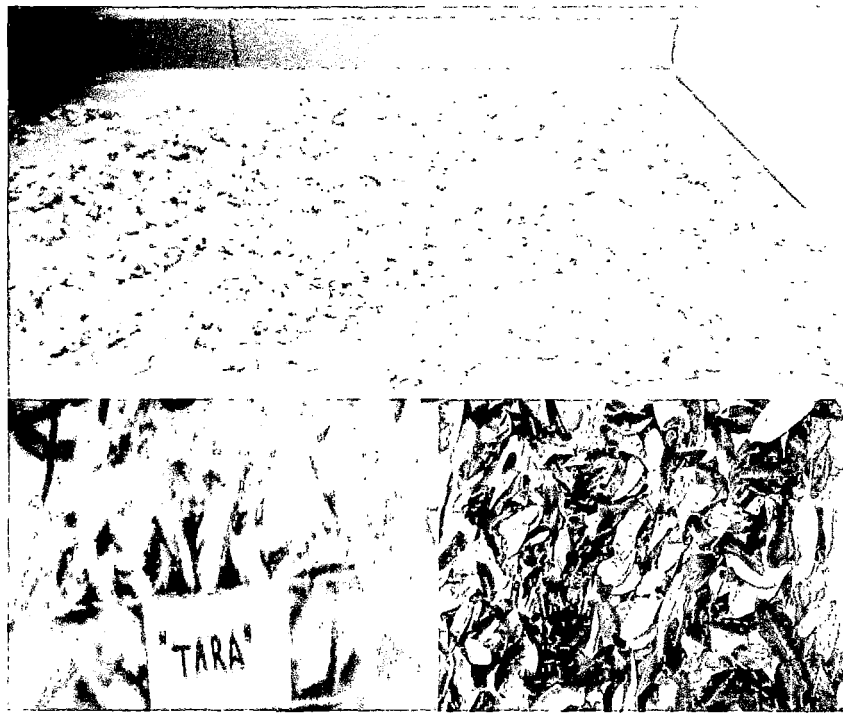


Figura 7. Secado a temperatura ambiente de las flores de *Spartium junceum* L. "retama", vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y hojas de *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto". Ayacucho, 2013.

Anexo 7

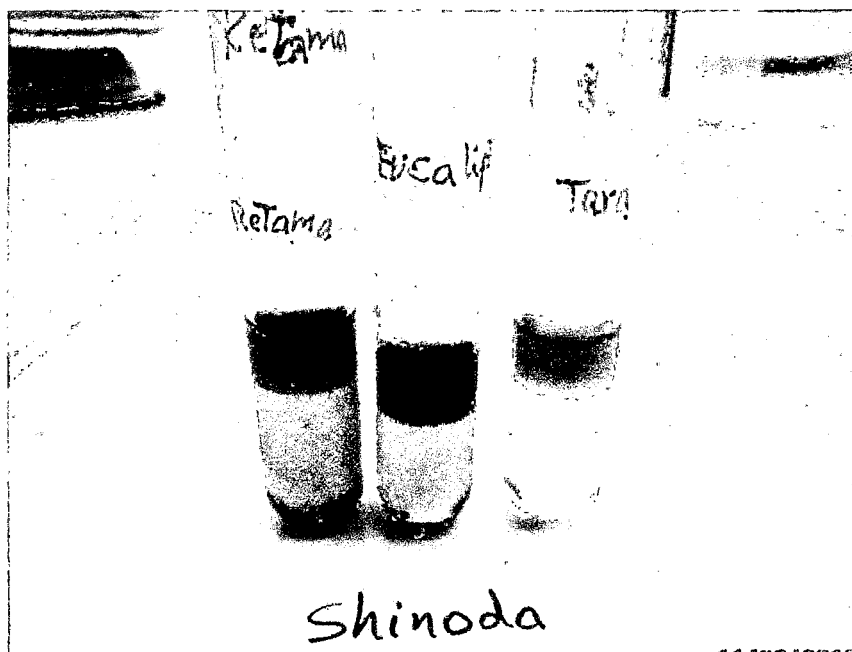


Figura 8. Tamizaje fitoquímico (reacción de Shinoda) del extracto hidroalcohólico de *Spartium junceum* L. "retama", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto". Ayacucho, 2013.

Anexo 8



Figura 9. Cultivo de las cepas de *Staphylococcus aureus* y obtención del ADN genómico para la evaluación de genotoxicidad de plantas medicinales en estudio. Ayacucho, 2013.

Anexo 9

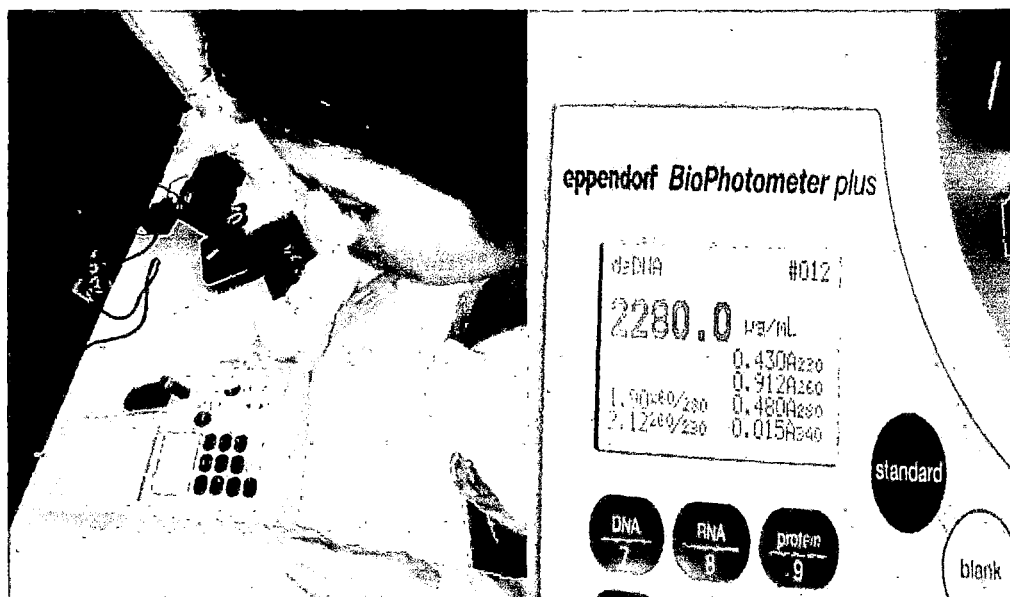


Figura 10. Cuantificación por espectrofotometría UV de ADN genómico extraída de *Staphylococcus aureus*, para la evaluación de genotoxicidad de plantas medicinales en estudio. Ayacucho, 2013.

Anexo 10

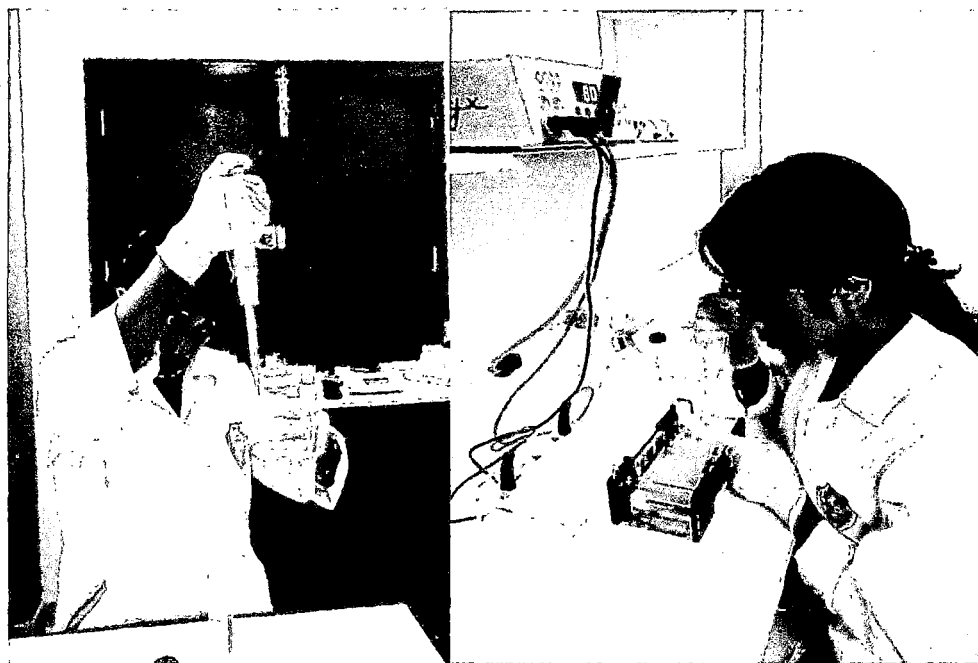


Figura 11. Ensayo *in vitro* y electroforesis en gel de agarosa al 1%, para la evaluación de genotoxicidad de plantas medicinales en estudio. Ayacucho, 2013.

Anexo 11



Figura 12. Registro fotográfico de la genotoxicidad de plantas medicinales evaluadas. Ayacucho, 2013.

Anexo 12

Tabla 12. Valores numéricas del grado de genotoxicidad de las plantas medicinales en estudio, según la concentración del extracto hidroalcohólico y tiempo de incubación. Ayacucho, 2013.

Tiempo de incubación (h)	Concentración del extracto hidroalcohólico (mg/ml)											
	retama				tara				eucalipto			
	5	10	50	100	5	10	50	100	5	10	50	100
1	0	0	1	1	1	2	3	4	0	0	2	4
	1	0	0	2	1	3	3	3	1	0	3	4
	0	1	1	2	1	3	2	4	0	1	3	3
	0	0	1	2	2	3	3	4	0	0	3	4
4	1	1	2	2	1	3	3	4	0	0	4	4
	0	1	1	2	1	3	4	4	0	1	3	4
	1	2	2	1	2	2	4	4	1	0	4	4
	1	1	2	2	2	3	4	4	0	0	4	4

Anexo 13

Tabla 13. Resultados de la prueba de Mann-Whitney, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la flor de *Spartium junceum* L. "retama", según el tiempo de incubación. Ayacucho, 2013.

Categorización en tiempo	N	Rango de promedio	Suma de rangos
1	16	12,94	207,0
4	16	20,06	321,0
Estadísticos de prueba			
U de Mann-Whitney			71,0
W de Wilconxon			207,0
Z			-2,302
Sig. asintótica (bilateral)			0,021
Significación exacta [2* (Sig. unilateral)]			0,032

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

Anexo 14

Tabla 14. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la flor de *Spartium junceum* L. "retama", según la concentración. Ayacucho, 2013.

Categorización por concentración (mg/ml)	N	Rango promedio
5	8	10,00
10	8	12,88
50	8	18,63
100	8	24,50
Estadísticos de prueba		
Chi-cuadrado		12,933
Gl		3
Sig. asintótica		0,005

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

Anexo 15

Tabla 15. Resultados da la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la flor de *Spartium junceum L.* "retama", según la concentración a dos tiempos de incubación. Ayacucho, 2013.

Categorización por tiempo (h)	Concentración (mg/ml)	N	Rango de promedio
1	5	4	5,63
	10	4	5,63
	50	4	8,88
	100	4	13,88
	total	16	
4	5	4	4,38
	10	4	7,38
	50	4	11,13
	100	4	11,13
	total	16	
Estadísticos de prueba			
tiempo	1	Chi-cuadrado	9,346
		gl	3
		Sig. asintótica	0,025
	4	Chi-cuadrado	7,125
		gl	3
		Sig. asintótica	0,068

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

Anexo 16

Tabla 16. Resultados de la prueba de Mann-Whitney, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la vaina de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara", según el tiempo de incubación. Ayacucho, 2013.

Categorización en tiempo	N	Rango de promedio	Suma de rangos
1	16	14,75	236,0
4	16	18,25	292,0
Estadísticos de prueba			
U de Mann-Whitney			100,0
W de Wilconxon			236,0
Z			-1,101
Sig. asintótica (bilateral)			0,271
Significación exacta [2* (Sig. unilateral)]			0,305

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

Anexo 17

Tabla 17. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la vaina de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara", según la concentración. Ayacucho, 2013.

Categorización por concentración (mg/ml)	N	Rango promedio
5	8	5,06
10	8	14,88
50	8	19,88
100	8	26,19
Estadísticos de prueba		
Chi-cuadrado		23,603
Gl		3
Sig. asintótica		0,000

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

Anexo 18

Tabla 18. Resultados da la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la vaina de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara", según la concentración a dos tiempos de incubación. Ayacucho, 2013.

Categorización por tiempo (h)	Concentración (mg/ml)	N	Rango de promedio
1	5	4	2,75
	10	4	8,75
	50	4	8,75
	100	4	13,75
	total	16	
4	5	4	2,75
	10	4	6,63
	50	4	11,63
	100	4	13,00
	total	16	
Estadísticos de prueba			
tiempo	1	Chi-cuadrado	11,912
		gl	3
	Sig. asintótica	0,008	
	4	Chi-cuadrado	13,122
		gl	3
		Sig. asintótica	0,004

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

Anexo 19

Tabla 19. Resultados de la prueba de Mann-Whitney, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la hoja de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto", según el tiempo de incubación. Ayacucho, 2013.

Categorización en tiempo	N	Rango de promedio	Suma de rangos
1	16	15,47	247,50
4	16	17,53	280,50
Estadísticos de prueba			
U de Mann-Whitney			111,500
W de Wilconxon			247,500
Z			-0,651
Sig. asintótica (bilateral)			0,515
Significación exacta [2 [*] (Sig. unilateral)]			0,539

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

Anexo 20

Tabla 20. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la hoja de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto", según la concentración. Ayacucho, 2013.

Categorización por concentración (mg/ml)	N	Rango promedio
5	8	8,50
10	8	8,50
50	8	22,44
100	8	26,56
Estadísticos de prueba		
Chi-cuadrado		26,371
Gl		3
Sig. asintótica		0,000

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

Anexo 21

Tabla 21. Resultados da la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la gentoxicidad del extracto hidroalcohólico de la hoja de *Eucaliptus globulus Labill* "eucalipto".según la concentración a dos tiempos de incubación. Ayacucho, 2013.

Categorización por tiempo (h)	Concentración (mg/ml)	N	Rango de promedio
1	5	4	4,50
	10	4	4,50
	50	4	10,88
	100	4	14,13
	total	16	
4	5	4	4,50
	10	4	4,50
	50	4	12,00
	100	4	13,00
	total	16	
Estadísticos de prueba			
tiempo	1	Chi-cuadrado	13,196
		gl	3
	Sig. asintótica	0,004	
	4	Chi-cuadrado	13,163
		gl	3
		Sig. asintótica	0,004

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: concentración (mg/ml)

Anexo 22

Tabla 22. Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Efecto genotóxico <i>in vitro</i> de plantas medicinales antibacterianas <i>Spartium junceum</i> L. "retama", <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto". Ayacucho-2013.	¿Cuál será el efecto genotóxico <i>in vitro</i> de plantas medicinales antibacterianas <i>Spartium junceum</i> L. "retama", <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto"?	GENERAL Evaluar el efecto genotóxico <i>in vitro</i> de las plantas medicinales antibacterianas <i>Spartium junceum</i> L. "retama", <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto". ESPECÍFICOS • Identificar los metabolitos secundarios presentes en las plantas medicinales antibacterianas <i>Spartium junceum</i> L. "retama", <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto". • Caracterizar el efecto de la genotoxicidad de las plantas medicinales antibacterianas en estudio, con ensayos <i>in vitro</i> sobre el ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> mediante electroforesis.	-Aspectos Botánicos de <i>Spartium junceum</i> L. "retama", <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto": Clasificación taxonómica, descripción botánica, usos en la medicina tradicional, composición química, estudios farmacológicos. -Staphylococcus aureus. -Estructura de ADN -Determinación de la pureza y cuantificación de ADN -Genotoxicidad. -Electroforesis	Las plantas medicinales antibacterianas <i>Spartium junceum</i> L. "retama", <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto", presentan efecto genotóxico <i>in vitro</i> sobre el ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> .	Variable Principal: Plantas medicinales antibacterianas <i>Spartium junceum</i> L. "retama", <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto". Indicador: -Especies de plantas medicinales antibacterianas <i>Spartium junceum</i> L. "retama", <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto". Variable secundaria: Efecto genotóxico <i>in vitro</i> de las plantas medicinales. Indicador: Fragmentación del Ácido desoxirribonucleico (ADN).	Tipo de investigación : Básica – descriptivo. Nivel de investigación: Básico Población: <i>Spartium junceum</i> L. "retama", <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto", que crecen en la comunidad de Colpa del distrito de Acos Vinchos de la provincia de Huamanga del departamento de Ayacucho. Muestra: 500 g de flores de <i>Spartium junceum</i> L. "retama", <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto". Diseño de investigación: Los ensayos se realizaron con un modelo <i>in vitro</i> para estudiar la actividad genotóxica de los extractos hidroalcohólico, sobre el ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> , demostrándose por su fragmentación. Análisis estadístico: Los datos fueron agrupados y presentados en tablas, expresados en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. El daño genotóxico se evaluó mediante el paquete estadístico SPSS, se utilizó la prueba de Mann-Whitney de comparación de máximos y mínimos para dos muestras independientes y Kruskal-Wallis para más de dos muestras independientes. El valor de $p \leq 0,05$, se consideró como el nivel estadísticamente significativo.