

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**Efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico
de *Juglans neotropica* Diels “nogal” frente a ADN
genómicos humano y de *Staphylococcus aureus*.
Ayacucho, 2018.**

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

**Presentado por la:
Bach. RONDINEL VALENZUELA, Gaby**

**AYACUCHO – PERÚ
2019**

A mi madre Erasma Valenzuela de Rondinel, a mi pareja Joel Atao Quispe y a mis hermanos con todo cariño quienes me enseñaron el mejor camino a seguir, que con su apoyo y confianza logre culminar mi profesión.

AGRADECIMIENTOS

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

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

A mis asesores el Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich y Blga. Miriam Moreno Hinojosa, quienes accedieron a brindarme toda su paciencia, capacidad y experiencia científica.

A mis amigos Nélide, Esmeralda, John, Yudith por su apoyo incondicional y confianza brindada en todo momento, que siempre estuvieron conmigo apoyándome en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedente	3
2.2. Marco conceptual	6
2.2.1. <i>Neotropica Diels</i> “nogal”	6
2.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.2.3. Nucleico	12
2.2.4. Electroforesis en gel	13
2.2.5. Toxicidad y genotoxicidad	15
2.2.6. Ensayo cometa	19
2.2.7. Evaluación de la genotoxicidad in vitro: Método Tomasevich	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Lugar de ejecución	23
3.2. Población y muestra	23
3.2.1. Población	23
3.2.2. Muestra	23
3.2.3. Muestreo	23
3.3. Unidad experimental	23
3.4. Metodología y recolección de datos	23
3.4.1. Recolección e identificación de la muestra	23
3.4.2. Preparación del extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”	24
3.4.3. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”	24
3.4.4. Obtención de ADN genómico humano	24
3.4.5. Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> y extracción de ADN genómico	26

3.4.6. Cuantificación de ADN genómico humano y de <i>Staphylococcus aureus</i>	27
3.4.7. Ensayos de la genotoxicidad <i>in vitro</i>	28
3.5. Tipo de investigación	30
3.5.1. Diseño de investigación	30
3.6. Análisis de datos estadísticos	31
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSIÓN	45
VI. CONCLUSIONES	51
VII. RECOMENDACIONES	53
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	59

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Juglans neotropica</i> Diels. “nogal”	7
Tabla 2. Preparación de carga de ADN para visualización de banda en electroforesis	27
Tabla 3. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> de extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”, sobre ADN genómico humano y de <i>Staphylococcus aureus</i> , respectivamente	29
Tabla 4. Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN genómico humano y de <i>Staphylococcus aureus</i> , respectivamente, con el extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”, para el ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>	29
Tabla 5. Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.	30
Tabla 6. Diseño de investigación con pos prueba únicamente y grupo de control.	30
Tabla 7. Metabolitos secundarios analizados en el extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”. Ayacucho 2018	35
Tabla 8. Valores numéricos de cuatro ensayos de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, frente a ADN genómico humano y de <i>Staphylococcus aureus</i> , incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal peruano”	8
Figura 2. Estructuras químicas de algunos componentes de <i>Juglans neotropica</i> Diels. De: Gibaja Oviedo S. Pigmentos naturales quinónicos.	9
Figura 3. Estructura química de ADN	13
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico humano (carriles 1, 2 y 3), y de <i>Staphylococcus aureus</i> obtenido de tres cultivos (carriles 4, 5 y 6) y coloreado con bromuro de etidio. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018	36
Figura 5. Primer ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, frente a ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.- UNSCH. Ayacucho 2018	37
Figura 6. Segundo ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, frente a ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018	38
Figura 7. Primer ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, frente a ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018	39
Figura 8. Segundo ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, frente a ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018	40

- Figura 9. Genotoxicidad en porcentaje de fragmentación de ADN, según la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, frente a ADN genómico humano. Prueba de Kruskal-Wallis (H=19, GL=4, p=0,001). Ayacucho 2018 42
- Figura 10. Genotoxicidad en porcentaje de fragmentación de ADN, según la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, frente a ADN genómico de *Staphylococcus aureus*. Prueba de Kruskal-Wallis (H=19, GL=4, p=0,001). Ayacucho 2018 43

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Clasificación taxonómica de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal peruano”	61
Anexo 2. Descripción botánica <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal peruano”	62
Anexo 3. Clasificación taxonómica de <i>Staphylococcus aureus</i>	63
Anexo 4. Diagrama para la obtención del extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal peruano”.	64
Anexo 5. Obtención del extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal peruano”	65
Anexo 6. Metabolitos secundarios encontrados en el extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal peruano”.	66
Anexo 7. Proceso de cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> Ayacucho 2018.	67
Anexo 8. Proceso de extracción de ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> Ayacucho 2018	68
Anexo 9. Proceso de preparación a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal peruano”	69
Anexo 10. Proceso para la determinación del Efecto genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” frente a ADN genómicos humano y de <i>Staphylococcus aureus</i> . Ayacucho, 2018	70
Anexo 11. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar el efecto genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” frente a ADN genómicos humano y de <i>Staphylococcus aureus</i> . Ayacucho, 2018	71
Anexo 12. Diagrama de flujo de electroforesis	72
Anexo 13. Matriz de consistencia	73

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels "nogal" frente a ADN genómico humano y de *Staphylococcus aureus*"; se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad Ciencias de la Salud y en el Centro de Investigación de Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. El extracto hidroalcohólico de la planta, fue obtenido por maceración en etanol : agua (3 : 1); se realizó el análisis fitoquímico; luego la determinación genotóxica a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL del extracto respectivamente, enfrentándose al ADN genómico humano y de *Staphylococcus aureus*; la estimación del daño genotóxico *in vitro* fue determinado mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1 % y visualizado en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra UVsolo TS. Los metabolitos secundarios identificados en el extracto hidroalcohólico fueron flavonoides, compuestos fenólicos, cardenólidos y alcaloides. Los ensayos de genotoxicidad revelan igual resultado tanto con el ADN genómico humano como de *Staphylococcus aureus*. A concentraciones de 5 y 10 mg/mL, respectivamente, generaron la fragmentación menor al 5 % del ADN; con 25 mg/mL, entre el 5 al 20 % del ADN; con 50 mg/mL, entre 40 al 95 % del ADN y con 100 mg/mL, la fragmentación es mayor al 95 % del ADN sometido al tratamiento, En conclusión, el extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels "nogal" a 50 y 100 mg/mL, respectivamente, presentó un potente efecto genotóxico frente al ADN genómico humano y de *Staphylococcus aureus*.

Palabras clave: Genotoxicidad, ADN genómico, *Juglans neotropica*.

I. INTRODUCCIÓN

Juglans neotropica Diels “nogal” es una especie nativa de América del Sur, especialmente se encuentra en Ecuador, Colombia, Venezuela y Perú.¹ El género *Juglans*; comprende 15 especies nativas del Sureste de Europa, Asia y América del Norte y del Sur. Algunas especies de este género son: *Juglans regia* L., *Juglans nigra* L., *Juglans cinerea* L., *Juglans ailanthifolia* Carrière, y *Juglans neotropica* Diels (nogal peruano).^{2,3}

En Perú, Las hojas de “nogal” son consideradas fuente de compuestos saludables y han sido usadas ampliamente en la medicina tradicional para el tratamiento de dermatitis, insuficiencia venosa y úlceras; y posee propiedades antidiarreicas, antihelmínticas, antisépticas, antibacterianas, astringentes, antioxidantes, anti fúngicos, hipoglicémicas y antiproliferativas. Se ha reportado que las flores poseen propiedades antidepresivas, antihipóxicas, antihemolíticas y antiinflamatorias. Los frutos también poseen propiedades antioxidantes.^{4,5}

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

Los ensayos de genotoxicidad de las plantas medicinales, han alcanzado gran importancia en los últimos años, estas pruebas permiten medir daño que puede causar los metabolitos secundarios, a nivel del ADN de la célula que esté recibiendo el tratamiento con estos productos vegetales.

Uno de los ensayos útiles para la detección de daño simple y de doble cadena al ADN es la electroforesis de una sola célula (Ensayo Cometa), donde se evalúan los niveles de daño y reparación al ADN en poblaciones celulares sin la

necesidad de trabajar con células en proliferación. Es un sistema potencialmente sensible para evidenciar daño genotóxico inducido.⁶ El fundamento de esta técnica consiste en lisar las células de interés, embebidas en un gel de agarosa, por medio de detergentes y altas concentraciones de sal. Posteriormente el ADN liberado será sometido a la acción de un campo eléctrico a pH neutro.^{6, 7} En las células en las que exista incremento del daño al ADN se formarán pequeños fragmentos, estos al ser sometidos a una corriente eléctrica tendrán la propiedad de penetrar en la malla de agarosa migrando de esta manera hacia el ánodo. La capacidad del ADN de migrar hacia el ánodo dependerá del tamaño, forma y peso molecular de los fragmentos generados por la lesión. Por medio de la coloración con bromuro de etidio (colorante con afinidad por el ADN) darán la imagen de pequeños cometas. El largo del cometa se incrementa con el daño inducido a la doble hélice del ADN.^{7, 8, 9} El interés sobre el ensayo cometa se ha incrementado notablemente en los últimos años, debido a que ha demostrado ser un método extremadamente sensible en la detección del daño al ADN a nivel celular.^{10, 11}

En el presente estudio, la estimación del daño genotóxico *in vitro* fue determinado con el “método Tomasevich”, que consiste en exponer al ADN genómico humano y de *Staphylococcus aureus*, respectivamente; a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de “nogal”, incubados a 37 °C, luego sometido a electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1 % y visualizado en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra *UVsolo TS*, constituyendo un método eficaz y eficiente para determinar la genotoxicidad de las plantas medicinales.¹²

Se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Evaluar el efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” frente a ADN genómicos humano y de *Staphylococcus aureus*.

Objetivos específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”.
- Evidenciar la genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, frente a ADN genómicos humano y de *Staphylococcus aureus*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

En lo que se refiere a investigaciones de efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal” frente a ADN genómicos humano y de *Staphylococcus aureus*, en Perú no se realizaron trabajos de investigación, tampoco en otros países del continente de América.

Perú es uno de los países megadiversos del mundo y posee una amplia cultura con respecto al uso de las plantas medicinales. La Amazonía peruana es una de las zonas del planeta con mayor diversidad vegetal, de la cual menos del 1% ha sido estudiada desde el punto de vista fitoquímico y farmacológico, por lo que su estudio podría conducir al descubrimiento de un gran número de nuevas moléculas bioactivas con posible aplicación terapéutica.⁹

Actualmente los médicos enfrentan a las infecciones crónicas bacterianas, micóticas, víricas y protozoarias con tratamientos que resultan ser prolongadas y en muchos casos sin resultados óptimos; en este sentido se presenta, el uso de productos de origen vegetal como una alternativa frente a este problema.¹⁰

Las enfermedades infecciosas representan un problema de salud y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, a nivel mundial. En la naturaleza, la mayoría de los microorganismos viven en grupos formados por muchedumbres, que se adhieren a una superficie, este tipo de comunidades se conoce como biopelícula.¹⁰ La biopelícula es uno de los factores de virulencia más importantes de los estafilococos y juega un papel en muchas infecciones tales como la endocarditis de válvula nativa, otitis media, infecciones del tracto urinario, infecciones del sistema respiratorio, fibrosis quística, artritis séptica aguda y otras relacionadas con dispositivos médicos.¹²

Se demostraron la actividad antibacteriana de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, que podría ser una de las candidatas para el desarrollo de agentes antimicrobianos y/o fitomedicamento estandarizado, actualmente no hay estudios

realizadas que demuestra el efecto genotóxico, pero han reportado un trabajo de investigación donde demostró que *Juglans regia* tiene la actividad antibiopelícula contra *Staphylococcus aureus* meticilina resistente con una IC 50 < 32 µg/mL.⁵

Quiros¹³ evaluó la actividad cicatrizante de un gel elaborado a base de los extractos de “nogal” (*Juglans neotrópica* Diels), “ortiga” (*Urtica dioica* L), “sábila” (*Aloe vera*) con heridas inducidas en el dorso de los ratones previamente depiladas (*Mus musculus*). Se demostró que el gel posee actividad cicatrizante en heridas cutáneas menores afirmando la hipótesis planteada, debido a la presencia de taninos de nogal, flavonoides de ortiga, y mucílagos de sábila, que al combinarse presentan sinergia.

Hurtado P¹. Jurado¹⁴ evaluaron la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico estandarizado de las hojas de *Juglans neotropica* Diels. Se usaron hojas provenientes del distrito de Huandoval, provincia de Pallasca, Región Ancash. El análisis de estandarización comprendió determinación de humedad, parámetros fisicoquímicos, marcha de solubilidad, tamizaje fitoquímico y cromatografía en capa fina; la actividad antioxidante fue determinada por el ensayo de inhibición de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). En tamizaje fitoquímico hubo mayor concentración de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante se presentó a 25 y 35 µg/ mL, respectivamente, con un IC 50 de 12,82 µg/mL. En conclusión, el extracto hidroalcohólico estandarizado de hojas de *Juglans neotropica* Diels cumplió con los parámetros de calidad, presentando alta actividad antioxidante.

Juro¹⁵ demostraron que la emulsión aceite en agua y el hidrogel del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano” presentaron mayor actividad cicatrizante frente a otras formulaciones y al fármaco patrón (Cicatrin).

Hurtado¹⁶ demostró que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels posee carbohidratos, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, antraquinonas, triterpenos, esteroides, saponinas y alcaloides. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano” fue efectivo como agente gastroprotector en un modelo de inducción de úlceras gástricas por etanol 96°.

Julio¹⁷ demostraron la actividad antiestafilocócica *in-vitro* de los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de tres plantas medicinales peruanas: *Juglans neotropica* Diels (corteza), *Piper lineatum* Ruiz & Pav. (hojas) y *Terminalia catappa* L. (hojas); recolectadas en las regiones de Amazonas y Cajamarca, en

el Perú. La actividad antiestafilocócica se evaluó mediante el método de microdilución. Los microorganismos utilizados fueron las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Los extractos investigados presentaron actividad significativa frente a ambas bacterias, con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 125 a 500 µg/mL para *Staphylococcus aureus*, teniendo mayor actividad el extracto etanólico de *Juglans neotropica* Diels, y de 250 a 500 µg/mL para *Staphylococcus epidermidis*, teniendo mayor actividad el extracto hidroalcohólico de *Piper lineatum* Ruiz & Pav. Solamente los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de las hojas de *Piper lineatum* L. poseen actividad significativa con CMIB de 500 µg/mL para ambas cepas. Los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de *Piper lineatum* L. pueden ser buenos candidatos para la búsqueda de metabolitos que sirvan para combatir infecciones asociadas a biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Carballo y col², Realizaron un estudio a nivel genotóxico de las plantas medicinales: *Chenopodium multifidum* L. (Chenopodiaceae); *Litheraea molleoides* Vell. Engl. (Anacardiaceae); *Styphnolobium japonicum* L. Schott. (Fabaceae); *Prosopis alba* Gris (Mimosaceae); *Schkuhria pinnata* (Lam) (Asteraceae); *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 sisymbriifolium* (espino colorado) y *Lithaea molleoides* (molle de beber), indujeron daño al ADN, induciendo roturas y cadena simple y doble.

Marca y col¹⁸ que evaluaron la genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum* L. "ajo". El extracto etanólico del bulbo de "ajo" a concentraciones de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500mg/mL, respectivamente, no presentaron efecto genotóxico frente al DNA genómico de *Staphylococcus sp.*; mientras que el zumo del bulbo de "ajo", a concentraciones de 5, 10, 50 y 100 %, si presentaron un potente efecto genotóxico, fragmentando el 100 % del DNA, la prueba de Kruskal-Wallis reportó H=0,53, GL=3 y p=0,912. Concluyeron que el zumo del bulbo de *Allium sativum* L. "ajo", presenta una potente actividad genotóxica frente al DNA genómico de *Staphylococcus sp.*

Pillaca¹⁹, En su estudio demostró el efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antivirales *Ficus carica* "higo" y *Euphorbia peplus* "leche leche". Los resultados revelan que el látex de estas dos plantas tienen efecto genotóxico

sobre ADN genómico de linfocitos humano, donde el tiempo de incubación a una y cuatro horas, no influye en el efecto; mientras que las concentraciones de los extractos, sí influyen en el efecto genotóxico.

Rodriguez¹⁰, utilizó el método de Macrodilución a las concentraciones de 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 y 0,25 mg/mL, prueba que permite medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos patógenos. Utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922; Al analizar los resultados se observó que los extractos etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* (papayo) presentaron actividad antibacteriana a dichas concentraciones.

Miranda y col²⁰ estudiaron el efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Xanthium catharticum* HBK “amor seco” frente a ADN genómico humano, e identificaron los metabolitos secundarios presentes en el extracto: alcaloides y flavonoides en cantidad abundante; quinonas en cantidad moderada; y fenoles y/o taninos en escasa cantidad. El extracto hidroalcohólico a concentración de 50 mg/mL y 100 mg/mL presentó alto efecto genotóxico, fragmentando entre el 20 al 95 %; mientras que a concentraciones de 200 mg/mL hasta 500 mg/mL, presentaron un potente efecto genotóxico, fragmentando mayor al 95 % del ADN.

Moreno y Col²¹ reportan un estudio planteando como objetivo evaluar de la genotoxicidad *in vitro* de látex fresco y cristalizado de *Carica papaya* L. “papaya”, frente a ADN genómico humano. Todos los registros fotográficos de los corridos electroforéticos, revelan que las siete concentraciones ensayadas de 1 %, 2.5 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 % y 100 % de látex fresco, fragmentaron totalmente al ADN genómico humano; mientras que las concentraciones de 10 %, 25 % y 50 % de látex cristalizado, han fragmentado entre 20 % al 40 % del ADN y a concentración de 100 % de látex cristalizado degradado entre el 40 % al 95 % del ADN genómico humano, demostrando que la genotoxicidad del látex cristalizado si depende de su concentración.

2.2. Marco conceptual

2.2.1. *Juglans neotropica* Diels. “nogal”

2.2.1.1. Clasificación Taxonómica

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

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Juglans neotropica* Diels. “nogal”

CATEGORÍA	CLASIFICACIÓN
DIVISIÓN	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	HAMAMELIDEA
ORDEN	JUGLANDALES
FAMILIA	JUGLANDACEAE
GÉNERO	<i>Juglans</i>
ESPECIE	<i>Juglans neotropica</i> Diels.
N. V.	“Nogal”

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamanguensis* – 2018 (anexo 1)

2.2.1.2. Descripción botánica

Árbol de hasta 35 m de altura y de 30 cm a 120 cm de diámetro. Tiene el fuste recto y cilíndrico, corteza externa agrietada, color marrón oscuro a negruzco, con placas rectangulares que se desprenden espontáneamente, la interna color crema claro. Hojas compuestas y alternas. Mide 20 cm a 45 cm de largo con 4 a 12 pares de hojuelas, cada una de ellas de 5 cm a 10 cm de largo, ápice agudo y borde aserrado; cubiertas de finos y diminutos pelos por el reverso, lo que les otorga una textura afelpada. Las hojas frescas poseen olor a melaza al estrujarse. Flores muy pequeñas de un solo sexo, agrupadas en espigas pendulares separadas. Las masculinas miden de 5 mm a 9 mm y tienen numerosos estambres, las femeninas miden de 2 mm a 5 mm y poseen un solo pistilo. Frutos globosos, de 4 cm a 6 cm de diámetro, con superficie lisa, poseen pulpa carnosa y una semilla muy dura y leñosa blanquecina comestible. Los episodios de floración han sido registrados entre noviembre y diciembre; la fructificación, entre diciembre y marzo.^{9, 11} Nombre común es nogal, tocte (Perú y Ecuador), cedro negro, cedro nogal, nogal bogotano (Colombia), nogal andino Bolivia.^{6, 7}

Juglans neotropica Diels “nogal peruano” es un árbol grande que en el Perú, se distribuye en los departamentos de: Amazonas, Cajamarca, Cusco, Huancavelica, Junín, La Libertad, Lambayeque y Pasco. El rango de distribución altitudinal oscila entre 500 y 3 300 msnm (ceja de selva, en zonas de bosque húmedo premontano y montano). Se observa en los bosques secundarios tardíos y en el bosque maduro.^{1, 2} (Anexo 2)



Figura 1. *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”

2.2.1.3. Hábitad y distribución geográfica

El cultivo de *Juglans neotropica* Diels “nogal” es una especie nativa de América del Sur, especialmente se encuentra en Ecuador, Colombia, Venezuela y Perú.¹

El género *Juglans*; comprende 15 especies nativas del Sureste de Europa, Asia y América del Norte y del Sur. Algunas especies de este género son: *Juglans regia* L., *Juglans nigra* L., *Juglans cinerea* L., *Juglans ailanthifolia* Carrière, y *Juglans neotropica* Diels (nogal Peruano).^{2, 3}

Se encuentra en Colombia Bolivia, Ecuador y Perú. En el Perú, en los departamentos de Ancash, La Libertad, Cajamarca, Cusco, Junín y Ayacucho, se desarrolla, entre los 2400 msnm a 3000 msnm, especialmente en la sierra centro – sur y sierra – sur. Es una especie de interés económico por su madera, con sus nueces se elaboran pasteles y principalmente las hojas se utilizan en la medicina tradicional.^{2, 3}

2.2.1.4. Composición química

Se ha identificado en las semillas, compuestos fenólicos: ácido gálico, ácido elágico, ácido cafeico y taninos. En las hojas, se identificaron nueve compuestos fenólicos: tres derivados del ácido hidroxicinámico y seis heterósidos flavonoides.²²

El fruto posee quinonas juglona y 1,4-naftaquinona, y en el epicarpio se ha detectado el compuesto currumicidín de estructura desconocida. En la corteza

del tallo se han identificado quinonas juglona y regiolona; triterpenos betulina y ácido betulínico; esterol, beta-sitosterol; alcaloide de isoquinolina berberina; el flavonoide catequina; y el compuesto fenólico ácido caféico. La corteza de la raíz contiene quinonas juglona, 3-3'-bis-juglona y ciclo-tri-juglona; y beta-sitosterol. En el polen se ha detectado el flavonoide 3-O-glucosil-galactósido-quercetina, y en la semilla el alcaloide indólico 5-hidroxi-triptamina.²⁴

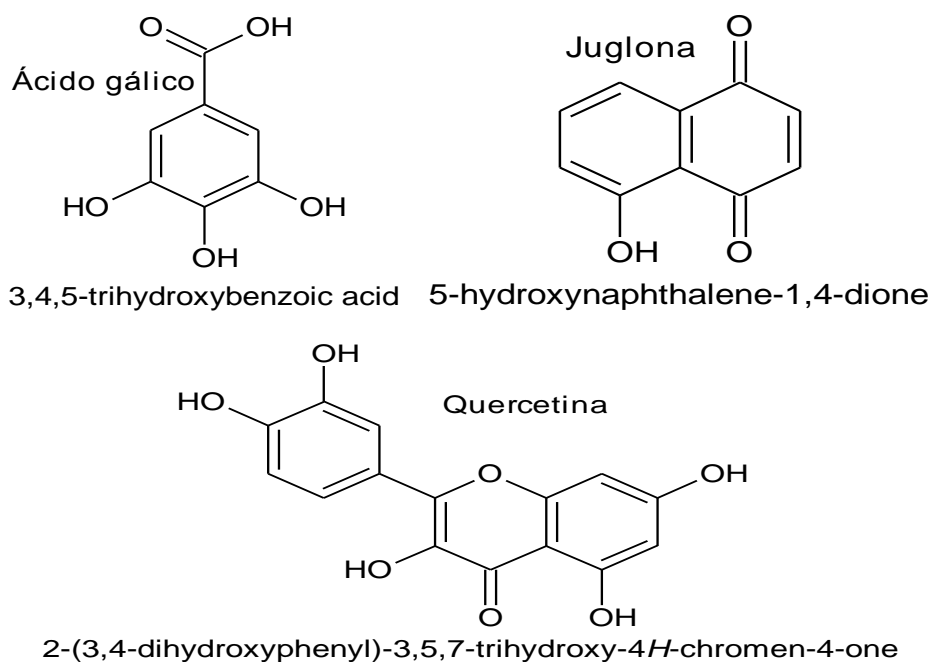


Figura 2. Estructuras químicas de algunos componentes de *Juglans neotropica* Diels. De: Gibaja Oviedo S. Pigmentos naturales quinónicos.²³

2.2.1.5. Usos tradicionales

Las hojas son consideradas fuente de compuestos saludables y han sido usadas ampliamente en la medicina tradicional para el tratamiento de dermatitis, insuficiencia venosa y úlceras; y posee propiedades antidiarreicas, antihelmínticas, antisépticas, antibacterianas, astringentes, antioxidantes, anti fúngicos, hipoglicémicas y antiproliferativas. Se ha reportado que las flores poseen propiedades antidepresivas, antihipóxicas, antihemolíticas y antiinflamatorias. Los frutos también poseen propiedades antioxidantes.^{4,5,24}

En Perú las hojas se utilizan como astringente, en heridas y lavados uterinos, con leche hervida para tratar la tos y en cataplasmas para las articulaciones inflamadas. El cocimiento del fruto fresco se utiliza en enjuagatorio para llagas y úlceras en la cavidad bucal. Las hojas, ramas tiernas y frutos verdes molidos se utilizan para pescar, por el efecto tóxico para peces.^{22,23}

2.2.1.6. Propiedades fitofarmacológicas

Posee propiedades antifúngicas, antibacterial (quitan la base de cultivo a las bacterias que han colonizado la piel o las mucosas), antisépticas, astringentes, hemostáticas, antidiarreicas, hipotensoras, hipoglucemiantes, tranquilizantes y antitumorales. Los principios activos más importante son los taninos gálicos y catéquicos, que le confieren una acción astringente antidiarreica; y los derivados naftoquinónicos, sobre todo la juglona (hidroxi-5-naftoquinona 1-4), que se obtiene por oxidación de la hidrojuglona con propiedades antisépticas, antifúngicas, antidermatósicas y queratinizantes.²

La bebida resultante del cocimiento de sus hojas es depurativa para la sangre y alivia las dolencias del hígado. Las hojas son también hipotensoras e hipoglucemiantes.²

En uso externo se utiliza en afecciones cutáneas (acné, eczema, impétigo, forúnculos, micosis cutáneas, etc.), ayuda a la cicatrización de las heridas, ya que forman puentes de hidrógeno con las fibras de colágeno de la piel. Sus propiedades farmacológicas externas son astringentes, vasoconstrictoras (para hemorragias) y cicatrizantes (quemaduras), úlceras, llagas. En infecciones vaginales, leucorreas. En casos de hiperhidrosis, caídas del cabello. En forma de gargarismo en infecciones de vías respiratorias, anginas, estomatitis.²

El extracto de pericarpio, se ha propuesto en cosmetología como estimulante del crecimiento de pelo y como antisarro en los dentífricos.^{2, 24}

Usos: Alimenticio, doméstico, ornamental e industrial.²

2.2.2. *Staphylococcus aureus*

Conocido como estafilococo áureo o estafilococo dorado, es una bacteria anaerobia facultativa, grampositiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se hallan colonizadas, aunque no infectadas, por ella.

Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de *Staphylococcus aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria³.

En la actualidad, este microorganismo se encuentra como el principal causante de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos, lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado o incluso con otro paciente.²⁴

2.2.2.1. Clasificación taxonómica

La identificación taxonómica se realizó según Rosenbach 1984 a cargo del Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich (Anexo N°3) responsable del Centro de Investigación de Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga:

Dominio : Bacteria
Filo : Firmicutes
Clase : Bacilli
Orden : Bacillales
Familia : Staphylococcaceae
Género : Staphylococcus
Especie : *Staphylococcus aureus*

2.2.2.2. Morfología

Staphylococcus aureus es un coco inmóvil, de 0,5 a 1 μm de diámetro,¹⁵ que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas. En extendidos de pus los cocos aparecen solos, en pares, en racimos o en cadenas cortas. Los racimos irregulares son característicos de extendidos tomados de cultivos que se desarrollan en medios sólidos, mientras que en otros cultivos son frecuentes las formas de diplococos y en cadenas cortas. Unas pocas cepas producen una cápsula o capa de baba que incrementa la virulencia del microorganismo. *Staphylococcus aureus* es un microorganismo grampositivo pero las células viejas y los microorganismos fagocitados se tiñen como gramnegativos.³

2.2.2.3. Hábitat

Se encuentra habitualmente a nivel de la nasofaringe y de zonas húmedas como pliegues inguinales y axilas. A nivel del vestíbulo nasal anterior la adherencia parece estar mediada por el contenido en ácidos teicoicos. Se estima que el índice de portación nasal en los adultos es de alrededor del 20-30 %. Expresado

longitudinalmente, cerca del 30 % de la población puede ser portador permanente, el 50 % portador intermitente y el 20 % no es colonizado. Algunas poblaciones pueden tener una tasa de colonización mayor como el personal de salud, los pacientes en hemodiálisis, diabéticos, adictos a drogas intravenosas, etc. A pesar que *Staphylococcus aureus* posee numerosos factores de virulencia, puede convivir con el huésped humano formando parte de su flora normal sin causar ningún daño.²⁵

2.2.2.4. Metabolismo

Staphylococcus aureus se desarrolla rápidamente en todos los medios, fermentan lentamente en carbohidratos, como el manitol, pero no produce gas. La actividad proteolítica varía mucho de una cepa a otra. *Staphylococcus aureus* produce pigmentos que varían desde un color blanco hasta un amarillo intenso.¹⁷ *Staphylococcus aureus* tiene un metabolismo anaerobio facultativo, con excepción de las subespecies *Staphylococcus aureus anaerobius* y *Staphylococcus aureus saccharolyticus* que crecen de forma anaerobia y a menudo son catalasa-negativas.²⁵

2.2.3. Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son macromoléculas, incluso mayores que las proteínas y así tienen una amplia posibilidad para transmitir información en la forma de agrupamiento de grupos químicos con una complejidad comparable a la disposición de los aminoácidos en las proteínas.²⁶ Los ácidos nucleicos se forman cuando los nucleótidos se unen entre sí por medio de puentes diéster entre átomos de C3 de un nucleótido y el C5. La secuencia lineal de los nucleótidos generalmente se expresa en dirección 5' a 3'.²⁷

2.2.3.1. Ácido desoxirribonucleico (ADN o DNA)

El ADN o ácido desoxirribonucleico es el componente químico primario de los cromosomas y el material del que los genes están formados, es el “almacén de la información” que cada individuo posee y que necesita para llevar a cabo todas sus funciones vitales.²⁷

La molécula de ADN está formada por dos largas cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una estructura en doble hélice. Las dos cadenas de nucleótidos que constituyen una molécula de ADN, se mantienen unidas entre sí por enlaces entre las bases nitrogenadas de ambas cadenas que quedan enfrentadas.²⁷

Los componentes del ADN (polímero) son los nucleótidos (monómeros); cada nucleótido está formado por un grupo de fosfato, una desoxirribosa y una base nitrogenada. Existen cuatro bases: dos purínicas denominadas adenina (A) y guanina (G) y dos pirimidínicas denominadas citosina (C) y timina (T). La estructura en doble hélice del ADN, con el apareamiento de bases limitado (adenina con timina y guanina con citosina), implica que el orden o secuencia de bases de una de las cadenas delimita automáticamente el orden de la otra, por eso se dice que las cadenas son complementarias.²⁸

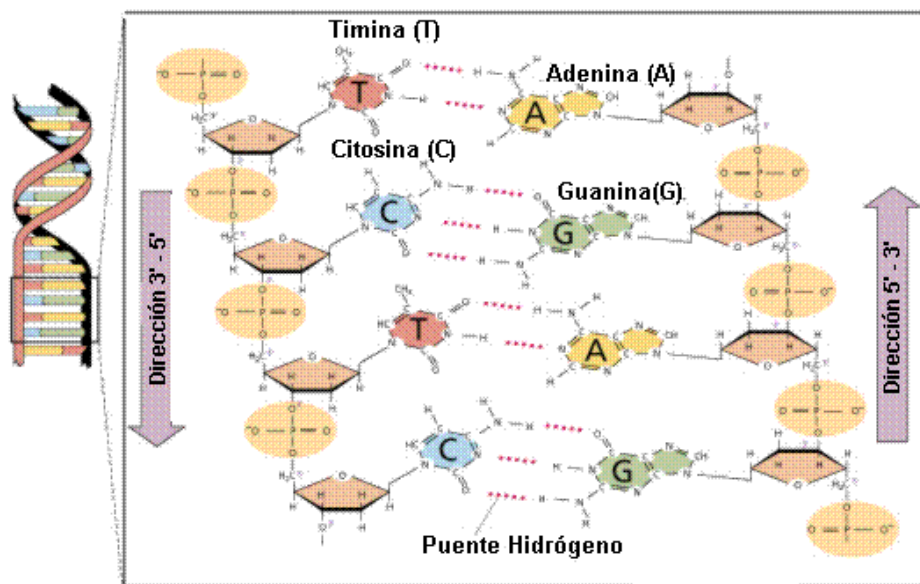


Figura 3. Estructura química de ADN

2.2.4. Electroforesis en gel

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas en una mezcla por aplicación de un campo eléctrico. Las moléculas disueltas se desplazan o migran en un campo eléctrico a una velocidad determinada por su relación carga: masa, si dos moléculas tienen masa y formas iguales, la de mayor carga neta se desplazará más rápido hacia un electrodo.⁸

Cuando se digiere una molécula de ADN con una enzima de restricción apropiada, se corta en fragmentos específicos. Estos fragmentos se pueden separar en función de su tamaño, por medio de una electroforesis en gel. Para ello, el ADN cortado se coloca en un gel de agarosa o poliacrilamida. Cuando pasa una corriente eléctrica a través del gel, cada fragmento se desplaza hacia abajo con una velocidad proporcional al logaritmo de su peso molecular. El desplazamiento produce una serie de bandas. Cada banda corresponde a un fragmento de tamaño definido, que es de menor cuando más abajo está en el gel. La longitud de cualquier fragmento concreto se puede determinar calibrando

el gel. Para ello, en otro carril del mismo gel se hace correr un control paralelo. El control es una mezcla de fragmentos patrón, que tiene tamaños conocidos y se llaman marcadores. La migración de los marcadores define la relación entre la longitud de fragmento y la distancia recorrida en el gel.⁸

La electroforesis en gel es un modo conveniente de cuantificar el ADN y analizar su estado físico al mismo tiempo, se puede visualizar si existen contaminantes que pueden estar presentes en la muestra de ADN o si está degradado. Es la aplicación de las técnicas de separación de macromoléculas en un campo eléctrico en función de su tamaño y carga eléctrica superficial, se define como el método de separación de sustancias cargadas al aplicar un campo eléctrico, de modo que se diferencian en el comportamiento en un campo eléctrico. Aquellas partículas cargadas positivamente (cationes) migraran hacia el cátodo y las cargadas negativamente (aniones) hacia el ánodo.⁷

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.⁸

Los ácidos nucleicos presentan carga y son solubles ya que tienen un grupo fosfato, parte que confiere la carga, y está presente de forma regular en la estructura. Los ácidos nucleicos tienen la capacidad de migrar en un campo eléctrico y por tanto, son susceptibles de ser separados por electroforesis. El gel se encuentra sumergido en un electrolito tamponado con tris-Borato (no glicina), para garantizar que los ácidos nucleicos estén cargados negativamente; por esto a la técnica se le denomina electroforesis de inmersión. Las moléculas migrarán hacia el polo positivo, de modo que viajarán en esa dirección por el gel, separándose por tamaño (número de nucleótidos), a la hora de cargar la muestra se colocan unos marcadores de frente o de corrida (6X loading dye) que nos permita detener la electroforesis en el momento que lo creamos oportuno. Para visualizar las bandas, hay que teñir el gel o marcar radiactivamente las

moléculas. El método más utilizado en geles de agarosa es el bromuro de etidio, el cual se comporta como un agente intercalante, de modo que además de disminuir la densidad de la molécula, tiene la capacidad de emitir luz cuando se le excita con luz ultravioleta. Hay que tener cuidado con este compuesto ya que es altamente cancerígeno.⁸

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.⁸

2.2.5. Toxicidad y genotoxicidad

2.2.5.1. Toxicidad

La toxicidad es la capacidad de una sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él. Tóxico es cualquier sustancia, artificial o natural, que posea toxicidad; es decir, cualquier sustancia que produzca un efecto dañino sobre los seres vivos al entrar en contacto con ellos.²⁹

2.2.5.2. Genotoxicidad

Es la capacidad relativa para causar daño al material genético por agentes físicos, químicos o biológicos. El daño en el material genético incluye no sólo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula. Ejemplos de esto último son las proteínas que intervienen en la reparación, condensación y descondensación del ADN en los cromosomas u otras estructuras como el huso mitótico, responsable de la distribución de los cromosomas durante la división celular. Este daño puede ser de tipo mutágenos o carcinógeno.^{30,31}

Las pruebas de genotoxicidad se puede definir como pruebas *in vitro* e *in vivo*, diseñadas para detectar compuestos que induzcan daño genético, directa o indirectamente, por diversos mecanismos; son necesarios antes de que se produzca la exposición en el ser humano.³²

Los agentes capaces de ocasionar toxicidad genética son llamados genotóxicos o xenobióticos y se clasifican en tres categorías de acuerdo a su origen:

químicos, físicos y biológicos. La primera categoría está constituida por los compuestos químicos, la segunda incluye las radiaciones en todo su espectro y la última en algunos parásitos, bacterias, hongos, vegetales o incluso virus (aunque estos últimos no son considerados seres vivos, por lo que muchas veces aparecen clasificados en una categoría aparte). La acción o capacidad de inducir daño de estos xenobióticos está influida por la dosis recibida y el tiempo o vía de exposición, junto a la constitución genética del individuo que puede definir una susceptibilidad propia o particular.³³

2.2.5.3. Mecanismo de genotoxicidad

Las sustancias genotóxicas pueden unirse directamente al ADN o actuar indirectamente mediante la afectación de las enzimas involucradas en la replicación del ADN y causando en consecuencia mutaciones que pueden o no desembocar en un proceso canceroso.³¹

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

Los genotóxicos pueden provocar mutaciones por cambios en algunos nucleótidos debidos a:³⁴

- Sustituciones en las bases: purinas por otras purinas, pirimidinas por otras pirimidinas o purinas por pirimidinas o viceversa.³⁵
- Sustitución de una base por una sustancia análoga originando un nucleótido inútil para la duplicación.
- Alteración química de las bases mediante oxidación, desaminación.
- Alquilación de la molécula del ADN incorporando grupos químicos a las bases, mediante enlaces covalentes, formando lo que se conocen como aductos.^{35,36}
- Desfases que consisten en la adición o delección de bases, modificando la pauta de lectura.

También, pueden provocar aberraciones cromosómicas como:

- Lesiones cromosómicas por rotura, delección, intercambio o reorganización del material cromosómico y translocaciones.
- Cambio en el número de cromosomas.³⁶

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

- Impedimento de la replicación produciendo la muerte por apoptosis.

- Replicación con nucleótidos alterados, o con errores en la replicación del ADN, es decir, se trasmite una mutación. Esta mutación puede ocurrir en una célula somática dando por ejemplo un proceso canceroso o malformaciones congénitas en el recién nacido; o en una célula germinal produciendo una enfermedad hereditaria o generando en el individuo una mayor susceptibilidad de contraer determinadas enfermedades.³⁵
- Reparación del daño en la molécula de ADN evitándose la mutación.³⁷

En cuanto a los carcinógenos genotóxicos, actúan como iniciadores del proceso de carcinogénesis. Esta comienza con una mutación en una sola célula pudiendo ser a nivel del metabolismo del xenobiótico, haciendo que una sustancia procancerígena se convierta en cancerígena; en la reparación del ADN dificultándola o impidiéndola y/o estimulando la proliferación celular.³⁰ Este proceso se conoce como iniciación.³⁷

Suelen ser sustancias químicas, como compuestos alquilantes (mostazas nitrogenadas), especies reactivas de oxígeno, aflatoxinas, productos de combustión, nitrosaminas, etc.³⁸ Su mecanismo de acción está basado en la formación de enlaces covalentes con el nitrógeno 7 de la guanina (aducto), produciéndose una mutación irreversible. Algunas características de ellos son:

- Activos a todas las dosis, no hay una dosis mínima umbral a partir de la cual se aprecie un efecto.
- Presentan una correlación estructura, actividad, pudiéndose detectar mediante ensayos experimentales.
- La mayoría se clasifican como procarcinógenos, es decir, requieren una biotransformación para reaccionar con el ADN, la cual se puede producir tanto en la Fase I como en la Fase II del metabolismo. Aquí podemos encontrar hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas, micotoxinas, etc.³⁹

2.2.5.4. Evaluación genotóxica

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

(incrementando la sensibilidad a los efectos de muchos mutágenos), a los eventos de recombinación mitótica.³²

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.³³

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.³⁴

Si los resultados *in vitro* son negativos, debe continuarse, en segunda instancia, con ensayos *in vivo* que respondan a los mismos niveles de daño genético que se evaluaron *in vitro*. Una vez evaluados los niveles génico y cromosómico, con ensayos *in vitro* e *in vivo*, se deben incluir ensayos que midan daño primario al ADN y de acuerdo con el resultado obtenido, se debe tomar la decisión de realizar ensayos que midan otras alteraciones y carcinogenicidad. En cualquiera de los ensayos y niveles de daño evaluados se deben emplear protocolos estandarizados (validados internacionalmente) que tomen en consideración las dosis, el tipo de exposición y la vía de administración propuesta para el fármaco.³³

Con el fin de detectar en sus etapas iniciales la acción sobre el material genético se utilizan las siguientes determinaciones *in vitro* que son muy utilizadas en el campo de la investigación científica para detectar genotoxicidad inicial: aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas; micronúcleos, síntesis de ADN no programada y electroforesis de una célula (ensayo del cometa).³³

2.2.6. Ensayo cometa (EC)

Es un biomarcador rápido, simple, visual y sensible, conocido como electroforesis unicelular alcalina, que se utiliza para medir y analizar rupturas en el ADN. Detecta diferencias intracelulares y daño en los procesos de reparación de virtualmente todas las células. La capacidad de migración del ADN depende de la cantidad de rompimientos producidos por el agente en cuestión de esta manera cada célula lesionada tiene la apariencia de un cometa con una cabeza y una cola brillante y fluorescente; las células que no han sido dañadas aparecen con núcleos intactos, sin cola.⁴⁰

Existen muchas versiones del ensayo cometa que se aplican constantemente en diferentes laboratorios a nivel mundial; la metodología general y estándar fue descrita por Ostling y Johanson en 1984 y luego reformada por Singh *et al.* en 1988; sin embargo, actualmente, se han dado a conocer distintas modificaciones a la técnica dependiendo de los intereses de estudio de algunos grupos de investigación.⁴⁰

2.2.6.1. Ventajas del Ensayo Cometa

El ensayo cometa o electroforesis de una sola célula provee ciertas ventajas ante otras pruebas que evalúan el daño genotóxico por efecto. En este test los datos son colectados a nivel de células individuales, proveyendo información de la distribución intercelular del daño y de la reparación. Así mismo se requiere sólo pequeños números de células para ser llevado a cabo y virtualmente cualquier población de células eucariotas puede ser utilizada en el proceso.³⁶ Por medio de este ensayo es posible evaluar el daño en células no proliferativas, lo que representa también un gran beneficio sobre otras técnicas que si lo requieren.⁴¹

En la electroforesis de una sola célula además se ha reportado mayor sensibilidad de detección de daño con respecto a otras pruebas de citogenética clásica. Estudios comparativos en donde se evalúan los efectos genotóxicos de la radiación por rayos X en linfocitos humanos, establecen que el daño se incrementa con las dosis de radiación proporcionadas a la muestra tanto en el test de micronúcleos como en el ensayo cometa, sin embargo, la sensibilidad del ensayo cometa es significativamente superior, puesto que el daño es detectado incluso a bajas exposiciones. El ensayo del cometa alcalino es considerado también en otros estudios comparativos de carácter farmacéutico para la evaluación de nuevas drogas, junto con la prueba de aberraciones cromosómicas, mostrando un alto grado de valor predictivo.⁴²

A nivel general este test de genotoxicidad es bastante flexible permitiendo la detección de un amplio rango de daños que pueden ocasionarse en el ADN y consta de un proceso sencillo y de rápida ejecución, por lo que es posible la obtención de resultados el mismo día en que se ha tomado la muestra y se ha realizado el protocolo.⁴²

2.2.6.2. Desventajas del Ensayo Cometa

A pesar de que la técnica ha sido ampliamente empleada y aceptada a nivel mundial, existen algunas desventajas en su proceso de evaluación. La primera de ellas hace referencia al estricto manejo y preparación de los reactivos y el número de variables que pueden afectar un óptimo desarrollo, pues cualquier alteración en la concentración de la agarosa, el estado de las distintas soluciones de trabajo, el pH, la temperatura y los tiempos de cada paso, pueden cambiar drásticamente el resultado a analizar debido a la alta sensibilidad de la técnica. La segunda desventaja y la más nombrada, hace referencia a la falta de estandarización en el análisis de las muestras y la representación de los datos que se obtienen en los estudios, ya que, aunque muchos investigadores abarcan el tema, proponen constantemente nuevas formas de valoración, sin definir un único proceso de evaluación que permita la comparación entre laboratorios.⁴³

2.2.6.3. Aplicaciones

El ensayo cometa es una de las técnicas más empleadas en la actualidad dentro del área de la genética toxicológica. Por su método económico, rápido y efectivo, es empleado en el estudio de seguimiento a exposiciones medio ambientales y ocupacionales de poblaciones humanas. En las disciplinas medioambientales, por ejemplo, se han realizado estudios del impacto de genotóxicos en medios acuáticos usando como modelo biológico distintas especies de peces. Así mismo en el área clínica, se han adelantado estudios de farmacovigilancia de distintas drogas de genotoxicidad de productos químicos de los que hacen parte incluso el empleo de determinados tipos de resina en la salud oral;⁴⁰ y estudios sobre mutágenos de línea germinal.⁴⁴

2.2.7. Evaluación de la genotoxicidad *in vitro*: Método Tomasevich

Miranda²⁰, formuló un método para determinar el efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales y/o productos fitoterapéuticos frente a ADN genómico. Es necesario conocer ¿qué órgano de la planta?: tallos, flores, hojas, frutos y/o semillas son usadas para preparar los remedios caseros y obtener el extracto de la misma, que puede ser acuoso, hidroalcohólico o con otro solvente orgánico; si se va estudiar el látex, se recomienda obtenerla directamente de la planta.

Se preparan soluciones del extracto a diferentes concentraciones: 1 mg/mL, 2,5 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL; en caso del látex preparar diluciones a concentraciones de 1 %, 2,5 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 % y 100 %. Por otro lado, obtener ADN genómico del organismo en estudio: humano, animal o microbiano, mediante extracción orgánica o kit comercial, procurando que el ADN sea íntegro físicamente, no fragmentado; seguidamente preparar un stock de 200 μ L a concentración de 1,500 ng/ μ L.

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

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Farmacognosia de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud, 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.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Juglans neotropica Diels “nogal”, que crece en los diferentes pisos ecológicos de la ciudad de Ayacucho, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, región Ayacucho.

3.2.2. Muestra

5 Kg de hojas frescas y sanas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”.

3.2.3. Muestreo

Muestreo aleatorio simple de planta de *Juglans neotropica* Diels “nogal”.²⁶

3.3. Unidad experimental

ADN genómico humano (Banco de Sangre Hospital Regional de Ayacucho).

ADN genómico de *Staphylococcus aureus* (Anexo 3).

3.4. Metodología y recolección de datos

3.4.1. Recolección e identificación de la muestra

Las muestras fueron recolectadas en la Ciudad de Ayacucho, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, región 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 del extracto hidroalcohólico. Para la identificación taxonómica se emplearon muestras con flores, frutos y hojas que corresponde a la 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).

3.4.2. Preparación del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal”

Los 100 g de muestra seca y pulverizada de la planta medicinal en estudio, se maceró en un frasco de vidrio color ámbar por siete días, para ello se utilizó 1 L de solución de alcohol: agua (3:1), se utilizó etanol 96°, luego se cubrió 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.

3.4.3. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal”

Se realizó una marcha fitoquímica cualitativa al extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, para determinar la presencia de los diferentes metabolitos secundarios, que se fundamentan en los cambios estructurales ocasionados en los metabolitos presentes, como aparición o desaparición de una coloración, formación o dilución de un precipitado o desprendimiento de gas. Las reacciones de identificación, se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Lock⁴⁵ y Miranda.⁴⁶

3.4.4. Obtención de ADN genómico humano

Se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática, contando con seis unidades de bolsa colectora de sangre “cuádruple” fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos (para el desecho); las mismas que se consiguieron en donación del Banco de Sangre del Hospital Regional de Ayacucho “Miguel Ángel Mariscal Llerena”, para la obtención del ADN de linfocitos con el siguiente protocolo descrito en Miranda.¹⁸

1. Se transfirió 2 mL de sangre (paquete globular) a un tubo de centrifuga con tapa rosca y adicionó 8 mL del tampón Tris- Hcl 50 mM (pH 7,7) precalentado a 37°C.
2. Se homogenizó e incubó a 37°C por 30 minutos, se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos para sedimentar los linfocitos.
3. Se descartó el sobrenadante aspirándolo con una pipeta Pasteur dejando el botón celular del centrifugado en la parte inferior del tubo.
4. Se repitió los procedimientos 2 y 3 (esta vez con 9 mL de tampón Tris – Hcl 50 mM (pH 7,7), hasta tener un preparado claro.
5. Se Adicionó al botón celular, 9 mL de solución salina (NaCl al 0,85 %) se homogenizó y centrifugó a 2500 rpm/ 10 minutos.
6. Se aspiró y descartó el sobrenadante dejando solo el sedimento (botón celular), se resuspendió el sedimento en 400ul de la solución HIGH TE (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 100 mM). y transfirió a un tubo de microcentrífuga de 2 mL.
7. Se adicionó 400uL de solución de lisis (Tris-Hcl 10 mM, pH 8,0; EDTA 40 mM; SDS al 1%; NaCl 10 mM).precalentada a 50°C.
8. Se adicionó 10 µL de la solución de proteinasa K (20 mg/mL) e incubó por una hora y media a 53°C.
Se adicionó 750 uL de la solución cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), luego se homogenizó por inversión delicadamente durante 10 minutos.
9. Se centrifugó en la microcentrífuga por 10 minutos a 14 000 para separar las fases, luego se aspiró la fase superior acuosa que contiene el DNA y transferirla a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2 mL.
10. Se adicionó a la fase acuosa 750 uL de la solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se homogenizó por inversión durante 5 minutos. Se centrifugó en la microcentrífuga por 10 minutos a 14 000 rpm; luego se aspiró la fase acuosa que contiene el ADN y transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2 mL.
11. Se repitió el procedimiento 11 hasta obtener una fase acuosa completamente clara.
12. Se agregó la solución de acetato de sodio 3M, pH 5,2. en cantidad igual a 1/10 del volumen de la fase acuosa.
13. Se adicionó un volumen de alcohol isopropílico helado y dejamos en reposo por una noche en refrigeración. Luego centrifugamos en la microcentrífuga por 15 minutos a 14 000 rpm.

14. Eliminamos cuidadosamente el sobrenadante y enjuagamos el sedimento con 1 mL de etanol al 70%.
15. Se centrifugó en la microcentrífuga por 10 minutos, eliminar el alcohol y dejamos secar el sedimento a medio ambiente.
16. Se resuspendió el sedimento con 400 µL de la solución low TE (Tris HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM y se guardó en la nevera.

3.4.5. Cultivo de *Staphylococcus aureus* y extracción de ADN genómico

Se realizó la reactivación de la cepa, cultivando *Staphylococcus aureus* en caldo Mueller Hinton e incubando a 37°C durante 24 horas; luego, a partir de este cultivo, se sembró en Agar Mueller Hinton e incubó a 37°C durante 24 horas, con la finalidad de obtener una masa celular bacteriana y extraer el ADN genómico con el siguiente protocolo:

1. Se colocó 400 µL de buffer TE 1X a un tubo eppendorf de 2 mL y en ella se transfirió con un asa de kolle aproximadamente 100 mg de masa celular del cultivo joven de *Staphylococcus aureus*, luego se procedió a la inactivación de las bacterias a 85°C por 25 minutos.
2. Se añadió 60 µL de Lisozima (10 mg/mL) y se incubo a 37°C por 2 horas en baño María.
3. Luego se añadió SDS/proteinasa K (75 µL SDS 10 % + 5 µL PK 10 mg/mL) y se incubó a 65°C por 15 minutos.
4. Se aumentó 100 µL NaCl 5M más 5 µL de CTAB (N-cetil-N,N,N-Trimetil bromuro de amonio) y se encubó a 65°C por 15 minutos.
5. Se agregó 750 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó agitando suavemente con la mano durante cinco minutos y se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos.
6. Luego de la formación de dos capas en el tubo eppendorf, se trasvasó cuidadosamente el sobrenadante a otro tubo eppendorf.
7. Se agregó 600 µL isopropanol helado al 100%, luego se dejó el tubo en la nevera a 0°C durante una noche.
8. Se centrifugó el tubo a 14 000 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante.
9. Se añadió 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos.
10. Se descartó el sobrenadante y se rehidrató el sedimento con 50 µL de agua bidestilada estéril.

11. Se agregó 1 μL ARNasa de 20 mg/ μL y se incubó a 37°C durante una hora.
12. Luego se guardó a – 20°C hasta su posterior estudio.

3.4.6. Cuantificación de ADN genómico humano y de *Staphylococcus aureus*:

3.4.6.1. Por espectrofotometría.

Procedimiento:

1. Se homogenizó lentamente las muestras de ADN, por diez veces, con la ayuda de una micropipeta de 100 μL .
2. Se preparó el espectrofotómetro UV marca Eppendorf Bio Photometer plus, con la opción de cuantificar el ADN.
3. Para limpiar la superficie del adaptador donde se coloca la muestra, se depositó 10 μL de agua bidestilada estéril, luego de un minuto, se retiró el agua utilizando papel “tissue”, para mejor limpieza se repitió este paso.
4. Nuevamente se depositó 10 μL de agua bidestilada estéril sobre la superficie del adaptador, se colocó la tapa de factor 50 – Lp 0,2 mm y se presionó la opción BLANK (blanco) para calibrar y obtener “cero de absorbancia” (0.000 A°).
5. Se retiró el agua utilizando papel “tissue”, luego se depositó 5 μL de la muestra de ADN, se colocó la tapa de factor 50 – Lp 0,2 mm y presionó la opción SAMPLE para ver el resultado de la cuantificación y pureza de ADN en la pantalla del equipo; luego se retiró la muestra con papel “tissue”.
6. Se repitió los pasos 4 y 5 para la cuantificación de cada muestra de ADN.
7. Terminada la cuantificación de ADN, se depositó 10 μL de agua bidestilada estéril, sobre la superficie del adaptador, luego de un minuto, se secó con papel “tissue” y se apagó el equipo.

3.4.6.2. Por electroforesis

El ADN obtenido, fue visualizado en el gel de agarosa y corrido por electroforesis, realizando los siguientes pasos:

1. Para cada una de las muestras de ADN, se procedió a preparar volúmenes de carga para electroforesis (gel de agarosa al 1%) según la siguiente tabla.

Tabla 2. Preparación de carga de ADN para visualización de banda en electroforesis².

Nº de carril en gel de agarosa	ADN stock (μL)	Buffer Loading 6X (μL)	Volumen de agua PCR (μL)	Volumen final de carga (μL)
1	4	1	7	12

2. Se cargó todo el contenido de las mezclas a cada uno de los pocillos del gel de agarosa al 1.0%, en su respectivo carril por cada muestra de ADN.
3. Luego se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se dejó correr a 40 voltios por 40 minutos.
4. Se sumergió el gel de agarosa, en una fuente que contenía bromuro de etidio al 1%, durante veinte minutos y se realizó un enjuague suave 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.²

3.4.7. Ensayos de la genotoxicidad *in vitro*:

Se desarrolló siguiendo el “método Tomasevich” propuesto por Miranda²⁰; con las siguientes fases:

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

El ADN genómico humano y de *Staphylococcus aureus*, obtenidos, se cuantificaron respectivamente por espectrofotometría UV marca Eppendorf BioPhotometer plus; luego se preparó un stock de cada ADN, a concentración de 1 500 ng/μL en volumen final de 200 μL, para cada ensayo en la investigación.

3.4.7.2. Fase de ensayo genotoxicidad *in vitro* extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, sobre el ADN genómico humano y de *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

A partir del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, se procedió a preparar las soluciones a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente; utilizando agua bidestilada estéril como solvente.

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

Tabla 3. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad *in vitro* de extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, sobre ADN genómico humano y de *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

Condiciones	Mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>							
	1	2	3	4	5	6 B	7 C	8 C/PK
Nº de tubo	1	2	3	4	5	6 B	7 C	8 C/PK
Stock de ADN en estudio (1 500 ng/µL)	14	14	14	14	14	-	20	14
Volumen en µL								
Extracto hidroalcohólico de “nogal” (mg/mL)	5	10	25	50	100	100	-	100
(µL)	6	6	6	6	6	20	-	6
Proteinasa K	-	-	-	-	-	-	-	6
Volumen total (µL)	20	20	20	20	20	20	20	26
Incubación en baño María a 37 °C	1 hora							

3.4.7.3. Fase de electroforesis

Se preparó el gel de agarosa a 1 % y se colocó en una cámara de electroforesis Biometra®. Para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa, se utilizó las cantidades descritas en la siguiente tabla:

Tabla 4. Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN genómico humano y de *Staphylococcus aureus*, respectivamente, con el extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, para el ensayo de genotoxicidad *in vitro*.

Condiciones	Volúmenes de carga para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nº carril del gel	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Muestra (mg/mL)	Marcador molecular	5	10	25	50	100	B	C	C/PK
(µL)		3	8	8	8	8	8	8	8
Loading (µL)		2	2	2	2	2	2	2	2
Volumen total (µL)		5	10	10	10	10	10	10	10

Luego se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se programó a 30 voltios (V) para tres horas de corrida.

3.4.7.4. Fase de lectura por radiación UV

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

Adicionalmente se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; en ambos casos para visualizar las bandas de ADN a diferentes concentraciones.

3.4.7.5. 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 Collins⁴¹. (Anexo 8)

Tabla 5. Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.

Valor numérico (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: Collins⁴¹.

3.5. Tipo de investigación

Experimental.¹ Porque éste estudio reúne los dos requisitos para lograr el control y la validez interna: a) grupos de comparación (manipulación de la variable independiente), y b) equivalencia de los grupos.⁴⁷

3.5.1. Diseño de investigación

La investigación que realizamos fue un diseño con posprueba únicamente y grupo de control, que incluye dos grupos: uno recibe el tratamiento experimental y el otro no (grupo de control). Es decir, la manipulación de la variable independiente alcanza solo dos niveles: presencia y ausencia. Cuando concluye la manipulación a ambos grupos se les administra una medición sobre la variable dependiente en estudio.⁴⁷

Tabla 6. Diseño de investigación con pos prueba únicamente y grupo de control.

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

Se realizaron cuatro repeticiones de cada ensayo.

3.6. Análisis de datos estadísticos

Los datos son 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 Kruskal-Wallis para medir el porcentaje de fragmentación de más de dos muestras independientes, es decir concentraciones del extracto en estudio. El valor de $p \leq 0,05$, se consideró como el nivel estadísticamente significativo Hernández.⁴⁷

Para lo cual se planteó la siguiente hipótesis.⁴⁷

H_0 = El extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, no presenta efecto genotóxico.

H_1 = El extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, al menos una concentración, sí presenta efecto genotóxico.

IV. RESULTADOS

Tabla 7. Metabolitos secundarios analizados en el extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal”. Ayacucho 2018.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Observaciones	Resultados
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado de color anaranjado.	+
	Mayer	Precipitado de color blanco.	+
Flavonoides	Shinoda	Presenta una coloración de color naranja-amarillo.	++++
Compuestos fenólicos	Cloruro Férrico	Precipitación azul negruzca intenso.	++++
Cumarinas y lactonas	Baljet	Coloración roja	-
Saponinas	Producción de espuma	No hay formación de espuma.	-
Cardenólidos	Kedde	Hay coloración rojo violeta.	++

Leyenda:

++++ : Muy abundante

+++ : Abundante

++ : Regular

+ : Escaso

- : Ausencia

Fuente: Loock⁴⁵ y Miranda⁴⁶

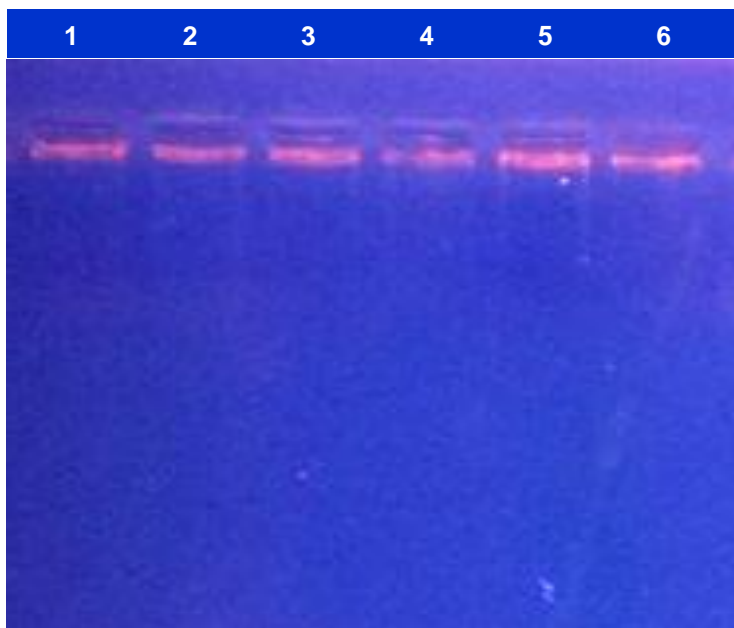


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico humano (carriles 1, 2 y 3), y de *Staphylococcus aureus* obtenido de tres cultivos (carriles 4, 5 y 6) y coloreado con bromuro de etidio. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018.

Leyenda:

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

Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante una hora.

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

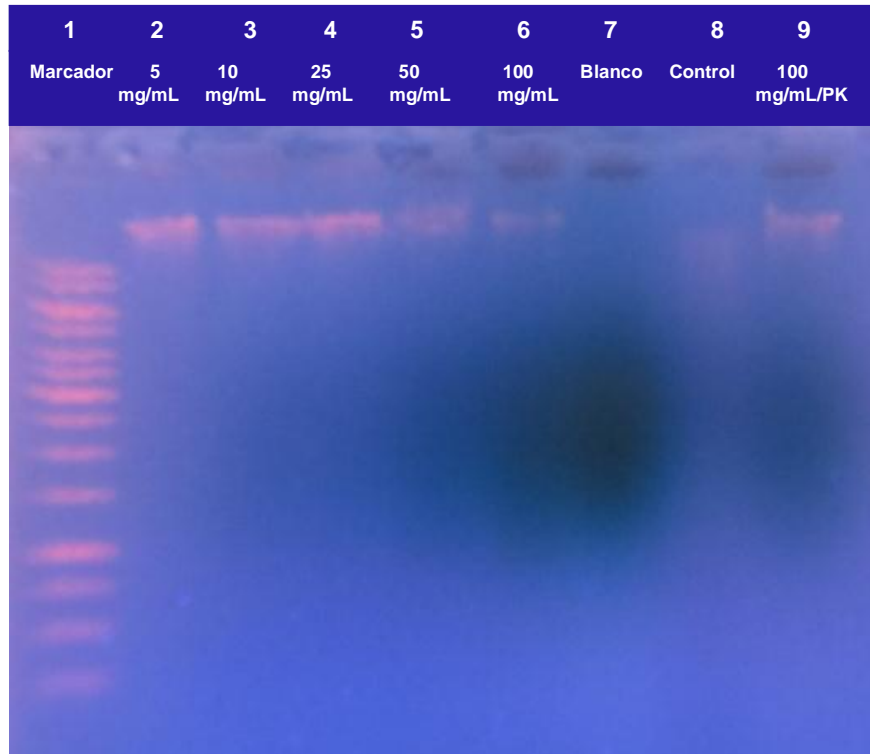


Figura 5. Primer ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, frente a ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.- UNSCH. Ayacucho 2018.

Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de tamaño molecular

Carril Nº 2: Con 5 mg/mL

Carril Nº 3: Con 10 mg/mL

Carril Nº 4: Con 25 mg/mL

Carril Nº 5: Con 50 mg/mL

Carril Nº 6: Con 100 mg/mL

Carril Nº 7: Con 100 mg/mL de extracto (blanco)

Carril Nº 8: Con ADN puro (control).

Carril Nº 9: Con 100 mg/mL de extracto + proteinasa K.

Volumen de carga: Muestra (8 µL) + loading (1 µL) + agua PCR (1 µL) = 10 µL.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante 3 horas.

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

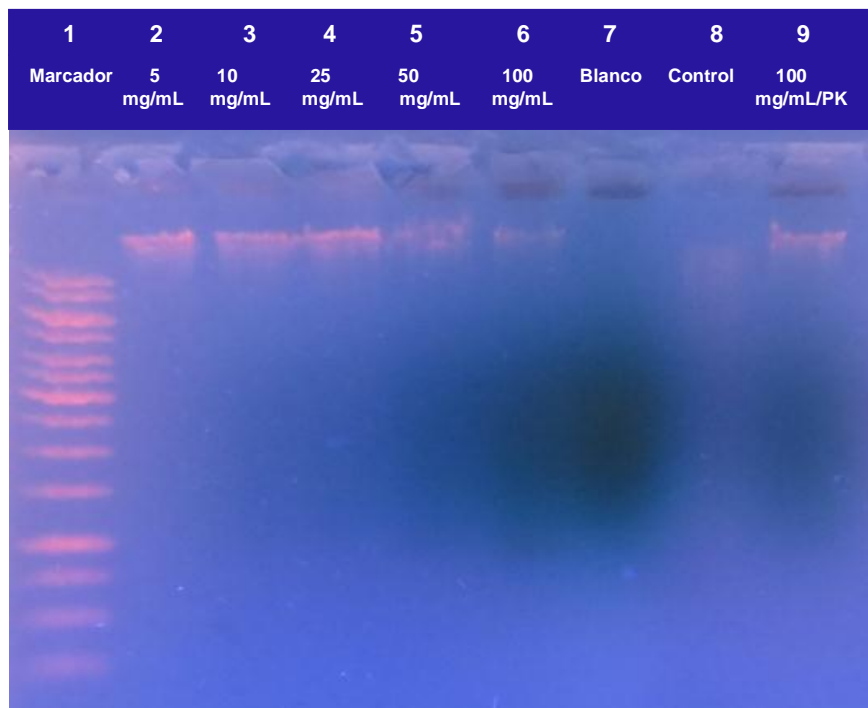


Figura 6. Segundo ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, frente a ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018.

Leyenda:

Carril N° 1: Marcador de tamaño molecular

Carril N° 2: Con 5 mg/mL

Carril N° 3: Con 10 mg/mL

Carril N° 4: Con 25 mg/mL

Carril N° 5: Con 50 mg/mL

Carril N° 6: Con 100 mg/mL

Carril N° 7: Con 100 mg/mL de extracto (blanco)

Carril N° 8: Con ADN puro (control).

Carril N° 9: Con 100 mg/mL de extracto + proteinasa K.

Volumen de carga: Muestra (8 µL) + loading (1 µL) + agua PCR (1 µL) = 10 µL.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante 3 horas.

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

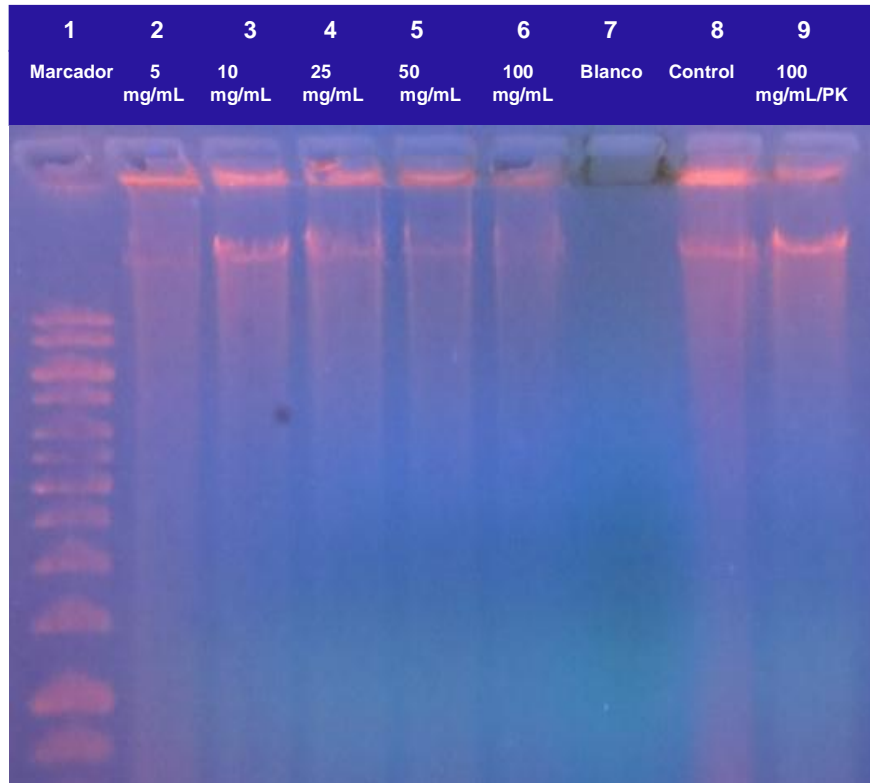


Figura 7. Primer ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, frente a ADN genómico de *Staphylococcus aureus* incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018.

Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de tamaño molecular

Carril Nº 2: Con 5 mg/mL

Carril Nº 3: Con 10 mg/mL

Carril Nº 4: Con 25 mg/mL

Carril Nº 5: Con 50 mg/mL

Carril Nº 6: Con 100 mg/mL

Carril Nº 7: Con 100 mg/mL de extracto (blanco)

Carril Nº 8: Con ADN puro (control).

Carril Nº 9: Con 100 mg/mL de extracto + proteinasa K.

Volumen de carga: Muestra (8 µL) + loading (1 µL) + agua PCR (1 µL) = 10 µL.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante 3 horas.

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

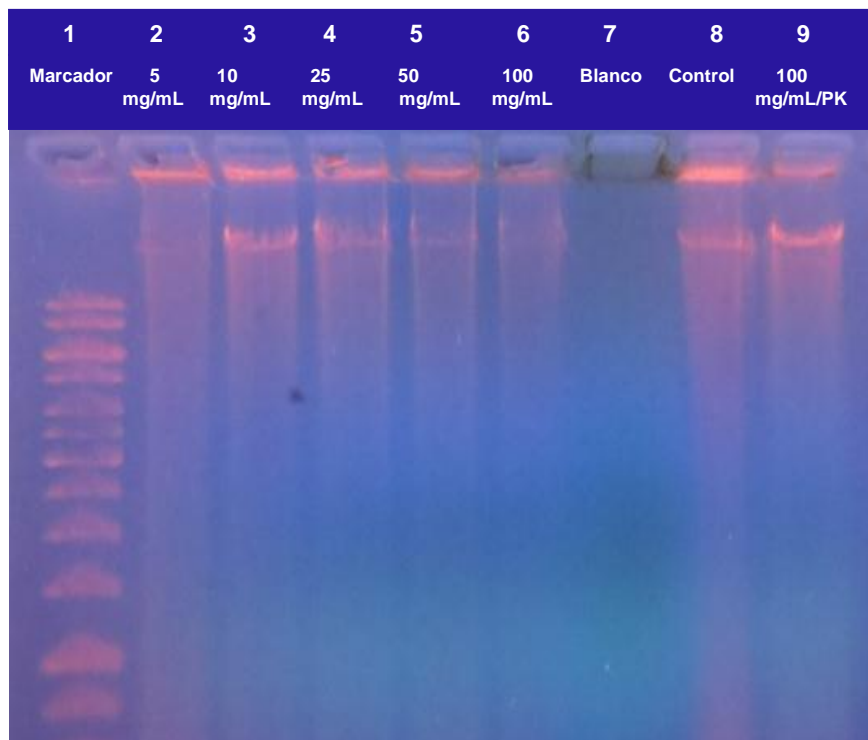


Figura 8. Segundo ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, frente a ADN genómico de *Staphylococcus aureus* incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018.

Leyenda:

Carril N° 1: Marcador de tamaño molecular

Carril N° 2: Con 5 mg/mL

Carril N° 3: Con 10 mg/mL

Carril N° 4: Con 25 mg/mL

Carril N° 5: Con 50 mg/mL

Carril N° 6: Con 100 mg/mL

Carril N° 7: Con 100 mg/mL de extracto (blanco)

Carril N° 8: Con ADN puro (control).

Carril N° 9: Con 100 mg/mL de extracto + proteinasa K.

Volumen de carga: Muestra (8 µL) + loading (1 µL) + agua PCR (1 µL) = 10 µL.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante 3 horas.

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

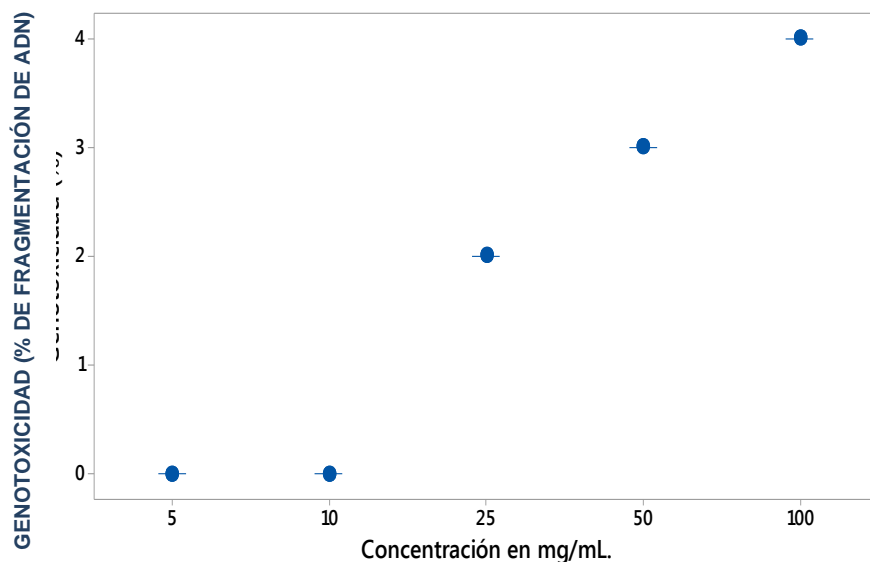
Tabla 8. Valores numéricos de cuatro ensayos de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, frente a ADN genómico humano y de *Staphylococcus aureus*, incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018.

Genotoxicidad: Porcentaje de fragmentación de ADN	<i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” Extracto hidroalcohólico Concentración en mg/mL.				
	5	10	25	50	100
	Valores numéricos de cuatro ensayos	0	0	2	3

Leyenda:.

Valor numérico	Genotoxicidad en porcentaje de fragmentación de ADN
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: Collins⁴¹ .



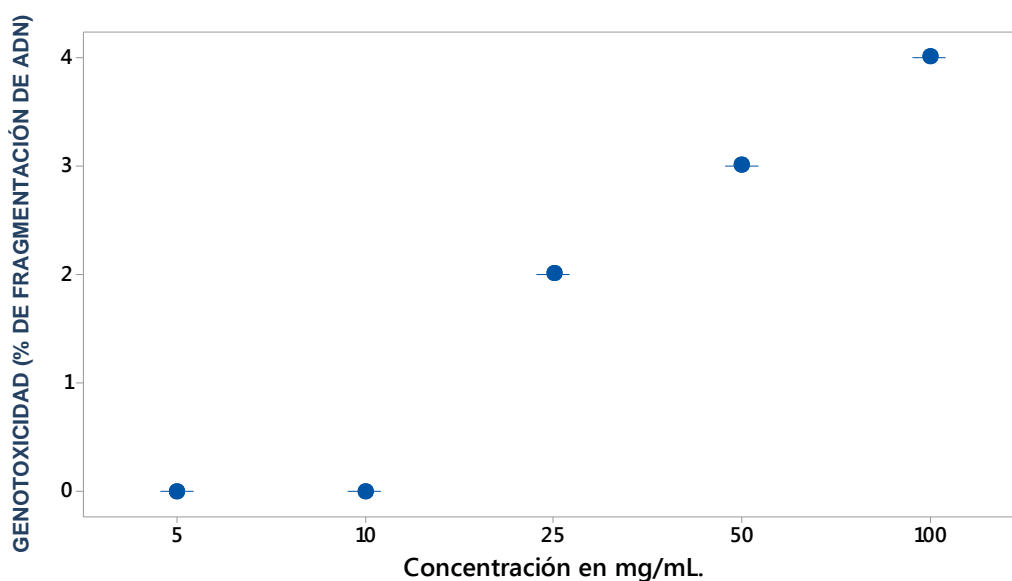
del extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal"

Figura 9. Genotoxicidad en porcentaje de fragmentación de ADN, según la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal", frente a ADN genómico humano. Prueba de Kruskal-Wallis ($H=19$, $GL=4$, $p=0,001$). Ayacucho 2018.

Leyenda:

Valor numérico	Genotoxicidad en porcentaje de fragmentación de ADN
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: Collins⁴¹.



del extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal"

Figura 10. Genotoxicidad en porcentaje de fragmentación de ADN, según la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal", frente a ADN genómico de *Staphylococcus aureus*. Prueba de Kruskal-Wallis ($H=19$, $GL=4$, $p=0,001$). Ayacucho 2018.

Leyenda:

Valor numérico	Genotoxicidad en porcentaje de fragmentación de ADN
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: Collins⁴¹.

V. DISCUSIÓN

El trabajo de investigación que se ha realizado conduce a interpretar los resultados de los diferentes ensayos, con el propósito determinar el efecto genotóxico “*in vitro*” del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal”.

La tabla 7, es el resultado de la identificación fitoquímica de los metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, reportando la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos en cantidad muy abundante; cardenólidos en cantidad regular y alcaloides en escasa cantidad.

Al respecto, Quiros R, 2013¹³ evaluó la actividad cicatrizante de un gel elaborado a base de los extractos de “nogal” (*Juglans neotrópica* Diels), “ortiga” (*Urtica dioica* L), “sábila” (*Aloe vera*) con heridas inducidas en el dorso de los ratones (*Mus musculus*). Demostró que el gel posee actividad cicatrizante en heridas cutáneas, debido a la presencia de taninos de nogal, flavonoides de ortiga, y mucílagos de sábila, que al combinarse presentan sinergia.

Mientras que, Hurtado P¹. Jurado B¹. 2015¹⁴ evaluaron la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico estandarizado de las hojas de *Juglans neotropica* Diels. En tamizaje fitoquímico reportaron mayor concentración de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante se presentó a 25 y 35 µg/ mL, respectivamente, con un IC 50 de 12,82 µg/mL.

Así mismo, Hurtado P, 2014¹⁶ demostró que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels, posee carbohidratos, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, antraquinonas, triterpenos, esteroides, saponinas y alcaloides. Este extracto fue efectivo como agente gastroprotector en un modelo de inducción de úlceras gástricas por etanol 96°.

Nuestros resultados, son similares a los reportados en estos tres trabajos, en el sentido de haber identificado flavonoides, compuestos fenólicos en cantidad muy abundante, y alcaloides en cantidad escasa, siendo estos metabolitos

secundarios, los responsables del efecto genotóxico sobre el ADN genómico del microorganismo estudiado.

La figura 4, es el registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1%, mostrando los ADN genómicos humanos (carriles 1, 2 y 3) de tres cultivos de *Staphylococcus aureus*, obtenidos mediante extracción orgánica con cloroformo. La fluorescencia del bromuro de etidio nos revela la concentración y la nitidez de las bandas, que muestran la integridad del ADN genómico, es decir no está fragmentado; quedando aptas para la realización de los ensayos de genotoxicidad “*in vitro*”.

Las figuras 5 y 6, muestran los registros fotográficos, revelan resultados similares de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, frente a ADN genómico humano a 1,500 ng/μL, incubado en baño María a 37°C durante una hora. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular; los carriles de 2 al 6 son los del tratamiento al ADN genómico humano, con las correspondientes concentraciones del extracto hidroalcohólico, se puede apreciar que en los carriles 2 y 3 cada banda del ADN no ha sufrido ninguna fragmentación por efecto del extracto hidroalcohólico a concentración de 5 y 10 mg/mL, respectivamente, observándose igual que la banda del ADN genómico humano “control” del carril 8, que no ha sido tratado con el extracto; el carril 4 muestra una banda de ADN ligeramente disminuida en su concentración respecto a la del “control”, debido a la fragmentación que ha sufrido por efecto del extracto a 25 mg/mL; el carril 5 muestra ADN con mayor fragmentación que la anterior, puesto que fue tratado con extracto a 50 mg/mL; mientras que, en el carril 6 la fragmentación del ADN ha sido total, no se observa ninguna banda, la misma que fue tratada con extracto a 100 mg/mL; el carril 7, corresponde al corrido del “blanco”, es decir, el extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal” a 100 mg/mL, en la que no se observa la presencia de ADN procedente de las hojas de “nogal”. La banda que se observa en el carril 8, es el ADN genómico humano sin ningún tratamiento, sirve como “control”, para comparar con el ADN de cada tratamiento a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico.

El carril 9, corresponde al corrido electroforético del tratamiento del ADN genómico humano a 1500 ng/μL, con 100 mg/mL de extracto hidroalcohólico del “nogal” más la enzima proteinasa K, mostrando que la intensidad del color de la

banda del ADN ha disminuido al igual que la de los carriles 4, 5 y 6, comparando éstas con el “control”; reafirmando que la fragmentación del ADN, es por la acción de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico y no por las enzimas nucleasas que podrían proceder de las hojas del “nogal”, ya que éstas se encontrarían degradadas por acción de la proteinasa K, durante la incubación a 37 °C durante una hora.

Las figuras 7 y 8 corresponden, respectivamente, a los registros fotográficos del primer y segundo ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, frente a ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a 1,500 ng/μL, incubado en baño María a 37 °C durante una hora. Se puede apreciar muy claramente, que el perfil de las bandas de ADN, de los diferentes carriles que corresponden a los tratamientos con el extracto hidroalcohólico a diferentes concentraciones, así como el tratamiento adicional con la enzima proteinasa K. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular; los carriles de 2 al 6 son los del tratamiento al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, con las correspondientes concentraciones del extracto hidroalcohólico, se puede apreciar que en los carriles 2 y 3 cada banda del ADN no ha sufrido ninguna fragmentación por efecto del extracto hidroalcohólico a concentración de 5 y 10 mg/mL, respectivamente, observándose igual que la banda del ADN genómico de *Staphylococcus aureus* “control” del carril 8, que no ha sido tratado con el extracto; el carril 4 muestra una banda de ADN ligeramente disminuida en su concentración respecto a la del “control”, debido a la fragmentación que ha sufrido por efecto del extracto a 25 mg/mL; el carril 5 muestra ADN con mayor fragmentación que la anterior, puesto que fue tratado con extracto a 50 mg/mL; mientras que, en el carril 6 la fragmentación del ADN ha sido total, no se observa ninguna banda, la misma que fue tratada con extracto a 100 mg/mL; el carril 7, corresponde al corrido del “blanco”, es decir, el extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal” a 100 mg/mL, en la que no se observa la presencia de ADN procedente de las hojas de “nogal”. La banda que se observa en el carril 8, es el ADN genómico de *Staphylococcus aureus* sin ningún tratamiento, sirve como “control”, para comparar con el ADN de cada tratamiento a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico.

El carril 9, corresponde al corrido electroforético del tratamiento del ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a 1500 ng/μL, con 100 mg/mL de extracto

hidroalcohólico del “nogal” más la enzima proteinasa K, mostrando que la intensidad del color de la banda del ADN ha disminuido al igual que la de los carriles 4, 5 y 6, comparando éstas con el “control”; reafirmando que la fragmentación del ADN, es por la acción de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico y no por las enzimas nucleasas que podrían proceder de las hojas del “nogal”, ya que éstas se encontrarían degradadas por acción de la proteinasa K, durante la incubación a 37 °C durante una hora.

Los resultados obtenidos respecto al efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, frente al ADN genómico humano y de *Staphylococcus aureus*, en ambos casos han presentado perfiles muy similares, dando a entender que el efecto genotóxico. Por otro lado, se puede constatar la capacidad de reproducibilidad de la técnica, es decir fidelidad que manifiesta la metodología utilizada en el presente estudio, revela que los resultados son los mismos, en los ensayos que se realice bajo las mismas condiciones de los diversos factores participantes en el proceso.

Los resultados visualizados en las figuras 5, 6, 7 y 8 y tomando como referencia la escala de la tabla 5 de la metodología, fueron llevados a valores numéricos designados al grado de fragmentación del ADN genómico humano y de *Staphylococcus aureus*, como producto de los ensayos de genotoxicidad *in vitro* según la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, los mismos que se reporta en tabla 8; detalla que con 5 y 10 mg/mL, respectivamente, la fragmentación es menor al 5 % del ADN (valor = 0); con 25 mg/mL, entre el 5 al 20 % (valor = 2); con 50 mg/mL, entre 40 al 95% (valor = 3) y con 100 mg/mL, la fragmentación es mayor al 95 % tanto del ADN genómico humano, como el de *Staphylococcus aureus* tratados respectivamente (valor = 4).

Tomando estos datos, los valores numéricos consignados en la tabla 8, se realizaron los análisis estadísticos con la prueba de Kruskal – Wallis, confrontando el grado de fragmentación del ADN genómico humano y de *Staphylococcus aureus* en tratamiento, respectivamente, expresado en porcentaje (%) versus la concentración del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal” expresado en miligramos por mililitro (mg/mL), mostrados en las figuras 9 y 10. El porcentaje de fragmentación del ADN genómico humano y de *Staphylococcus aureus*, en ambos casos revelan el

grado de genotoxicidad, formulándose, como hipótesis nula (H_0) que todas las medianas de las concentraciones del extracto son iguales y como hipótesis alterna (H_1) que al menos una mediana es diferente. Los resultados reportan que para $GL=4$ y $H=19$, el valor de $p=0,001$; por tanto, se rechaza la H_0 y se acepta la H_1 , porque P resultó menor que 0.05 . En consecuencia, el grado de fragmentación el ADN genómico humano y de *Staphylococcus aureus* tratados independientemente, depende de la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”.

Los resultados que hemos obtenido, fortalecen los resultados reportados por Julio R¹, 2013¹⁷, que demostraron la actividad antiestafilocócica *in-vitro* de los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de tres plantas medicinales peruanas: *Juglans neotropica* Diels (corteza), *Piper lineatum* Ruiz & Pav. (hojas) y *Terminalia catappa* L. (hojas); recolectadas en las regiones de Amazonas y Cajamarca, en el Perú. La actividad antiestafilocócica lo evaluó mediante el método de microdilución frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Los extractos investigados presentaron actividad significativa frente a ambas bacterias, con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 125 a 500 $\mu\text{g/mL}$ para *Staphylococcus aureus*, teniendo mayor actividad el extracto etanólico de *Juglans neotropica* Diels, y de 250 a 500 $\mu\text{g/mL}$ para *Staphylococcus epidermidis*.

Respecto al efecto genotóxico de diferentes plantas medicinales, nuestros resultados concuerdan con lo obtenido por Carballo² que en su estudio de sondeo genotóxico mediante el ensayo de electroforesis de una sola célula con los extractos de seis plantas. En los ensayos realizados, determinó que cuatro de ellas, *Chenopodium multifidum* (paico); *Schkuhria pinnata* (canchalagua), *Solanum sisymbriifolium* (espino colorado) y *Lithraea molleoides* (Molle de beber), indujeron daño al ADN, induciendo roturas de cadena simple y doble. De esta forma se verifica la necesidad de regulación en el consumo masivo e indiscriminado de las plantas medicinales.

Así mismo, estudios genotóxico sobre ADN genómicos con el método aplicado en el presente trabajo coinciden, con los resultados obtenidos por Marca y col¹⁸ que evaluaron la genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum* L. “ajo”. El extracto etanólico del bulbo de “ajo” a concentraciones de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL , respectivamente, no presentaron efecto genotóxico frente al DNA genómico de *Staphylococcus sp.*; mientras que el

zumo del bulbo de “ajo”, a concentraciones de 5, 10, 50 y 100 %, si presentaron un potente efecto genotóxico, fragmentando el 100 % del DNA, la prueba de Kruskal-Wallis reportó $H=0,53$, $GL=3$ y $p=0,912$. Concluyeron que el zumo del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”, presenta una potente actividad genotóxica frente al DNA genómico de *Staphylococcus sp.*

Pillaca¹⁹, en su estudio demostró el efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antivirales *Ficus carica* “higo” y *Euphorbia peplus* “leche leche”. Los resultados revelaron que el látex de estas dos plantas tiene efecto genotóxico sobre ADN genómico humano, donde el tiempo de incubación a una y cuatro horas, no influye en el efecto; mientras que las concentraciones de los extractos, sí influyen en el efecto genotóxico.

Podemos manifestar que nuestros resultados son similares a los reportados por otros investigadores en diversas plantas medicinales, como Miranda y col²⁰ estudiaron el efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Xanthium catharticum* HBK “amor seco” frente a ADN genómico humano, e identificaron los metabolitos secundarios presentes en el extracto: alcaloides y flavonoides en cantidad abundante; quinonas en cantidad moderada; y fenoles y/o taninos en escasa cantidad. El extracto hidroalcohólico a concentración de 50 mg/mL y 100 mg/mL presentó alto efecto genotóxico, fragmentando entre el 20 al 95 %; mientras que a concentraciones de 200 mg/mL hasta 500 mg/mL, presentaron un potente efecto genotóxico, fragmentando mayor al 95 % del ADN.

Así mismo, Moreno y Col²¹ reportan un estudio planteando como objetivo evaluar de la genotoxicidad *in vitro* de látex fresco y cristalizado de *Carica papaya* L. “papaya”, frente a ADN genómico humano. Todos los registros fotográficos de los corridos electroforéticos, revelan que las siete concentraciones ensayadas de 1 %, 2,5 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 % y 100 % de látex fresco, fragmentaron totalmente al ADN genómico humano; mientras que las concentraciones de 10 %, 25 % y 50 % de látex cristalizado, han fragmentado entre 20 % al 40 % del ADN y a concentración de 100 % de látex cristalizado degradado entre el 40 % al 95 % del ADN genómico humano, demostrando que la genotoxicidad del látex cristalizado si depende de su concentración.

Estudios realizados, de las plantas medicinales, refieren que la actividad antibacteriana, así como la actividad genotóxica se le atribuye a la presencia de metabolitos secundarios principalmente por los flavonoides, alcaloides y taninos.

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” presenta efecto genotóxico *in vitro* sobre el ADN genómico humano y de *Staphylococcus aureus*.
2. Los metabolitos secundarios identificados en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, fueron flavonoides y compuestos fenólicos en cantidad muy abundante; cardenólidos en regular cantidad; y alcaloides en escasa cantidad.
3. El extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” ha revelado igual resultado tanto con el ADN genómico humano como de *Staphylococcus aureus*; a concentraciones de 5 y 10 mg/mL, generaron la fragmentación menor al 5 % del ADN; con 25 mg/mL, entre el 5 al 20 % del ADN; con 50 mg/mL, entre 40 al 95 % del ADN y con 100 mg/mL, la fragmentación fue mayor al 95 % del ADN sometido al tratamiento. En este sentido, extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” a 50 y 100 mg/mL, respectivamente, presentó un potente efecto genotóxico frente al ADN genómico humano y de *Staphylococcus aureus*.

VII. RECOMENDACIONES

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

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gil O, Carmona A, Rodríguez A. Estudio Etnobotánico de especies tóxicas, ornamentales y medicinales de uso popular, presentes en el Jardín de Plantas Medicinales “Dr. Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Los Andes; 2006
2. Carballo A, Cortada C, Gadano A. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. Citogenética humana y genética toxicológica. Departamento de Bioquímica clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Argentina. 2005, 14 (2): 95-108.
3. Prieto J. Gomez L. Género *Staphylococcus*. Microbiología Médica. Editorial Doyma.1996. Pág. 179-191.
4. Florence O, Jimoh A, Adedapo A. y Afolayan J. Comparación del valor nutritivo, antioxidante y antibacteriano de la actividad de *Sonchus asper* y *Sonchus oleraceus*. BMC Medicina complementaria y alternativa. El diario oficial de la Sociedad Internacional de Investigación de Medicina Complementaria (ISCMR) 2011; 12 : 29-42. URL disponible en: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-29-42>.
5. Zúñiga L. Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Departamento de genética y microbiología. Grupo de Mutagénesis; 2009.
6. Dusinska M, Andrew R. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. Mutagenesis; 2005.
7. Angelis K; Dusinska M; Collins A. Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity. Electrophoresis; 2004
8. Lecca L, Cárdenas D, Yábar C. “Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN”. Serie de normas técnicas N° 38. División de Biología Molecular Centro Nacional de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Lima-Perú, 2003.
9. Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. Mutation Research; 2009.
10. Fairbairn D, Olive P, O’Neill K. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*; 1995
11. Arrebola D.; Fernández L. Actualización Sobre el Ensayo Cometa y de Micronúcleos *In vitro*, 2003.
12. Zúñiga L. Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Departamento de genética y microbiología. Grupo de Mutagénesis; 2009.
13. Quiros R. Evaluación de la actividad cicatrizante de un gel elaborado a base de los extractos de nogal (*Juglans neotropica* Diels), ortiga (*Urtica dioica* L.), sábila (Aloe vera), en ratones (*Mus musculus*). [tesis para obtener el título]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba – Ecuador. 2013. [acceso Julio 2016]. Disponible en: <http://dspace.espech.edu.ec/handle/123456789/2568>.
14. Hurtado P. Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* diels (nogal peruano). [tesis para optar título]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú. 2014.
15. Juro S, Flores V, Mendoza Y, del Carpio C. Efecto cicatrizante de las diferentes formas farmacéuticas tópicas elaboradas con el extracto

- hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal” en ratones albinos. *Folia dermatol. Perú* 2010; 21(1): 19-24
16. Hurtado P, Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* diels (nogal peruano). [tesis para optar título]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú. 2014
 17. Julio R. y Col. Deyvis D Solis³, Goannie J Basualdo³, Oscar G Santa Cruz³. Antistaphylococcal activity and antibiofilm activity of the extracts of *Juglans neotropica* Diels, *Piper lineatum* Ruiz & Pav. and *Terminalia catappa* L. 2013; 16(1): 32-37. Lima- Perú. [revista en Internet] [acceso agosto 2018]; Disponible en:
<https://www.google.com.pe/search?q=ACTIVIDAD+ANTIESTAFILOCCOCCICA+Y+ANTIBIOPEL%C3%93CCICA+Y+ANTIBIOPEL%C3%8DCULA+DE+LOS+EXTRACTOS+DE+Juglans>
 18. Marca P. Miranda T. Moreno M. Galindo Y. y Arenas J. Evaluación preliminar de la genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum* L. “ajo” frente a ADN de *Staphylococcus* sp. 5to Congreso Internacional de Farmacología de productos naturales “FAPRONATURA 2018”. Cuba 2018
 19. Pillaca L. Efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbiaeplus* “leche leche” y *Ficus carica* “higo”. Tesis de Químico Farmacéutico. UNSCH. Ayacucho, Perú. 2013
 20. Miranda Moreno M, Alarcón G, Aguilar E, Infante G. *IN VITRO* GENOTOXICITY OF THE MEDICINAL PLANT *Xanthium catharticum* HBK "dry love" AGAINST OF HUMAN GENOMIC DNA. 5to Congreso Internacional sobre Farmacología de Productos Naturales. Cuba, 2018.
 21. Moreno M., Miranda T., Quispe C., Rivera J. y Ango H. Evaluación de la genotoxicidad *in vitro* de látex fresco y cristalizado de *Carica papaya* L. “papaya” frente a ADN genómico humano. 2^{do} Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. Octubre 25 al 28 de 2017. Durango, Dgo. México.
 22. Bravo Díaz, Luis. Farmacognosia. España: Editorial Elsevier: 2006
 23. Kuklinski, C. Farmacognosia: aceites esenciales. 1^{ra} reimpresión. Barcelona: ediciones Omega, S.A. 2003.
 24. Chalar R. Moya J. Vargas E. Función Antimicrobiana de *Sonchus asper* (L). Hill en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Universidad Mayor de San Simón. Facultad de Medicina Aurélio Melean Cochabamba. Bolivia. [Revista en internet]. 2014. [Acceso mayo 2017]. Disponible en:
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1817-74332014000100008
 25. Ruiz E. Epidemiología molecular y resistencia a los antimicrobianos en *Staphylococcus aureus* en centros sanitarios de Mallorca durante los últimos 15 años 1999-2013. [TESIS DOCTORAL]. Universitat de les Illes Balears.2015
 26. Primo, E. Química orgánica básica y aplicada de la molécula a la industria. Tomo II. España: Reverte, 2007.
 27. Burriel Coll. “Estructura y propiedades de los ácidos nucleicos”. Master en Ingeniería Biomédica; 2007
 28. Dahm R “Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research”. *Human Genetics*; 2008.
 29. Repetto Jiménez M, Repetto Kuhn G. Toxicología fundamental. 4^{ta} Edición. Madrid: Díaz de Santos; 2009.

30. Glosario de términos Toxicológicos. Asociación Española de Toxicología
31. Klaassen C, Watkins J, Casarett, Doull. Fundamentos de toxicología. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España; 2005.
32. Herrera F, De La Peña E. Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Evolución de mutagenicidad y genotoxicidad. Madrid; 2004.
33. Sanchez A, Fonseca G, Capiro N, Fernández D. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en cuba. Revista cubana en farmacia. 34, 34-43.2000.
34. Bello J, López A. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Madrid: Díaz de Santos; 2001
35. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD).Curso de Toxicología Ambiental. Bogotá (Colombia); 2011.
36. Carballo M. Centro de Análisis Programas Sanitaris (CAPS). Biomarcadores de genotoxicidad. Barcelona Universidad de Buenos Aires, 2011.
37. Klaassen C, Watkins J, Casarett, Doull. Fundamentos de toxicología. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, 2005.
38. Bello J, López A. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Madrid: Díaz de Santos; 2001.
39. Lodish, Berk, Matsudaria, Káiser. Biología celular y molecular. 5^a edición. Argentina: Médica panamericana. 2005
40. Álvarez C, Ochoa S, Ayala N, Andrade M. Prueba Cometa. Universidad de Guadalajara (México); 2001-2013.
41. Collins A. Workshop on single cell gel electrophoresis (the comet assay) held as part of the UKEMS/DNA repair network joint meeting. Swansea, March. Mutagenesis; 2005.
42. Monteith D; Vanstone J. Comparision of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage; 2003
43. Frenzilli G, Nigro M, Lyons B. 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. Mutation Research;2009
44. He J, Chen W, Jin L, Jin H. Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. Mutation Research; 2000.
45. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de los productos naturales. 2a ed. Lima – Perú: Fondo Editorial de la P.U.C.P; 1994
46. Miranda T, Valer G. Protocolos de Biología Molecular – Guía de Práctica. Edit. Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2013.
47. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. 5^a edición. Perú: Editorial Mc Graw Hill. 2010.

ANEXOS

Anexo 1. Clasificación taxonómica de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”

CONSTANCIA

LA BIOLOGA LAURA AUCASIME MEDINA ESPECIALISTA EN TAXONOMÍA Y SISTEMÁTICA DE PLANTAS DEJA CONSTANCIA:

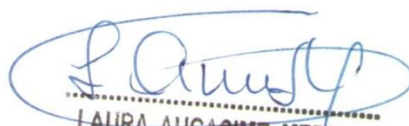
Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, Srta. Gaby, RONDINEL VALENZUELA, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988, siendo su taxonomía el siguiente:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	HAMAMELIDAE
ORDEN	:	JUGLANDALES
FAMILIA	:	JUGLANDACEAE
GENERO	:	<i>Juglans</i>
ESPECIE	:	<i>Juglans neotropica</i> Diels.
N. V.	:	“nogal peruano”

Se expide la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 22 de Setiembre del 2018


LAURA AUCASIME MEDINA
BIÓLOGA
Reg. C.B.P. N° 583 C.R. - XIII

Anexo 2. Descripción botánica *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL NOGAL

NOMBRE CIENTÍFICO: *Juglans neotropica* Diels.

FAMILIA : JUGLANDACEAE

CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS:

Árbol monoico de gran porte, alcanza hasta 20 metros de alto, y tronco grueso de copa irregular con ramas gruesas y abiertas. Las hojas son grandes, pinnaticompuestas, de disposición alterna, sin estípulas y caducas (caen en otoño y renuevan en primavera), las hojas al caer dejan grandes cicatrices foliares en las ramas. miden hasta 40 cm de largo con 10 a 15 foliolos, penninervias con las nervaduras bien prominentes en el envés de la hoja y pubescentes.

Inflorescencias masculinas aclamídeas, representadas por numerosos estambres protegidos por brácteas dispuestos en amentos largos y colgantes que se originan en las axilas de las hojas en las cicatrices foliares. Flores femeninas también aclamídeas agrupadas en grupos de 2 – 4 protegidas por brácteas, que se ubican en los extremos de las ramas de color verde y pubescentes, de ovario infero bicarpelar, unilocular y con un solo rudimento seminal.

Fruto nuez drupáceo, de color pardo o negro de olor penetrante característico cuando madura; las semillas poseen 2 cotiledones bilobos y oleíferos (ricas en aceite) , carente de endospermo.

Las hojas, ramas tiernas y frutos inmaduros están provistos de pelos glandulares cortos y gruesos que terminan en una roseta de células secretoras de aceites; asimismo presentan gran cantidad de materia tánica en toda la planta a excepción de la madera o leño.

HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN:


A esta planta se le encuentra en varias formaciones vegetales, crece en forma silvestre en valles interandinos borde de los ríos y cultivado en huertos y jardines en climas templados, siendo su rango de distribución de 0 – 3 200 msnm.

USOS :

El nogal peruano es una especie de gran importancia económica e industrial constituyendo un gran potencial para nuestra región.

Se cultiva como planta ornamental, sus hojas se usan en tintorería, teñidos de lanas en artesanía textil, las semillas en la alimentación por su contenido de aceites y minerales, asimismo en la industria maderera es apreciada por su madera fina y resistente contra insectos y podredumbre para la confección de muebles y otros;. En medicina popular las hojas en infusión se usan para combatir afecciones bronquiales, como hipoglucemiante, como diurético y otros.

Ayacucho, Setiembre del 2 018


LAURA AUCASIME MEDINA
BIÓLOGA
Reg. C.B.P. N° 583 C.R. - XIII

Anexo 3. Clasificación taxonómica de *Staphylococcus aureus*



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

EL QUE SUCRIBE:

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

DA CONSTANCIA:

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

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

TAXONOMIA DE *Staphylococcus aureus*

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

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

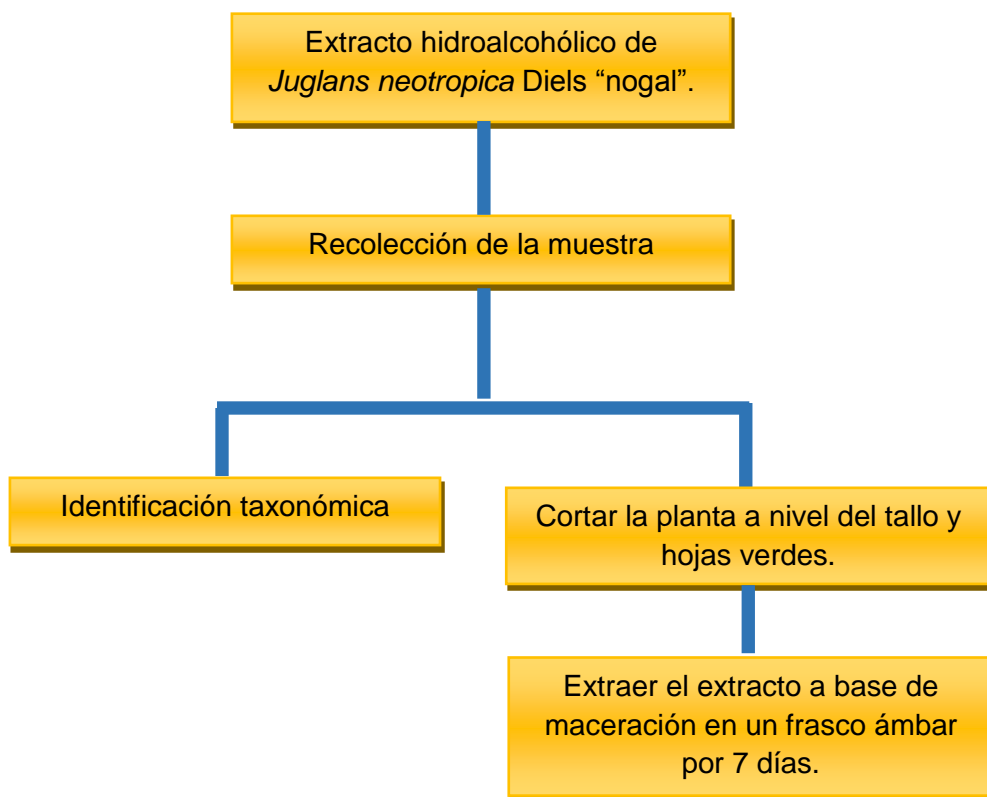
Ayacucho, 22 de setiembre de 2018.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTOBAL DE HUAMANGA
Facultad de Ciencias Biológicas

Tomás Yurel Miranda Tomasevich
Biólogo Microbiólogo
C.B.P. 1969

Anexo 4. Diagrama para la obtención del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”.



Anexo 5. Obtención del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”.



MACERACIÓN

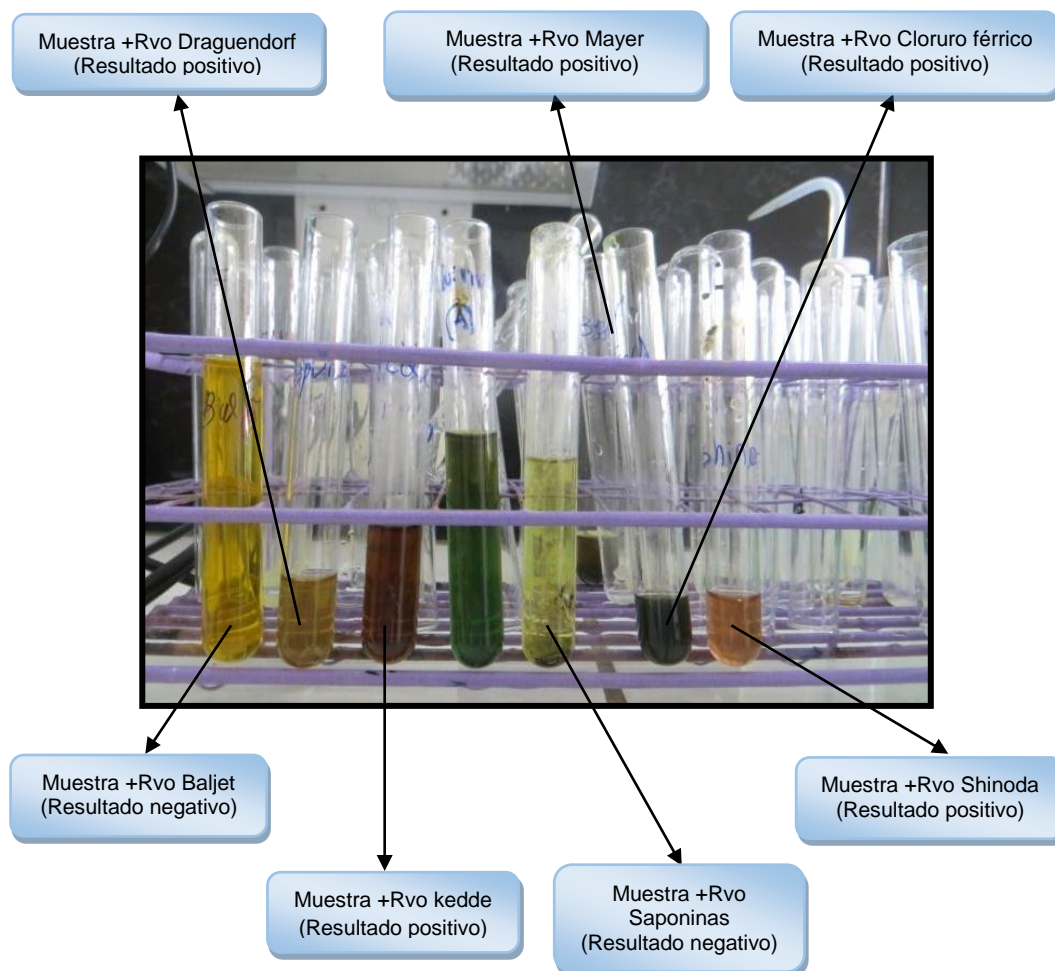


FILTRADO



**EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO**

Anexo 6. Metabolitos secundarios encontrados en el extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”.



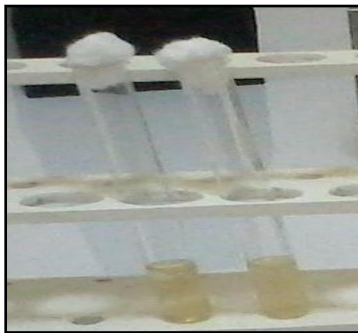
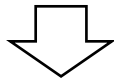
Anexo 7. Proceso de cultivo de *Staphylococcus aureus* Ayacucho 2018.



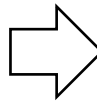
Preparación del caldo tripticase soja para reactivación de la cepa bacteriana y llevar al autoclave.



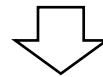
Preparación del agar tripticase soja para el cultivo de la cepa bacteriana y llevar a la autoclave.



Poner en tubos de ensayo esterilizado llevar a la estufa a 37°C por 24 horas.

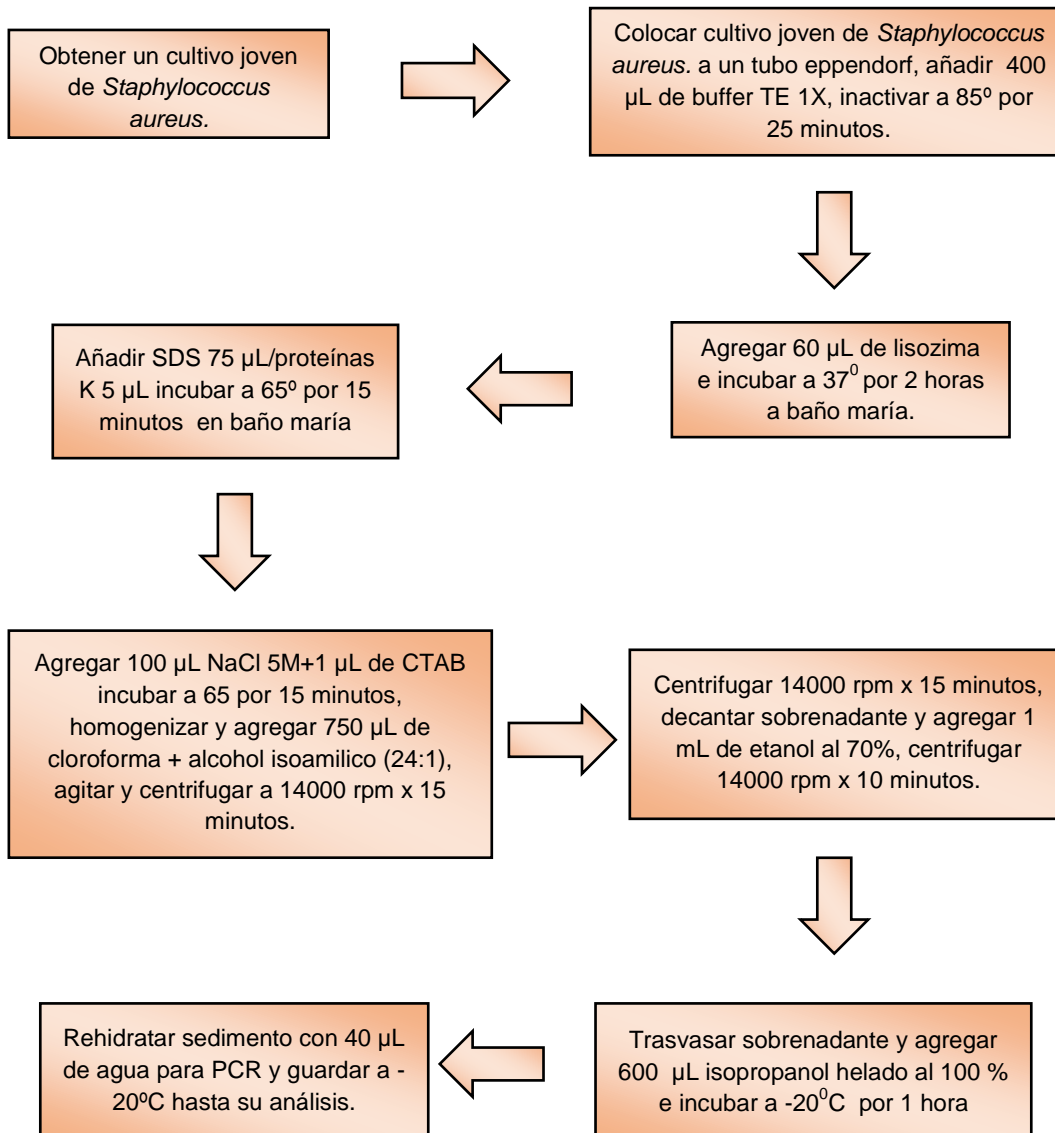


Cultivar la cepa bacteriana en placas petri, luego llevar a la estufa a 37°C por 24 horas.



Cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus*

Anexo 8. Proceso de extracción de ADN genómico de *Staphylococcus aureus* Ayacucho 2018.

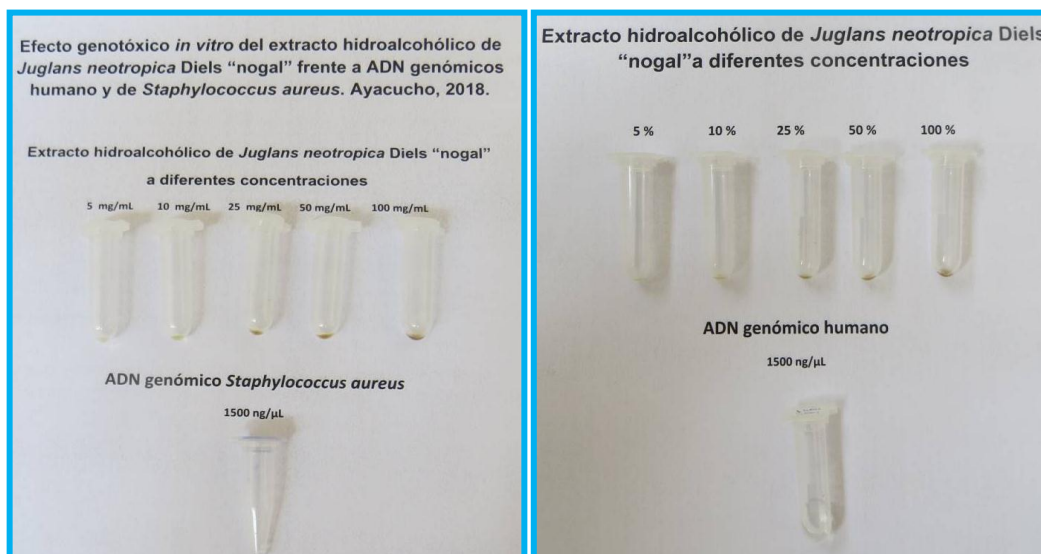


Anexo 9. Proceso de preparación a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”

Extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”



Concentración del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”



Anexo 10. Proceso para la determinación del Efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal” frente a ADN genómicos humano y de *Staphylococcus aureus*. Ayacucho, 2018.



Anexo 11. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar el efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal” frente a ADN genómicos humano y de *Staphylococcus aureus*. Ayacucho, 2018.

Estadísticas descriptivas

Concentración en mg/mL.	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
5	4	0	4,5	-2,27
10	4	0	4,5	-2,27
25	4	2	10,5	0,00
50	4	3	14,5	1,51
100	4	4	18,5	3,02
General	20		10,5	

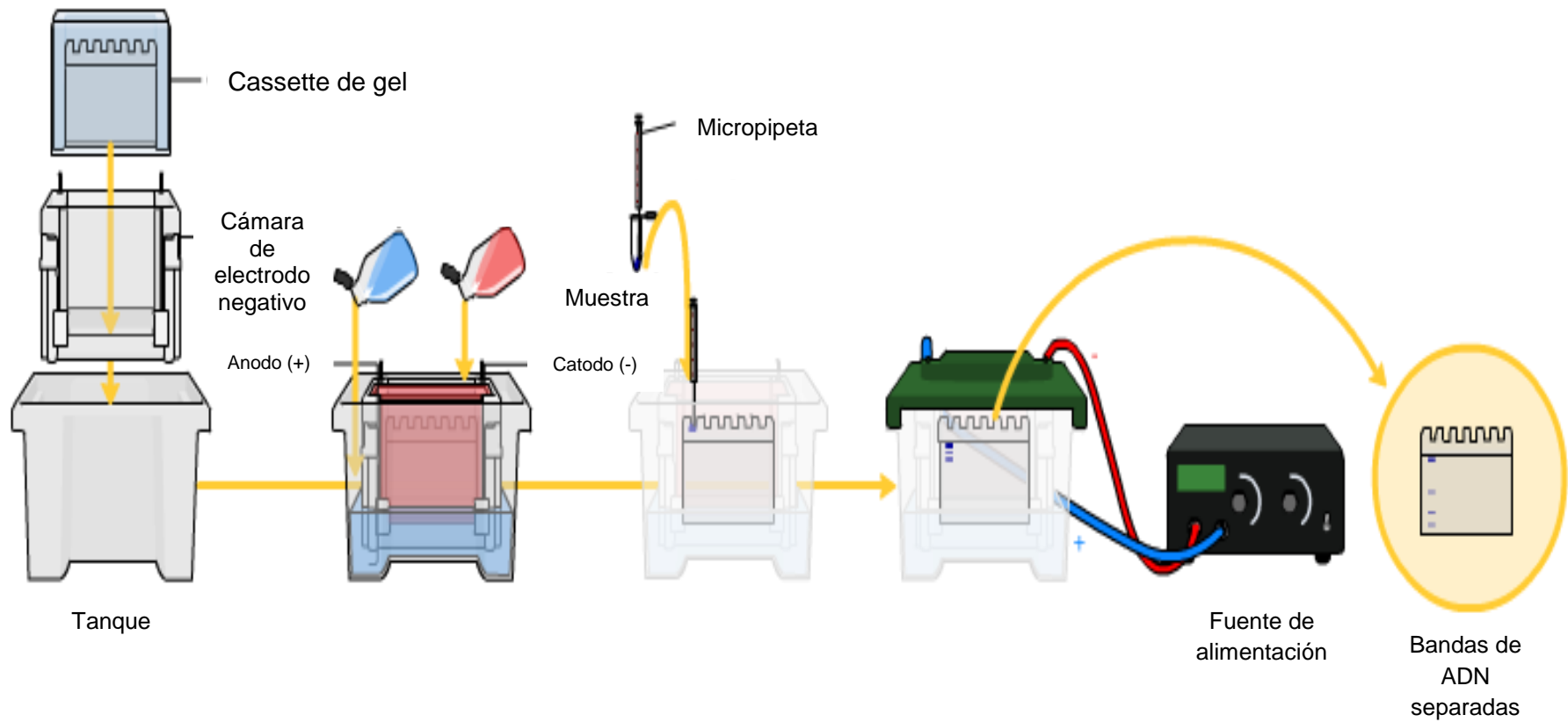
Prueba

Hipótesis nula	H_0 : Todas las medianas son iguales
Hipótesis alterna	H_1 : Al menos una mediana es diferente

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	4	17,37	0,002
Ajustado para empates	4	19,00	0,001

La aproximación de chi-cuadrada podría no ser exacta cuando algunos tamaños de muestra sean menores que 5.

Anexo 12. Diagrama de flujo de electroforesis



Anexo 13: Matriz de consistencia

TÍTULO: Efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal” frente a ADN genómicos humano y de *Staphylococcus aureus*. Ayacucho, 2018.

PERSONAL INVESTIGADOR: Gaby RONDINEL VALENZUELA.

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	MARCO TEÓRICO	VARIABLES	METODOLOGÍA
¿Tendrá efecto genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” frente a ADN genómico humano y de <i>Staphylococcus aureus</i> ?	<p>GENERAL Evaluar el efecto genotóxico del extracto de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”. Frente a ADN genómicos humano y de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> <p>ESPECÍFICOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”. Evidenciar la genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”. Frente a ADN genómicos humano y de <i>Staphylococcus aureus</i>. 	El extracto de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”. presenta efecto genotóxico en un ensayo <i>in vitro</i> frente a ADN genómico humano y de <i>Staphylococcus aureus</i> .	<p>Aspectos Botánicos <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”.</p> <p>Pruebas de Genotoxicidad Se pueden definir como pruebas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>, diseñadas para detectar compuestos que induzcan daño genético, directa o indirectamente, por diversos mecanismos.</p>	<p>Variable Independiente: Concentración del extracto de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”.</p> <p>Indicador: Concentración en porcentaje (%) del extracto.</p> <p>Variables Dependientes: Efecto genotóxico frente a ADN genómico humano y de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> <p>Indicador: Grado de fragmentación del Ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico humano y de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Tipo de investigación: Básica – experimental.</p> <p>Diseño Experimental: El experimento se realizará bajo la guía del modelo <i>in vitro</i> para estudiar la actividad genotóxica.</p> <p>Población: <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”., que crece en los diferentes pisos ecológicos de la provincia de Huamanga.</p> <p>Muestra: Muestreo aleatorio simple de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”. para la obtención directa del extracto, en la ciudad de Huamanga.</p> <p>Unidad experimental: ADN genómico humano y de <i>Staphylococcus aureus</i> a concentración de 1500 ng/ µL por cada ensayo.</p> <p>Análisis estadístico Paquete estadístico SPSS, Pruebas de Kruskal-Wallis.</p>