

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



Genotoxicidad *in vitro* de hojas de *Datura stramonium*

L. "chamico". Ayacucho, 2016.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

Presentado por el:

Bach. MARTINEZ FERNANDEZ, Joel Caroy

Ayacucho - Perú

2017

A mis padres Javier MARTINEZ y Martha FERNANDEZ, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación, cuidándome y dándome fortaleza, siendo mí apoyo en todo momento. Así mismo a mis hermanos; Ketty, Javier, Jehnny y Danny.

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

Así mismo un agradecimiento especial a mis padres Javier Martínez Urbano y Martha Fernandez Torre, por su apoyo y confianza brindada hacia mi persona en todo momento. Gracias a ellos y a mis hermanos pude lograr mi sueño de ser profesional, para así apoyar a mi familia y a la sociedad.

ÍNDICE

	Página
Dedicatoria	iii
Agradecimiento	v
Resumen	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes.	3
2.2 Marco conceptual	11
2.2.1 <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”	11
2.2.2 Toxicidad y genotoxicidad	13
2.2.3 Ensayo cometa	17
2.2.4 Ácidos nucleicos	19
2.2.5 Extracción de ADN de sangre total	25
2.2.6 Fuentes de obtención de ADN	26
2.2.7 ADN genómico	28
2.2.8 Extracto Hidroalcohólico	28
2.2.9 Electroforesis en gel	28
2.2.10 Espectrofotometría	29
III. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1 Lugar de ejecución	31
3.2 Población y muestra	31
3.3 Unidad experimental	31
3.4 Metodología y recolección de datos	31
3.4.1 Recolección de la muestra	31
3.4.2 Dsecación de la muestra	32
3.4.3 Molienda	32
3.4.4 Obtención de extracto hidroalcohólico	32
3.4.5 Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”	32
3.4.6 Extracción de ADN genómico a partir de linfocitos humano	32
3.4.7 Ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>	34
3.5 Tipo de investigación	37
3.5.1 Diseño de investigación	37
3.6 Análisis de datos estadísticos	37

IV. RESULTADOS	39
V. DISCUSIÓN	47
VI. CONCLUSIONES	55
VII. RECOMENDACIONES	57
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	59
ANEXO	67

ÍNDICE DE TABLAS

		página
Tabla 1	Fuentes de obtención del ADN genómico.	27
Tabla 2	Preparación de soluciones de digestión de ADN genómico humano para grupo 1 con las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. "chamico". Ayacucho 2016.	34
Tabla 3	Preparación de soluciones de digestión de ADN genómico humano para grupo 2 con las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. "chamico". Ayacucho 2016.	35
Tabla 4	Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN de grupo 1 para el ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. "chamico". Ayacucho 2016.	35
Tabla 5	Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN de grupo 2 para el ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. "chamico". Ayacucho 2016.	36
Tabla 6	Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.	36
Tabla 7	Diseño de investigación	37
Tabla 8	Identificación fitoquímica de los metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. "chamico". Ayacucho 2016.	39
Tabla 9	Grado de genotoxicidad <i>in vitro</i> de ADN genómico humano, con soluciones de digestión de ADN de grupo 1 del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. "chamico" y tiempo de incubación a 37°C. Ayacucho 2016.	44
Tabla 10	Grado de genotoxicidad <i>in vitro</i> de ADN genómico humano, con soluciones de digestión de ADN de grupo 2 del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. "chamico" y tiempo de incubación a 37°C. Ayacucho 2016.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1	<i>Datura stramonium</i> L. “chamico”. 12
Figura 2	Estructura química de las aldopentosas. 20
Figura 3	Estructura química de las bases purinas y pirimidinas. 21
Figura 4	Estructura química del ácido fosfórico. 21
Figura 5	Estructura química de un nucleótido. 22
Figura 6	Estructura química del ADN. 23
Figura 7	Estructura química del ARN. 24
Figura 8	Proceso de síntesis de proteína 25
Figura 9	Esquema de síntesis de células sanguíneas 26
Figura 10	Ensayo genotóxico del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”, a una hora de incubación en baño maría a temperatura de 37 °C a diferentes concentraciones. Laboratorio de Biología Molecular. Ayacucho 2016. 40
Figura 11	Ensayo genotóxico del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”, a una hora de incubación en baño maría a temperatura de 37 °C a diferentes concentraciones. Laboratorio de Biología Molecular. Ayacucho 2016. 41
Figura 12	Ensayo genotóxico del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”, a cuatro horas de incubación en baño maría a temperatura de 37 °C, a diferentes concentraciones. Laboratorio de Biología Molecular. Ayacucho 2016. 42
Figura 13	Ensayo genotóxico del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”, a cuatro horas de incubación en baño maría a temperatura de 37 °C a diferentes concentraciones. Laboratorio de Biología Molecular. Ayacucho 2016. 43
Figura 14	Prueba de Kruskal-Wallis: grado de genotoxicidad vs concentración y tiempo de incubación a una hora y cuatro horas en baño maría a 37 °C. Ayacucho 2016. 46

ÍNDICE DE ANEXOS

		Página
Anexo 1	Clasificación taxonómica de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”. Ayacucho 2016.	68
Anexo 2	Descripción botánica de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”. Ayacucho 2016.	69
Anexo 3	Diagrama para la obtención del extracto hidroalcohólico de hojas de datura <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”. Ayacucho 2016.	70
Anexo 4	Diagrama de identificación fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”. Ayacucho 2016.	71
Anexo 5	Recolección, secado y molienda de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”. Ayacucho 2016.	72
Anexo 6	Obtención del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”. Ayacucho 2016.	73
Anexo 7	Concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”, a sequedad en una estufa MEMMERT a 37 °C. Ayacucho 2016.	74
Anexo 8	Ensayo de identificación fotoquímico del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”. Ayacucho 2016.	75
Anexo 9	Proceso de extracción de ADN genómico a partir de linfocitos humano. Ayacucho 2016.	76
Anexo 10	Proceso de preparación a diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”. Ayacucho 2016.	77
Anexo 11	Concentraciones preparadas a partir del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”. Ayacucho 2016.	78
Anexo 12	Preparación de solución de digestión de ADN genómico humano (con las concentraciones de grupo 1 y grupo 2). E incubación en baño maría por una hora y cuatro horas a 37 °C. Ayacucho 2016.	79

Anexo 13	Fase de electroforesis en gel de agarosa (se repite el mismo procedimiento para los grupos 1 y 2 de tratamiento). Ayacucho 2016.	80
Anexo 14	Fase de coloración con bromuro de etidio. Ayacucho 2016.	81
Anexo 15	Fase de lectura por radiación UV. Ayacucho 2016.	82
Anexo 16	Datos utilizados en el análisis estadístico (en crudo). Ayacucho 2016.	83
Anexo 17	Screening fitoquímico de extractos acuosos liofilizados de plantas biocidas. Estudio Integrado de Plantas Biocidas del Algodonero. Instituto. De Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM. Perú; 2010.	87
Anexo 18	Cuantificación de alcaloides de extractos acuosos liofilizados de plantas biocidas. Estudio Integrado de Plantas Biocidas del Algodonero. Instituto. De Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM. Perú; 2010.	88
Anexo 19	Matriz de consistencia	89

RESUMEN

En los últimos años a retornado el interés por las plantas medicinales en búsqueda de nuevas estructuras bioactivas. Los compuestos químicos presentes en las plantas medicinales pueden interactuar directa o indirectamente con el ADN, produciendo cambios que afectan el funcionamiento celular y que a largo plazo pueden causar trastornos en la salud, de ahí la importancia de detectar en sus etapas iniciales la acción sobre el material genético.

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la genotoxicidad *in vitro* de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico” y determinar las concentraciones del extracto hidroalcohólico a la cual produce la genotoxicidad; se realizó entre los meses de setiembre de 2016 a mayo de 2017 en el laboratorio de Farmacognosia de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y en el Centro de Investigación de Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en la ciudad de Ayacucho. El extracto hidroalcohólico etanol:agua (3:1) fue obtenido luego de la maceración durante 7 días; la determinación genotóxica a diferentes concentraciones, exponiéndose éstos frente al ADN genómico humano y la estimación del daño genotóxico *in vitro* fue determinado con el “método Tomasevich”, mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% y visualizado en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra *UVsolo TS*. Los metabolitos secundarios identificados fueron: alcaloides y taninos; las concentraciones que produjeron mayor daño genotóxico fueron de 500 mg/mL, 400 mg/mL y 300 mg/mL, que mediante la prueba de Kruskal-Wallis el daño genotóxico es directamente proporcional a la concentración del extracto hidroalcohólico de *Datura stramonium* L. y al tiempo de incubación ($p=1 \times 10^{-4}$). Se llegó a la conclusión, que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Datura stramonium* L. causa daño genotóxico directamente proporcional a la concentración y al tiempo de incubación.

Palabras clave: Genotoxicidad, ADN genómico, *Datura stramonium* L.

I. INTRODUCCIÓN

La población humana en general reconoce que las plantas medicinales poseen propiedades terapéuticas para diferentes males gracias a que éstas contienen diferentes metabolitos secundarios, los mismos que constituyen el principio activo.¹ Generalmente la actividad farmacológica de las hierbas medicinales se asocia con la toxicidad de las mismas y el efecto tóxico inducido depende de la dosis consumida. Los compuestos químicos presentes en las plantas medicinales pueden interactuar directa o indirectamente con el ADN, produciendo cambios que afectan el funcionamiento celular y que a largo plazo causan trastornos en la salud. De ahí la importancia de detectar en sus etapas iniciales la acción sobre el material genético.²

La genotoxicidad de los agentes químicos es una característica intrínseca, basada en el potencial electrofílico del agente para unirse a los campos nucleofílicos de macromoléculas presentes en las células, tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN) el portador de la información hereditaria. La genotoxicidad, por tanto, es la toxicidad que se manifiesta en el material genético de las células, estos incluyen efectos tanto directos como indirectos sobre el ADN.³

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 del 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.⁴

El fundamento de la 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.^{5, 6} 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.^{6, 7, 8}

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.^{9, 10}

En los últimos años el uso del ensayo cometa se ha extendido a las células germinales, en donde se ha evaluado la integridad del ADN espermático,¹¹ las condiciones de estrés oxidativo en oocitos porcinos¹² y embriones bovinos.¹³

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 a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico 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.¹⁴

Se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Determinar la genotoxicidad *in vitro* de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”.

Objetivos Específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”.
- Determinar las concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico” a la cual produce la genotoxicidad.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio.

Nuestro país posee una flora rica en plantas medicinales, estos fitofármacos experimentan cada día un incremento de la preferencia en el consumo nacional, como también en otros países. En los últimos años las plantas medicinales han adquirido gran importancia en terapias alternativas o complementarias, por esta razón los estudios genotóxicos de los fitofármacos son esenciales para que puedan ser registrados y reconocidos como productos farmacéuticos y puedan ser consumidos por el hombre. Muchos de los compuestos presentes en las plantas pueden presentar propiedades mutagénicas relacionadas con procesos de diferenciación celular, teratógenos y alteraciones genéticas en la descendencia, por ello es de suma importancia realizar el estudio de genotoxicidad. El ensayo de cometa o electroforesis unicelular alcalina es actualmente muy usado para evaluar el efecto genotóxico que es un método muy sensible para detectar niveles de daño por fragmentación de la cadena de ADN.⁴

En el año 2005 Ángela Vizoso, Alberto Ramos y colaboradores realizaron una investigación titulada “estudio genotóxico *in vitro* e *in vivo* del extracto fluido de *Cassia grandis* L. y el gel de *Aloe vera* L.” con el objetivo de conocer la posible actividad mutagénica del extracto fluido de *Cassia grandis* L. y el gel de *Aloe vera* L., se llevó a cabo un estudio toxicogenético empleando dos sistemas de ensayo a corto plazo uno *in vitro* y otro *in vivo*; el modelo *Aspergillus nidulans* D-30 que detecta daño primario al ADN y el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón el cual determina daño clastogénico y aneugénico. En el ensayo *in vitro* con el hongo *Aspergillus nidulans* D-30 (segregación mitótica) se evaluaron con concentraciones del extracto fluido de *Cassia grandis* L., desde 0,067 a 1,675 mg de sólidos totales/mL y para el gel de *Aloe vera* L., concentraciones de 0,09 a 1,00 mg de sólidos totales/mL. En la prueba *in vivo* de inducción de micronúcleos se ensayaron para la *Cassia grandis* L. y para el gel de *Aloe vera* L., dosis de 500,

1000 y 2000 mg/kg de peso corporal. En ambas baterías de ensayos genotóxicos ninguno de los 2 fitofármacos mostraron ni daño celular ni actividad genotóxica.¹⁵ En el año 2009 Luisa Celi Carrión en su trabajo de investigación titulado “Evaluación del efecto genotóxico del extracto hexánico y los metabolitos secundarios de *Clusia latipes* mediante el ensayo cometa en linfocitos humanos”, determinó el efecto genotóxico producido por el extracto de *Clusia latipes* (planta medicinal) y sus metabolitos secundarios Friedelina y β -amirina en linfocitos humanos mediante el ensayo cometa.

El tratamiento que se dio a las células fue de 3 horas y las dosis que se usaron fueron 25, 35 y 45 ug/ml o μ M respectivamente y los debidos controles negativo (DMSO 0,9 %) y positivo Etil Metanosulfonato (EMS 0,1 μ M).

Los resultados del ensayo cometa mostraron que existe un efecto genotóxico medido por la migración de la cola del cometa dosis - dependiente tanto del extracto de *Clusia latipes* como de los compuestos: friedelina y acetato de β -amirina, sin embargo el daño es más significativo a las concentraciones mayores. El consumo agudo de altas concentraciones del extracto de *Clusia latipes* produce efectos genotóxicos en linfocitos humanos.¹⁶

En el año 2006 Arilia García López en su trabajo de investigación titulado “Estudio toxicogenético de un extracto fluido de *Ocimum basilicum* L. (albahaca blanca)” evaluó el potencial toxicogenético de un extracto fluido con etanol al 70 % de *Ocimum basilicum* L. “albahaca blanca” en 3 sistemas de ensayos a corto plazo, se emplearon 2 modelos *in vitro* el sistema Salmonella/microsoma (Ames) y el de segregación mitótica con el hongo diploide *Aspergillus nidulans* D-30 y otro *in vivo* que utiliza el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón. En el ensayo de Ames se observó una respuesta positiva con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA-98 con activación metabólica en el rango de concentraciones de 1 500 y 5 000 mg/placa y TA-1535 sin activación metabólica en el rango de concentraciones de 50, 150, 500 y 1 500 mg/placa. En el ensayo de segregación mitótica, se evaluaron concentraciones de 0,005 a 1,00 mg de sólidos totales/mL, sin detectar aumentos significativos de la concentración dependiente en la Frecuencia de Sectores Segregantes por Colonias (FSC). En el ensayo de inducción de micronúcleos se ensayaron dosis de 500, 1 000 y 2 000 mg/kg de peso corporal. Los resultados obtenidos demuestran que el extracto de *Ocimum basilicum* L. fue mutagénico en el sistema Salmonella/microsoma y moderadamente citotóxico en el ensayo de segregación mitótica sin mostrar daño

genético en esta prueba. En el ensayo *in vivo* no se observó respuesta genotóxica en las dosis estudiadas.¹⁷

Gisela Marrero Cofiño y colaboradores evaluaron el efecto genotóxico del D-004 en ratones empleando la electroforesis alcalina de células individuales en gel (ensayo cometa). El D-004 es un extracto lipídico obtenido del fruto de la palma real (*Roystonea regia*) que consiste en una mezcla reproducible de ácidos grasos y ésteres, en la cual el ácido oleico, el láurico y el palmítico son los más abundantes. Los resultados obtenidos han mostrado que en los modelos experimentales el D-004 presenta una eficacia similar o ligeramente superior a los extractos de *Saw palmetto* en el tratamiento de la Hiperplasia Prostática Benigna. En este trabajo se investigó el efecto genotóxico de la administración oral *in vivo* del D-004 en ratones adultos jóvenes de ambos sexos mediante la aplicación de la electroforesis alcalina de células individuales.¹⁸

Se conformaron cuatro grupos experimentales de cuatro ratones, cada uno de ambos sexos, los cuales se trataron con vehículo o D-004 (500, 1 000 y 2 000 mg/kg) por 14 días. Al finalizar el tratamiento, los leucocitos de los ratones de los diferentes grupos fueron embebidos en agarosa, lisados, sometidos a electroforesis y teñidos con nitrato de plata para analizar la ruptura de cadena (RC) y sitios lábiles al álcali (SLA) en el ADN. En correspondencia con otros estudios genotoxicológicos del producto, atendiendo a la ausencia de genotoxicidad reportada para el mismo en los ensayos de Ames y micronúcleos en médula ósea de ratones, los resultados obtenidos en este ensayo no evidenciaron la inducción de RC y SLA.¹⁸

En el año 2007 Roxana M. Roldán y colaboradores realizaron una investigación titulada "Estudio de genotoxicidad de *Picrasma crenata* (vell.) Engl. *Simaroubaceae*". En la medicina popular se utiliza el leño de *Picrasma crenata* en infusión como pediculicida y como tónico amargo no astringente. Los principios activos responsables de la actividad son los quasinoídes. Los objetivos de este trabajo fueron: determinar la actividad de las infusiones sobre el desarrollo de raíces y la división celular mediante el Test de *Allium cepa*; analizar la correlación de las concentraciones y los parámetros macro y microscópicos e interpretar la posible genotoxicidad de la infusión. Las concentraciones empleadas fueron 2,5 mg%; 5,0 mg%, 10,0 mg%, 20,0 mg% y 40,0 mg%. Se observó una correlación estadísticamente significativa de las concentraciones con las longitudes de las raíces y las anomalías macroscópicas; además, una correlación significativa de

los índices mitóticos con las longitudes de las raíces y las anomalías microscópicas. Así, se puede inferir que los extractos en las concentraciones ensayadas podrían presentar actividad genotóxica.¹⁹ Los valores obtenidos muestran una correlación de las concentraciones analizadas con las longitudes de las raíces y las anomalías macroscópicas; así como de los índices mitóticos con las longitudes de las raíces y las anomalías microscópicas.¹⁹ Por lo tanto, se puede establecer que existe una relación directa entre las concentraciones estudiadas y las anomalías macro y microscópicas.¹⁹

Se observó que a altas concentraciones se produce el arresto de la división mitótica, esto demuestra actividad genotóxica de este material en el ensayo. El fenómeno genotóxico también se asocia a la presencia de cromosomas en mitosis. De acuerdo con esto se puede inferir que las concentraciones empleadas por la población serían seguras debido a que las anomalías se presentan a concentraciones más altas que las utilizadas tradicionalmente. Este test de *Allium cepa* es de carácter preliminar, orientativo y constituye el punto de partida para la realización de análisis más específicos y sensibles (cultivos de linfocitos para la evaluación de biomarcadores como test del cometa, intercambio de cromátides hermanas, cinética de proliferación celular, etc.) para poder evaluar un posible riesgo genotóxico humano, ya que estos ensayos son *in vitro* y no permiten una exacta correlación con lo que ocurre *in vivo* debido a las modificaciones que ocurren en el organismo.¹⁹

En el año 2013 Emily Toscanon y colaboradores realizaron un estudio titulado “Estudio genotóxico de una bebida experimental de quinua, kiwicha y kañiwa” Para ello se ha elaborado una bebida experimental a base de pseudocereales de alto valor nutricional como son *Chenopodium quinoa Willd* (quinua), *Amaranthus caudatus* L. (kiwicha) y *Chenopodium pallidicaule Aellen* (kañawa), preparada para inducir un posible efecto hipolipemiante en un grupo de personas. El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial genotóxico de esta bebida experimental mediante dos pruebas *in vitro* validadas por agencias internacionales. En la prueba de Ames se utilizaron las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*, con y sin fracción microsomal. Se evaluaron 4 dosis de bebida y además un posible efecto antimutagénico. Para la prueba de micronúcleos se usó cultivos de linfocitos con células binucleadas en presencia de cinco dosis de la bebida. Ambas pruebas indican que la bebida estudiada en sus distintas dosis no presenta efecto genotóxico. Sin embargo, en la evaluación del posible efecto protector de la bebida

se evidenciaría que por el contrario se potencia el efecto mutagénico de los mutágenos empleados para cada cepa. Por lo tanto, es importante que esta bebida experimental sea sometida a pruebas adicionales *in vitro* e *in vivo* para evaluar el potencial genotóxico antes de su consumo.²⁰

En el año 2012 Ana María Ángel Castañeda realizó un trabajo de investigación titulado “Evaluación de la actividad genotóxica de propóleos recolectados en diferentes apiarios de Cundinamarca y Boyacá (Colombia)”. La metodología utilizada para alcanzar su objetivo, incluyó el montaje de una batería de dos pruebas de genotoxicidad en linfocitos de sangre periférica humana: ensayo de micronúcleos (MN) y la prueba de cometa (SCEG). Se utilizaron dos muestras de propóleo: Universidad Nacional de Colombia y San Mateo – Boyacá; se realizaron extracciones etanólicas de cada muestra y se evaluaron cuatro concentraciones (0,0156; 0,0312; 0,0468 y 0,0624 µg/µL). Los resultados más relevantes de cada una de las pruebas demuestran que existe una diferencia entre los propóleos que provienen de regiones geográficas distintas, tanto en la composición química como en su actividad biológica, se observaron efectos citotóxicos y genotóxicos para ambos tipos de propoleo que se relacionaron con el incremento de las concentraciones y con el tipo de propóleo. El análisis estadístico que se llevó a cabo fue prueba Chi-cuadrada para el ensayo de MN y ANOVA con prueba Tukey para el ensayo cometa, determinando que hay diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas y respecto al control. Finalmente se concluyó que la muestra (UN) produce más daño en todas las concentraciones evaluadas que la muestra (SM) sobre linfocitos de sangre periférica humana y que pueden ser evaluadas con los ensayos de MN y del Cometa.²¹

El año 2004 Gadano A; Gurni A. y Carballo A, realizaron un estudio titulado “Screening genotóxico de hierbas medicinales utilizadas en la medicina tradicional argentina”. En el presente trabajo se estudió a las plantas medicinales más utilizados en terapéutica, se pueden citar *Chenopodium multifidum* L. (Chenopodiaceae), *Lithraea molleoides* Vell. Engl. (Anacardiaceae), *Styphnolobium japonicum* L (Fabaceae), *Prosopis alba* (Mimosaceae), *Schkuhria pinnata* (Lam.), *Solanum sysimbriifolium* Lam. (Solanaceae). En el presente trabajo se propuso estudiar el efecto genotóxico mediante el ensayo de *screening*: Electroforesis de una sola Célula. En la electroforesis de una sola célula (ensayo del cometa).²²

En el screening genotóxico realizado sobre seis especies diferentes de plantas medicinales mediante la electroforesis de una sola célula, se determinó que cuatro de ellas indujeron daño al ADN. Las plantas que indujeron roturas doble y simple cadena fueron: *Chenopodium multifidum* (paico); *Schkuhria pinnata* (canchalagua); *Solanum sisymbriifolium* (espino colorado) y *Lithraea molleoides* (molle de beber). Los resultados obtenidos en la evaluación del cocimiento de *Chenopodium multifidum*, mostraron un incremento en el daño producido al ADN. Esto se tradujo en un incremento estadísticamente significativo del índice de daño calculado ($p < 0,05$).²²

En el tratamiento realizado con el extracto acuoso (infusión) de *Lithraea molleoides*, se detectó un incremento estadísticamente significativo del índice de daño al ADN ($p < 0,01$). De esta manera, el largo de los cometas se incrementó al exponer a las células a mayores concentraciones del extracto, produciendo un aumento de las roturas de ADN doble y simple cadena.²²

En los tratamientos realizados con los extractos acuosos de *Prosopis alba* y de *Styphnolobium japonicum* L., no se observaron variaciones en el largo de los cometas analizados. Se observó una gran variación en los diferentes individuos analizados, siendo el individuo 1 extremadamente sensible frente al agregado de cualquier extracto.²²

En el ensayo realizado con la infusión de *Schkuhria pinnata*, especie de la familia de las Asteraceae, los resultados evidenciaron daño genotóxico. El análisis exploratorio de los datos indicó que este incremento es estadísticamente significativo, con un $p < 0,05$.²²

En el tratamiento realizado con la infusión de *Solanum sysimbriifolium* (Solanaceae) también se detectó un aumento del largo de los cometas. Esta observación se traduce en un incremento estadísticamente significativo del índice de daño ($p < 0,01$). Esto sugiere que la molécula de ADN es susceptible a los principios activos presentes en el extracto acuoso analizado.²²

En el año 2004 Gladys Díaz García y colaboradores realizaron el estudio genotóxico del *Xanthium strumarium* L., planta experimentalmente conocida por sus propiedades diuréticas. Se emplearon 60 ratones de la línea Balb/c a los que se les administró extracto fluido al 30 % de *Xanthium strumarium* L. Los resultados obtenidos con la planta fueron comparados con un control positivo como la ciclofosfamida y un control negativo al que se les administró el vehículo alcohólico empleado en el extracto. Se utilizó el método de inducción de micronúcleos en

médula ósea de ratón y no se obtuvieron resultados significativos, por lo que se concluye que hubo ausencia de efecto citotóxico con la dosis de planta ensayada.²³ El extracto hidroalcohólico no es genotóxico en este sistema de ensayo al no inducir de forma significativa la formación de micronúcleos. No se encontraron diferencias significativas al comparar el peso corporal en los grupos estudiados.²³

En el año 2006 Keile Brugés Y María Reguero Reza realizaron un estudio de investigación titulado “Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L.” En esta investigación se seleccionó la planta *Sida rhombifolia* L. a la cual se le realizó la evaluación de la toxicidad de extractos y fracciones utilizando como organismos de prueba *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* y *Artemia salina*. La actividad biológica fue evaluada mediante la prueba de sensibilidad a antimicrobianos y la genotoxicidad con el ensayo Cometa. Los ensayos de toxicidad aguda con los organismos de prueba muestran que los extractos acuosos son prácticamente no tóxicos (CL50 >1000 ppm), lo cual sugiere que su uso en forma de infusión es seguro. Los extractos etanólicos y las fracciones de acetato de etilo y cloroformo presentaron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* que puede ser atribuida a los metabolitos secundarios (terpenoides, flavonoides) que están presentes en esta especie. Los extractos etanólicos presentaron una importante actividad genotóxica sobre los linfocitos en el ensayo Cometa, siendo el extracto etanólico de raíces el que presenta mayor genotoxicidad (CL50 35 ppm). Es importante señalar que el extracto acuoso de hojas presenta una baja genotoxicidad (CL50 900 ppm), lo cual es relevante si se toma en consideración que es la parte de la planta tradicionalmente utilizada por las comunidades indígenas ubicadas en la Sierra Nevada de Santa Marta.²⁴

En el año 2008 Remigio Montero y colaboradores realizaron un estudio titulado “Genotoxicidad de *Justicia pectoralis* Jacq. (Tilo)”. Para dicho estudio empleó el ensayo *Salmonella*/microsomas con las líneas TA 1535, TA 1537, TA 98 y TA 100 con un rango de concentraciones de 50 a 5 000ug de polvo/placa (\pm S9) según el protocolo de incorporación en placas; para el ensayo de micronúcleos en médula ósea se utilizaron ratones C57BL/6J de los 2 sexos, que recibieron dosis isovolumétricas (10 mL/kg) de 500, 1 000 y 2 000 mg de polvo/kg, por vía intragástrica, separadas 24 horas, con sacrificio 24 horas después de la última aplicación.²⁵ En el resultado no se encontró efecto genotóxico con ninguna de las

cepas en el ensayo de *Salmonella*/microsomas y el extracto no causó un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en los ratones tratados y no mostró relación dosis respuesta positiva. En conclusión el polvo no reveló efecto genotóxico en las condiciones experimentales de este estudio.²⁵

En otro estudio realizado por la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, titulado “Estudio integral de plantas biocidas del algodónero” el estudio se realizó con el fin de sustituir los insecticidas químicos usados en el cultivo del algodónero por sustancias inócuas que permitan un manejo integrado de plagas con fundamento ecológico, se investigaron y colectaron 40 especies vegetales con propiedades biocidas, las que fueron clasificadas taxonómicamente en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Entre las especies estudiadas se encontraba *Datura stramonium* L., al realizar el Screening fitoquímico se determinó la presencia de alcaloides y taninos.²⁶ Para realizar el estudio se utilizó las cortezas y hojas de estas especies, del cual se obtuvieron extractos acuosos liofilizados que fueron evaluados en su composición química, perfiles cromatográfico y espectrofotométrico UV/Visible; bioactividad frente a los nauplios de *Artemia salina* y bioensayos a nivel de laboratorio y de campo. Entre las plagas investigadas figuran: *Aphis gossypii*, *Bemisia tabaco* y *Dysdercus peruvianus*. Los extractos de *Lonchocarpus nicou*, *Agave americana* L., *Hura crepitans* y *Chrysochlamys grandifolia*, *Datura stramonium* L. mostraron resultados significativos tanto a nivel de laboratorio como en los cultivos de algodónero en el campo.²⁶

En otro estudio realizado por el Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), Universidad de Sonora. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el uso del extracto metanólico de *Datura stramonium* L. como una alternativa para el control de *Ramularia cercosporelloides*. Se evaluó el efecto del extracto metanólico sobre la cinética de crecimiento radial del hongo, determinando la concentración requerida para retardar la extensión radial en un 50% (CR₅₀) y se cuantificó la producción de biomasa. Además, se evaluó la germinación de semilla de cártamo tratada con el extracto metanólico de *Datura stramonium* L. El extracto metanólico al 10% (v/v) inhibió en 75.0% el crecimiento radial de *Ramularia* a las 96 horas de incubación en medio v8, y 32.0% al utilizar la CR₅₀ (3.0% v/v). El extracto metanólico no afectó la producción de biomasa con respecto al control metanólico. En germinación de semilla, se observó que la

aplicación con el extracto metanólico no protegió contra la invasión de *Ramularia*. Sin embargo, las semillas germinaron y la plántula se desarrolló normalmente.²⁷ En otro estudio realizado por el Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, se determinó el efecto antifúngico del extracto etanólico de *Datura stramonium* L “chamico” sobre *Fusarium oxysporum* y *Stemphylium vesicarium*, hongos productores de enfermedades en *Asparagus officinalis* “espárrago” procedente del distrito Moche, provincia de Trujillo, en el período comprendido entre Enero a Noviembre de 2012.²⁸ Se realizaron aislamientos, monocultivos y microcultivos de las especies patógenas en medios de cultivo Agar Sabouraud Dextrosa y Agar Lima Bean para efectuar observaciones macro y microscópicas de las estructuras fúngicas, previa coloración con Azul de Amann. Posteriormente, se colectaron plantas silvestres de *Datura stramonium* L. “chamico”, y se procedió a obtener e investigar el efecto antifúngico del extracto de *Datura stramonium* L. sobre los hongos patógenos del “espárrago”, a concentraciones de 5, 10, 15%. El extracto etanólico de “chamico”, demostró efecto antifúngico (control biológico) sobre *Fusarium oxysporum* y *Stemphylium Vesicarium*.²⁸

2.2 Marco conceptual

2.2.1 *Datura stramonium* L. “chamico”.

2.2.1.1 Clasificación Taxonómica

La determinación botánica se realizó según el sistema de clasificación de Cronquist A 1988 a cargo de la Blga. Laura Aucasime Medina (Anexo 1), de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga:

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Sub Clase	: Asteridae
Orden	: Solanales
Familia	: Solanaceae
Género	: Datura
Especie	: <i>Datura stramonium</i> L.
Nombre Vulgar	: “chamico”

2.2.1.2 Nombres vernaculares

Estramonio, chamico, berenjena del diablo, higuera loca, higuera del infierno, flor de trompeta, hierba hedionda, friegaplatos, toloache, floripón, burladora, hierba del diablo, entre otros.

2.2.1.3 Descripción botánica

Es una planta herbácea anual mide hasta 1 metro de alto, de tallos erguidos dicotómicamente ramificado y lisos, hojas simples, alternas, pecioladas ovaladas, con el ápice agudo y bordes sinuosos, con los nervios pronunciados en el envés, presenta un olor desagradable; flores grandes blancas o ligeramente azuladas heteroclamídeas bisexuales y tubulares. Cáliz y corola formada por 5 piezas soldadas, 5 estambres libres, ovario súpero, tetra carpelar, con 2 lóculos y conteniendo muchos óvulos, de placentación parietal, fruto cápsula de dehiscencia valvar provista de espinas. Las semillas negruzcas de forma arriñonada. (Anexo 2)



Figura 1: *Datura stramonium* L. "chamico".

2.2.1.4 Hábitat y distribución

Es una especie introducida, crece al estado silvestre como malezas en los campos de cultivo, terrenos secos y abandonados es propia de climas templados y cálidos hasta los 3 000 msnm. Se propaga mediante semillas. (Anexo 2)

2.2.1.5 Composición química

El estramonio destaca por su contenido en alcaloides (del 0,25 al 0,7% del peso en fresco de las hojas), de los cuales contiene alrededor de sesenta y siete, todos ellos tropánicos,²⁹ destacando tres: atropina, hiosciamina y escopolamina

(hioscina),^{30, 31, 32} pues son los que presentan una mayor toxicidad, siendo la hiosciamina la más activa y tóxica.^{33, 34} Los alcaloides se empiezan a sintetizar a las dos semanas de la germinación y la concentración de alcaloides en las semillas varía según las condiciones ambientales y la estación, siendo mayor en Verano,^{34, 35} aunque su consumo es mayor en otoño.^{32, 36} Durante el día los niveles disminuyen y aumentan por la noche; también descienden tras un período de lluvias.³⁷

En un estudio realizado se determinó la composición química de la *Datura stramonium* L, se ha comprobado la presencia de al menos 40 compuestos químicos, en la que se destacan los alcaloides. Las semillas tienen 0.4 a 0.7% de alcaloides constituido por hiosciamina, bajo porcentaje de escopolamina, trazos de atropina y 15-20% de aceites. Las raíces contienen escopolamina, hiosciamina y esteroides ditigloicos. En las hojas predominan la escopolamina en un 0.5%, hay trazos de hiosciamina y atropina. Los tallos jóvenes, los rabillos de las hojas y la nervadura de las mismas contienen mayores cantidades de alcaloides que el parénquima foliar. Toda la planta contiene hasta 0.25% de alcaloides derivados de tropano. El principal componente es la escopolamina: las hojas contienen 0.25%, las semillas 0.12%, los tallos 0.05% y las raíces 0.1%. La hiosciamina se encuentra 0.4% en hojas, en tallos 0.2% y en raíces 0.1%.^{38, 39} La hiosciamina predomina en las hojas adultas, mientras la escopolamina en las hojas tiernas.⁴⁰ En un trabajo de investigación titulado “Estudio de la actividad sobre el sistema nervioso central de especies vegetales procedentes de la flora egipcia” presentado por Dr. Tarek Ahmed Fahmi Abdelaziz Eissa, se determinó la presencia de alcaloides tropánicos (hiosciamina y escopolamina). Contiene también saponinas, flavonoides y sales minerales.^{34, 41}

2.2.2 Toxicidad y genotoxicidad

2.2.2.1 Toxicidad

La toxicidad es la capacidad de una sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él.⁴² 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).⁴²

2.2.2.2 Genotoxicidad

La genotoxicidad es la capacidad relativa para causar daño al material genético por agentes físicos, químicos o biológicos.⁴³ 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.⁴³ Ejemplos de esto último son las proteínas que intervienen en la reparación, condensación y descondensación del ADN en los cromosomas, u otras estructuras como el huso mitótico, responsable de la distribución de los cromosomas durante la división celular. Este daño puede ser de tipo mutágeno o carcinógeno.^{43, 44}

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 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.^{44, 45}

La genotoxicidad de los agentes químicos es una característica intrínseca, basada en el potencial electrofílico del agente para unirse a los campos nucleofílicos de macromoléculas presentes en las células tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN), el portador de la información hereditaria.⁴⁵

2.2.2.3 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.⁴⁴

Los mutágenos y carcinógenos genotóxicos son compuestos electrofílicos muy reactivos y con gran afinidad por el ADN,⁴⁵ 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 nucleótidos⁴⁶ debidos a:

- Sustituciones en las bases: purinas por otras purinas, pirimidinas por otras pirimidinas o purinas por pirimidinas o viceversa.⁴⁷

- 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.^{47, 48}
- 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.⁴⁸

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.⁴⁸ 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.⁴⁷
- Reparación del daño en la molécula de ADN evitándose la mutación.⁴⁴

En cuanto a los carcinógenos genotóxicos, actúan como iniciadores del proceso de carcinogénesis.⁴⁷ Ésta comienza con una mutación en una sola célula pudiendo ser: a nivel del metabolismo del xenobiótico, haciendo que una sustancia procancerígena se convierta en cancerígena; en la reparación del ADN, dificultándola o impidiéndola; y/o estimulando la proliferación celular.^{48, 49} Este proceso se conoce como iniciación.⁴⁶

Suelen ser sustancias químicas, como compuestos alquilantes (mostazas nitrogenadas), especies reactivas de oxígeno, aflatoxinas, productos de combustión, nitrosaminas, etc.⁴⁹ Su mecanismo de acción está basado en la formación de enlaces covalentes con el nitrógeno 7 de la guanina (aducto),⁴⁹ 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.⁴⁵
- Presentan una correlación estructura-actividad, pudiéndose detectar mediante ensayos experimentales.^{47, 49}

- 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.⁴⁹

2.2.2.4 Evaluación de la genotoxicidad

Los ensayos de genotoxicidad están diseñados para detectar compuestos que inducen de manera directa o indirecta daño en el material genético por diferentes mecanismos, siendo un requisito fundamental la evaluación mutagénica para la caracterización toxicológica de un producto químico.⁴⁹ El estudio de las mutaciones genéticas se lleva a cabo mediante diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*, de complejidad variable, según el mecanismo biológico que vayamos a analizar.⁴⁹

2.2.2.4.1 Ensayos *in vitro*

Se emplean para tratar de establecer la potencia de un compuesto para provocar un efecto mutagénico, el cual habría que tratar de confirmarlo mediante ensayos *in vivo*.⁴⁵ Algunos de los principales ensayos utilizados son:

- Test de Ames (OCDE GT 471): es el ensayo de reversión de la mutación en *Salmonella typhimurium*, que tiene que hacerse tanto en presencia como en ausencia de un activador metabólico. Si el compuesto es mutagénico, la célula puede sintetizar histidina y crecer en un medio deficiente en histidina.⁴⁹ Existen adaptaciones del test de Ames para *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.^{43, 46}
- Ensayo de aberraciones cromosómicas en mamíferos (OCDE GT 473): tiene por objeto detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas estructurales en células de mamífero en cultivo. Se exponen los cultivos celulares a la sustancia de ensayo, con y sin activación metabólica, tras lo cual se tratan a intervalos preestablecidos con una sustancia que detenga la división celular en la metafase. Se recolectan las células, se tiñen y se observan al microscopio aquéllas que se encuentren en la metafase con el fin de detectar la presencia de aberraciones cromosómicas.⁵⁰
- Ensayo Cometa o técnica de electroforesis unicelular. La prueba del cometa es una herramienta muy útil para detectar el efecto genotóxico inducido por agentes químicos, físicos o biológicos, sobre las células de un ser vivo. Se basa en una electroforesis en gel de células individuales que permite cuantificar de forma sensible y rápida el daño en el ADN celular.⁵¹ Las células

con un incremento en su ADN dañado presentan una mayor migración del ADN hacia el ánodo o bien, una mayor intensidad de fluorescencia con respecto a las células normales.^{9,10, 11, 51}

2.2.2.4.2 Ensayos *in vivo*

Se emplean para investigar el daño citogenético.

- El ensayo de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos (OCDE GT 474) tiene por objeto determinar las sustancias que ocasionan lesiones citogenéticas que dan lugar a la formación de micronúcleos con fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros, que por un agente externo, van a quedar fuera del núcleo durante la mitosis. Se exponen los animales a la sustancia de ensayo por una vía adecuada, trabajando además con un grupo control.^{49, 52} Si se utiliza médula ósea, se sacrifican los animales a intervalos apropiados tras el tratamiento, se extrae la médula ósea, se preparan los portaobjetos y se tiñen. Si se emplea sangre periférica, se extrae a intervalos apropiados tras el tratamiento, se preparan frotis y se tiñen. En los estudios con sangre periférica las células deben recolectarse lo antes posible después de la última exposición. Se analizan las preparaciones para detectar la presencia de micronúcleos.^{49,52}
- El ensayo citogenético *in vivo* (OCDE GT 475), es un ensayo de mutagenicidad a corto plazo, de gran sensibilidad, útil para detectar fundamentalmente aberraciones cromosómicas estructurales en condiciones que involucran la respuesta *in vivo*, y que pueden variar según la especie y el tejido. Generalmente se evalúan durante la primera mitosis consecutiva al tratamiento. Con los mutágenos químicos, la mayor parte de las aberraciones inducidas son de tipo cromatídico.⁵² En este método, se utilizan células de médula ósea de mamíferos expuestos, por vías apropiadas, a las sustancias de ensayo y sacrificados a intervalos sucesivos. El tejido diana es la médula ósea por estar más vascularizado y por contener una población de células de ciclo muy corto las cuales pueden aislarse y tratarse con facilidad.^{50, 52}

2.2.3 Ensayo cometa

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.⁵³

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 1984⁵⁴ y luego reformada por Singh *et al.* En 1988,⁵⁵ sin embargo actualmente, se han dado a conocer distintas modificaciones a la técnica dependiendo de los intereses de estudio de algunos grupos de investigación.^{56, 57}

2.2.3.1 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.^{58, 59, 60} 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. 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.⁶¹ 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.^{62, 63}

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.⁶³

2.2.3.2 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.⁶⁴ 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.⁶⁴

2.2.3.3 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.⁶⁵ 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.^{60, 66} Así mismo en el área clínica, se han adelantado estudios de Farmacovigilancia de distintas drogas;⁶² de genotoxicidad de productos químicos de los que hacen parte incluso el empleo de determinados tipos de resina en la salud oral;^{67, 68} y estudios sobre mutágenos de línea germinal.^{69, 70}

2.2.4 Ácidos nucleicos

Los Ácidos Nucleicos son las biomoléculas portadoras de la información genética. Son biopolímeros, de elevado peso molecular, formados por otras subunidades estructurales o monómeros, denominados Nucleótidos. Desde el punto de vista químico, los ácidos nucleicos son macromoléculas formadas por polímeros lineales de nucleótidos, unidos por enlaces éster de fosfato, sin periodicidad aparente. De acuerdo a la composición química, los ácidos nucleicos se clasifican en Ácido Desoxirribonucleico (ADN) que se encuentran residiendo en el núcleo celular y algunos organelos, y en Ácido Ribonucleico (ARN) que actúan en el citoplasma.⁷¹ El descubrimiento de los ácidos nucleicos se debe a Johann

Friedrich Miescher, que en el año 1869 aisló los núcleos de las células una sustancia ácida a la que llamó nucleína,⁷² nombre que posteriormente se cambió a ácido nucleico. Posteriormente, en 1953, James Watson y Francis Crick descubrieron la estructura del ADN, empleando la técnica de difracción de rayos X.

2.2.4.1 Estructura de los ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son biopolímeros formados a partir de unidades llamadas monómeros, que son los nucleótidos. Durante los años 20, el bioquímico Levene analizó los componentes del ADN. Encontró que los nucleótidos se forman a partir de la unión de: una pentosa, una base nitrogenada y ácido fosfórico.⁷³

- Pentosa: D-ribosa en el ARN o D-2- desoxirribosa en el ADN.
- Base nitrogenada:
 - Púrica: Guanina (G) y Adenina (A).
 - Pirimidínica: Timina (T), Citosina (C) y Uracilo (U).
- Ácido fosfórico: En la cadena de ácido nucleico une dos pentosas a través de una unión fosfodiéster. Esta unión se produce entre el C-3' de una pentosa, con el C-5' de la siguiente.⁷³

2.2.4.1.1 Azúcar pentosa

Las pentosas son monosacáridos (glúcidos simples) formados por una cadena de cinco átomos de carbono que cumplen una función estructural. Como los demás monosacáridos aparecen en su estructura grupos hidroxilo (OH). Además, también pueden llevar grupos cetónicos o aldehídicos.

Las pentosas que forman los nucleótidos son tipo aldopentosas (contienen grupo aldehído), Una de las más importantes es la ribosa, la cual hace parte de los nucleótidos que forman el ARN. A partir de la ribosa se puede obtener la desoxirribosa, la cual forma parte del ADN.⁷³

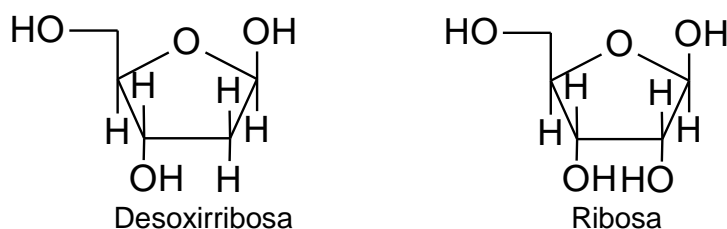


Figura 2. Estructura química de las aldopentosas.

2.2.4.1.2 Base nitrogenada

Son compuestos orgánicos cíclicos, que incluyen dos o más átomos de nitrógeno y son la parte fundamental de los ácidos nucleicos.⁷⁴ Biológicamente existen cinco bases nitrogenadas principales, que se clasifican en dos grupos:

2.2.4.1.2.1 Bases Purínicas. Derivadas de la estructura de las Purinas (con dos anillos): la Guanina (G) y la Adenina (A). Ambas bases se encuentran tanto en el ADN como el ARN.⁷⁴

2.2.4.1.2.2 Bases Pirimidínicas. Derivadas de la estructura de las Pirimidinas (con un anillo): la Timina (T), Citosina (C) y Uracilo (U). La timina sólo se encuentra en la molécula de ADN, el uracilo sólo en la de ARN y la citosina, en ambos tipos de macromoléculas.⁷⁴

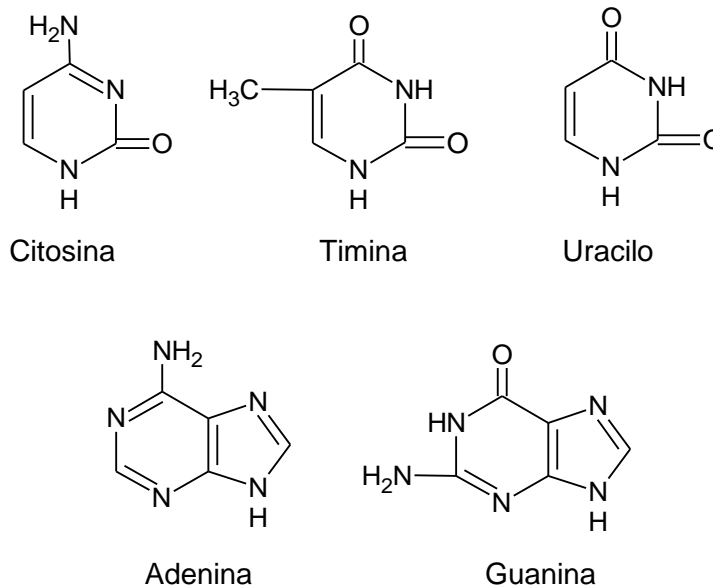


Figura 3. Estructura química de las bases nitrogenadas.

2.2.4.1.3 Ácido fosfórico

Es un compuesto ternario que pertenece a la categoría de los oxácidos) de fórmula H_3PO_4 .⁷⁴

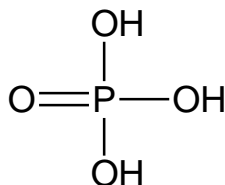


Figura 4. Estructura química del ácido fosfórico.

Finalmente la unión de estas tres moléculas citadas anteriormente da como resultado a un nucleótido.

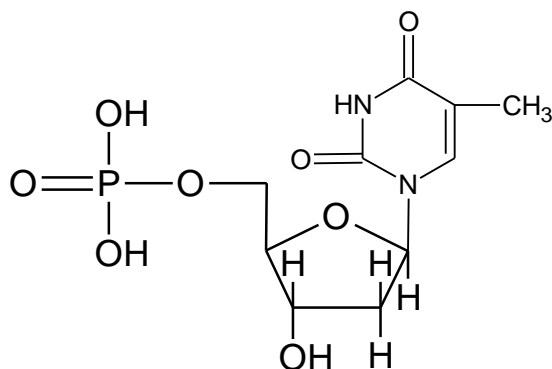


Figura 5. Estructura química de un nucleótido.

2.2.4.2 Importancia de los ácidos nucleicos

Todos los organismos poseen estas biomoléculas que dirigen y controlan la síntesis de sus proteínas, proporcionando la información que determina su especificidad y características biológicas, ya que contienen las instrucciones necesarias para realizar los procesos vitales y son las responsables de todas las funciones básicas en el organismo.⁷⁴

2.2.4.3 Ácido desoxirribonucleico (DNA o ADN)

El DNA es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos y algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria. La función principal de la molécula de ADN es el almacenamiento a largo plazo de información. Muchas veces, el ADN es comparado con un plano o una receta, o un código, ya que contiene las instrucciones necesarias para construir otros componentes de las células, como las proteínas y las moléculas de ARN. Los segmentos de ADN que llevan esta información genética son llamados genes.⁷⁴

Desde el punto de vista químico, el ADN es un polímero de nucleótidos, es decir, un polinucleótido. Un polímero es un compuesto formado por muchas unidades simples conectadas entre sí, como si fuera un largo tren formado por vagones. En el ADN, cada vagón es un nucleótido, y cada nucleótido, a su vez, está formado por un azúcar (la desoxirribosa), una base nitrogenada (que puede ser Adenina A, Timina T, Citosina C o Guanina G) y un grupo fosfato que actúa como enganche de cada vagón con el siguiente. Lo que distingue a un vagón (nucleótido) de otro es, entonces, la base nitrogenada, y por ello la secuencia del ADN se especifica nombrando solo la secuencia de sus bases.^{73, 74}

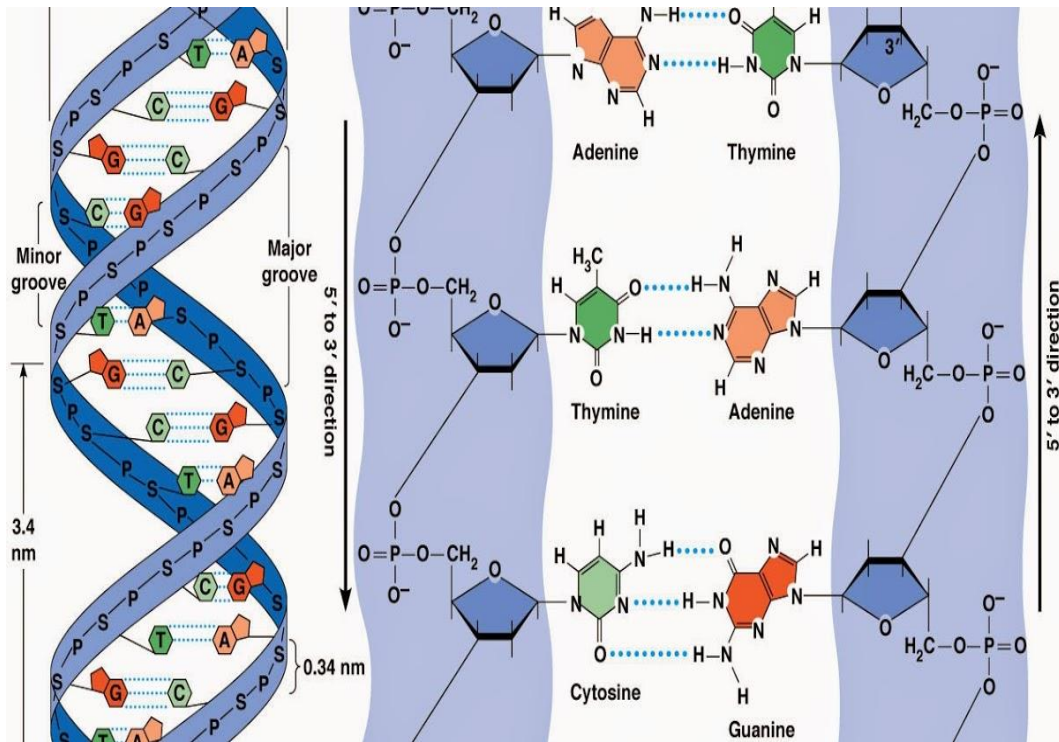


Figura 6. Estructura química del ADN.⁷⁴

2.2.4.4 Ácido ribonucleico (RNA o ARN)

Es un ácido nucleico formado por una cadena de ribonucleótidos. Está presente tanto en las células procariontas como en las eucariotas, y es el único material genético de ciertos virus (virus ARN). El ARN celular es lineal y monocatenaria (de una sola cadena), pero en el genoma de algunos virus es de doble hebra.⁷⁵

En los organismos celulares desempeña diversas funciones. Es la molécula que dirige las etapas intermedias de la síntesis proteica; el ADN no puede actuar solo, y se vale del ARN para transferir esta información vital durante la síntesis de proteínas (producción de las proteínas que necesita la célula para sus actividades y su desarrollo). Varios tipos de ARN regulan la expresión génica, mientras que otros tienen actividad catalítica.⁷⁶

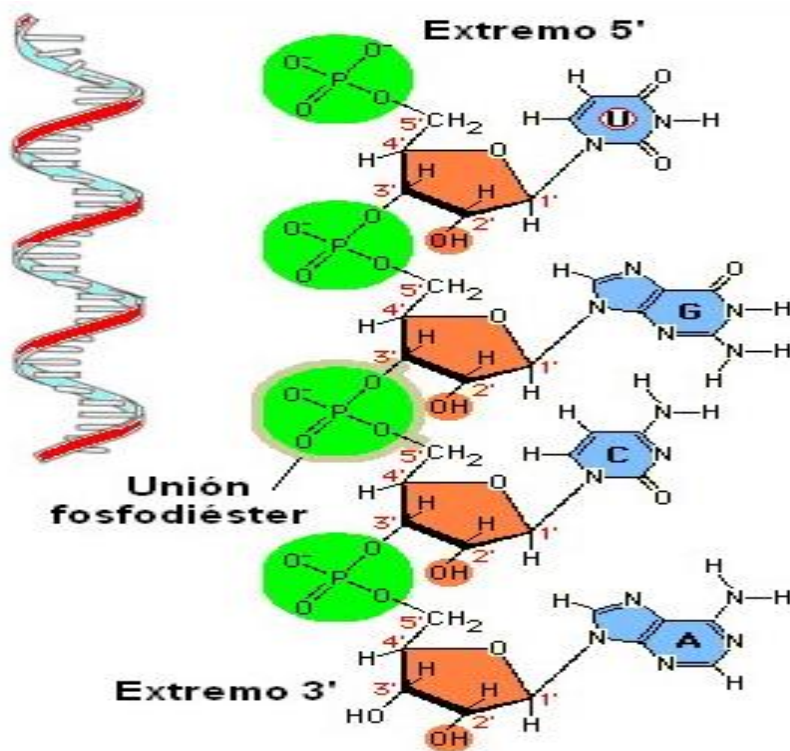


Figura 7. Estructura química del ARN.⁷⁵

2.2.4.5 Tipos de ARN

2.2.4.5.1 ARN mensajero (ARNm o RNAm)

lleva la información sobre la secuencia de aminoácidos de la proteína desde el ADN, lugar en que está inscrita, hasta el ribosoma, lugar en que se sintetizan las proteínas de la célula.^{76, 77}

2.2.4.5.2 ARN de transferencia (ARNt o tRNA)

Son cortos polímeros de unos 80 nucleótidos que transfiere un aminoácido específico al polipéptido en crecimiento; se unen a lugares específicos del ribosoma durante la traducción. Tienen un sitio específico para la fijación del aminoácido (extremo 3') y un anticodón formado por un triplete de nucleótidos que se une al codón complementario del ARNm mediante puentes de hidrógeno.⁷⁷

2.2.4.5.3 ARN ribosómico o ribosomal (ARNr o RNAr)

Los ARN ribosómicos son el componente catalítico de los ribosomas, se encargan de crear los enlaces peptídicos entre los aminoácidos del polipéptido en formación durante la síntesis de proteínas.^{77, 78}

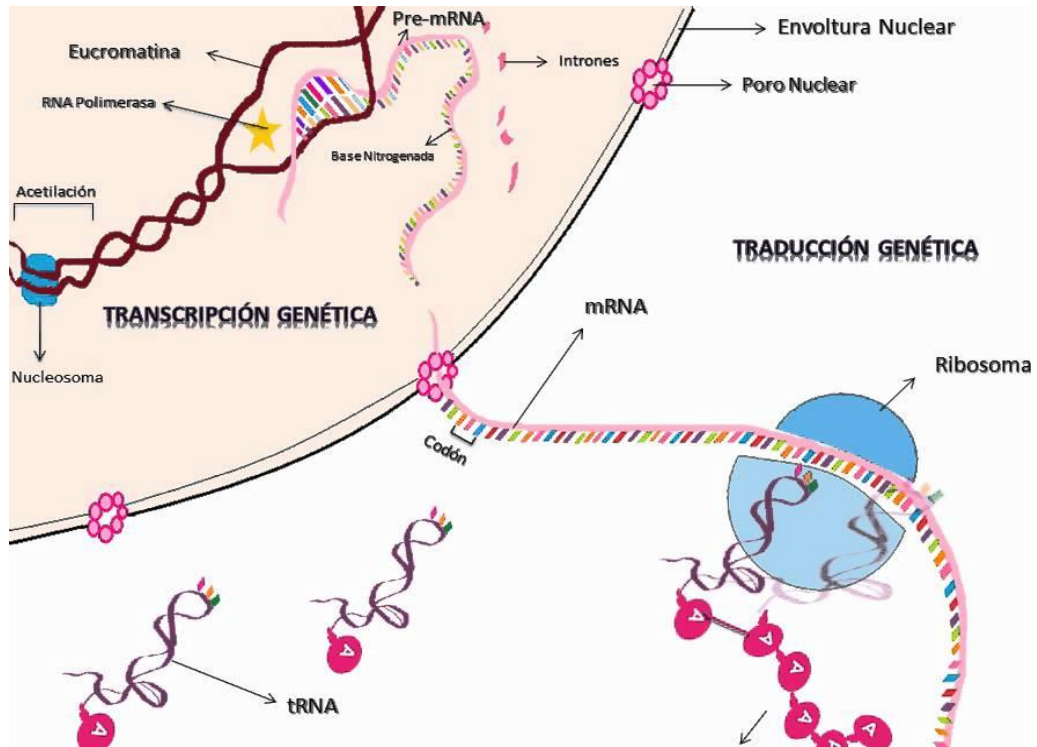


Figura 8. Proceso de síntesis de proteína.

2.2.5 Extracción de ADN de sangre total

Generalmente es deseable que la obtención de la muestra de ADN no cause ningún tipo de daño a la persona y que sea fácil y rápidamente obtenible. Estos requisitos se cumplen en las muestras de sangre. Existen innumerables métodos que permiten obtener ADN a partir de sangre entera, estos difieren en la pureza y cantidad de muestra necesaria para realizar una extracción.

La sangre se compone de varios tipos celulares, los más importantes son los glóbulos rojos y los glóbulos blancos. Los primeros carecen de núcleo pues lo pierden durante su maduración, por lo tanto no poseen ADN. Los glóbulos blancos, en cambio, poseen núcleo y por tanto ADN. Entonces para obtener ADN a partir de muestras de sangre sólo son necesarios los leucocitos. Si bien, en un principio se purificaban primero los glóbulos blancos para luego extraer ADN a partir de ellos, el posterior avance de la técnica permite hoy en día extraer ADN a partir de sangre entera con la misma pureza, sumando rapidez y sencillez.⁷⁹

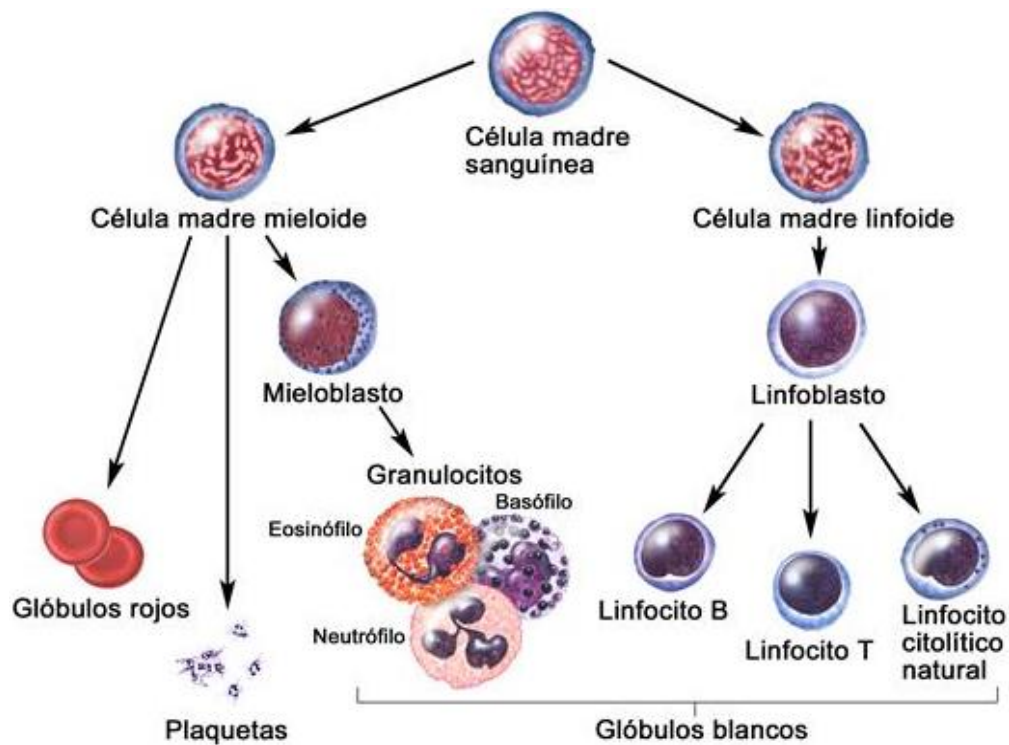



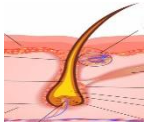






Figura 9. Esquema de síntesis de células sanguíneas.

2.2.6 Fuentes de obtención de ADN

La obtención de ADN de una persona es necesaria para realizar innumerables análisis que permiten caracterizar el genotipo de dicha persona. Ya que la mayoría de las células de cuerpo humano poseen una copia completa de ADN se puede utilizar tejido de cualquier origen⁷⁹ (ver la siguiente tabla).

Tabla 1. Fuentes de obtención del ADN genómico.⁷⁹

Fuente	ADN
	<p>La sangre es una fuente excelente de ADN. Éste está presente en los glóbulos blancos (o leucocitos), pero no en los glóbulos rojos humanos (eritrocitos o hematíes), pues éstos carecen de núcleo. Una mancha de sangre del tamaño de una moneda pequeña, correspondiente a unos 50 microlitros, tiene suficiente ADN para un análisis.</p>
	<p>El ADN de la cabeza de los espermatozoides es habitualmente la fuente más importante de ADN como prueba del delito en casos de ataque sexual. Cinco microlitros de semen contienen aproximadamente la misma cantidad de ADN que 50 de sangre. Para liberar el ADN de las cabezas de los espermatozoides se requieren métodos de extracción especiales. En consecuencia, en las muestras de ataque sexual se puede extraer de forma diferencial: la primera extracción proporciona principalmente el ADN de células epiteliales de la víctima, mientras que la segunda extracción rinde principalmente ADN del semen.</p>
	<p>La saliva contiene material celular. Se puede extraer ADN, para su análisis, a partir de marcas de mordisco, colillas de cigarrillo, sellos de correo pegados en el sobre o cierres engomados de sobre.</p>
	<p>El folículo capilar de la base del cabello humano contiene material celular rico en ADN. Para poderlo usar en análisis de ADN, el cabello debe haber sido arrancado (los cabellos que caen por rotura no contienen ADN).</p>
	<p>Cualquier tejido del cuerpo que no se haya degradado es una fuente potencial de ADN.</p>
	<p>El hueso es una de las mejores fuentes de ADN a partir de restos humanos descompuestos. Incluso cuando la carne se ha descompuesto, a menudo se puede obtener ADN del hueso desmineralizado. Se ha usado ADN de hueso para identificar los huesos repatriados de soldados de los tiempos de la guerra de Vietnam y los restos de la familia rusa Romanov, que fue ejecutada durante la revolución bolchevique.</p>
	<p>Al igual que los huesos, los dientes pueden ser también una fuente excelente de ADN, mucho después de que el resto del cuerpo se haya descompuesto.</p>
	<p>La orina no contiene por sí misma ADN, pero puede contener células epiteliales, que sí tienen ADN. Sin embargo, la mayoría de personas sanas no excretan células epiteliales en su orina.</p>

2.2.7 ADN genómico

El ADN genómico es el DNA cromosómico nuclear, que ha sido aislado directamente de células o tejidos

2.2.8 Extracto Hidroalcohólico

Los Extractos Hidroalcohólicos son extractos líquidos concentrados, obtenidos de la extracción de una planta o parte de ella, utilizando como solvente alcohol y agua mediante la maceración. Presentan sedimento, color y aroma característicos de la planta de la cual se obtiene.⁸⁰

2.2.9 Electroforesis en gel

La electroforesis es la aplicación de las técnicas de separación de macromoléculas en un campo eléctrico en función de su tamaño y carga eléctrica superficial, se define como el método de separación de sustancias cargadas al aplicar un campo eléctrico, de modo que se diferencian en el comportamiento en un campo eléctrico. Aquellas partículas cargadas positivamente (cationes) migraran hacia el cátodo y las cargadas negativamente (aniones) hacia el ánodo.⁸¹ Entre las macromoléculas, las más utilizadas son las proteínas seguidas de los ácidos nucleicos, ya que ambos tipos presentan una carga importante, algo que no presentan los lípidos, sin contar con que son insolubles. El método consiste en inmovilizar las muestras en estudio en un material gelatinoso (gel). El gel se somete a una corriente eléctrica durante un período de tiempo determinado. Cada muestra comenzará a migrar a través de los poros del gel con una velocidad diferencial, que dependerá de la carga eléctrica y del tamaño molecular. Cuando las separaciones se han completado se interrumpe el paso de corriente y las muestras separadas se tiñen para visualizarse. Cada muestra se encontrará a una distancia distinta respecto al origen. Los ácidos nucleicos presentan carga y son solubles ya que tienen un grupo fosfato, parte que confiere la carga, y está presente de forma regular en la estructura. Los ácidos nucleicos tienen la capacidad de migrar en un campo eléctrico y por tanto, son susceptibles de ser separados por electroforesis.⁸¹ El gel se encuentra sumergido en un electrolito tamponado con tris-Borato (no glicina), para garantizar que los ácidos nucleicos estén cargados negativamente; por esto a la técnica se le denomina electroforesis de inmersión. Las moléculas migrarán hacia el polo positivo, de modo que viajarán en esa dirección por el gel, separándose por tamaño (Nº de nucleótidos), a la hora de cargar la muestra se colocan unos marcadores de frente (loading) 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.⁸¹

2.2.10 Espectrofotometría

La capacidad que tiene el ADN de absorber luz a una determinada longitud de onda (260 nm) permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico de la muestra. Si la densidad óptica (OD) es 1, corresponde a aproximadamente 50 µg/ml de cadena doble de ADN, entonces calculamos la concentración de ADN que tenemos en nuestras muestras, midiendo simplemente su absorbancia, sin necesidad de realizar una curva patrón.⁸² Las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 (principalmente por residuos de triptófano), así las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existen algún contaminante proteico. El cálculo de una relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm es una manera común para hacer un estimado de la pureza o evaluar la contaminación de una preparación de ADN con proteínas de ácido nucleico, esta relación debe estar entre los valores de 1,8 y 2,0. Si la muestra es pura, el primer método comúnmente usado para la a espectrofotometría.⁸²

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo entre los meses de setiembre de 2016 a mayo de 2017, la identificación y descripción botánica fue realizada por la Blga Laura Aucasime (Anexo 1 y 2); la obtención del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico” y ensayos fitoquímicos en el laboratorio de Farmacognosia de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; la obtención de ADN de linfocitos humano y los ensayos de genotoxicidad se realizaron en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

Datura stramonium L. “chamico”, que crece en los diferentes pisos ecológicos de la ciudad de Ayacucho.

3.2.2 Muestra

Dos kilogramos de hojas frescas de *Datura stramonium* L. “chamico”.

Las muestras fueron recolectadas en la Ciudad Universitaria de la U.N.S.C.H. de la ciudad de Ayacucho; luego fueron transportadas al Laboratorio de Farmacognosia, donde se dejaron secar al medio ambiente separando aquellas que cambien de color o muestren signos de alteración.

3.2.3 Muestreo

El muestreo se realizó por conveniencia (muestreo no probabilístico).

3.3 Unidad experimental

ADN de linfocitos humano a 1500 ng/ μ L por ensayo.

3.4 Metodología y recolección de datos

3.4.1 Recolección de la muestra

Las muestras fueron recolectadas en la Ciudad Universitaria de la U.N.S.C.H. de la ciudad de Ayacucho, luego se transportó al Laboratorio de Farmacognosia, para su secado correspondiente a temperatura ambiente separando aquellas que cambiaron de color o muestren signos de alteración.

3.4.2 Desecación de la muestra

Las hojas se dejaron secar a temperatura ambiente, previa limpieza de los mismos, bajo sombra previamente acondicionada teniendo como base el papel Kraft que se cambió constantemente y volteando las hojas para un secado uniforme y evitando el deterioro por la humedad. (Anexo 5)

3.4.3 Molienda

Las muestras secas fueron trituradas empleando un mortero con la finalidad de reducir hasta un polvo fino. (Anexo 5).

3.4.4 Obtención del extracto hidroalcohólico

Se pesó 100 g de muestra seca y pulverizada, luego se maceró en un frasco de vidrio color ámbar por 7 días, para ello se utilizó etanol y agua destilada (3:1) hasta cubrir la muestra por 1 cm de diferencia. Durante el proceso se agitó el frasco durante 15 minutos dos veces al día durante los 7 días de la maceración para que el etanol se distribuya homogéneamente en la muestra. La muestra en maceración se conservó en un lugar fresco y oscuro. Luego se procedió a filtrar con ayuda de una bomba al vacío y papel filtro, finalmente se llevó a un evaporador rotatorio BUCHI-3000 a presión reducida y luego se concentró a sequedad en una estufa MEMMERT, a partir de las cuales se realizó la determinación cualitativa y también se prepararon las diferentes concentraciones para el efecto genotóxico. (Anexo 6 y 7)

3.4.5 Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”

Se realizó una identificación fitoquímica cualitativa al extracto obtenido de la planta medicinal en estudio, para determinar la presencia de los metabolitos secundarios tales como: alcaloides y taninos. Las reacciones de identificación se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Miranda y Cuellar en el año 2000.⁸⁰ (Anexo 8).

3.4.6 Extracción de ADN genómico a partir de linfocitos humano

Se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática, contando con una unidad de bolsa colectora de sangre “cuádruple” fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos (para el desecho); la misma que se

consiguió por donación del Banco de Sangre del Hospital Regional de Ayacucho “Miguel Ángel Mariscal Llerena”, que se utilizó para la obtención del ADN de linfocitos con el protocolo descrito en Miranda.¹⁴ (Anexo 9)

3.4.6.1 Procedimiento

- Transferir 1 ml de sangre de un tubo de centrifuga con tapa y adicionar 9 ml del tampón Tris– HCl 50 mM (pH 7.7).precalentado a 37 °C.
- Homogenizar e incubar a 37 °C por 30 minutos, centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos para sedimentar los linfocitos.
- Descartar el sobrenadante aspirándolo con una pipeta Pasteur dejando 1 ml del centrifugado en la parte inferior del tubo.
- Repetir los procedimientos 3 (esta vez con 5 ml de tampón Tris – HCl 50 mM (pH 7.7), 4 y 5 hasta tener un preparado claro.
- Adicionar 1 ml de centrifugado, 9 ml de solución salina (NaCl al 0.85%) homogenizar y centrifugar a 2500 rpm/ 10 minutos.
- Aspirar y descartar el sobrenadante dejando solo el sedimento, resuspender el sedimento en 0.5 ml de la solución HIGH TE (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 100 mM). Resuspender el sedimento y transferirlo a un tubo de microcentrifuga de 2 ml
- Adicionar 0.5 ml de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 40 mM; SDS al 1%; NaCl 10 mM).precalentada a 50 °C.
- Adicionar 10 µL de la solución de proteinasa K (20 mg/ml) e incubar por una noche a 53 °C.
- Adicionar 1 ml de la solución Fenol saturado con Tris: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1). Y homogenizar por inversión delicadamente durante 10 minutos.
- Centrifugar en la microcentrifuga por 10 minutos para separar las fases, luego aspirar la fase superior acuosa que contiene el DNA y transferirla a un tubo nuevo de microcentrifuga de 2 ml.
- Adicionar a la fase acuosa 1 ml de la solución de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1) y homogenizar por inversión durante 5 minutos. Centrifugar en la microcentrifuga por 10 minutos. Aspirar la fase acuosa que contiene el DNA y transferirla a un tubo nuevo de microcentrifuga de 2 ml.
- Repetir el procedimiento anterior hasta obtener una fase acuosa completamente clara.

- Adicionar la solución de Acetato de sodio 3 M, pH 5.2. en cantidad igual a 1/10 del volumen de la fase acuosa.
- Adicionar un volumen de alcohol isopropílico helado y dejar en reposo por 1 hora en hielo. Luego centrifugar en la microcentrífuga por 15 minutos.
- Eliminar cuidadosamente el sobrenadante y enjuagar el sedimento con 1 ml de etanol al 70%.
- Centrifugar en la microcentrífuga por 10 min. Eliminar el alcohol y dejar secar el sedimento a medio ambiente.
- Resuspender el sedimento con 300 ul de la solución low TE (Tris HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM. Guardar en la nevera.

3.4.7 Ensayo de genotoxicidad *in vitro*

Se desarrolló siguiendo los protocolos descritos en Miranda, 2013;¹⁴ con las siguientes fases:

3.4.7.1 Fase de cuantificación de ADN genómico de linfocitos humano

Se realizó una cuantificación por espectrofotometría UV en Eppendorf BioPhotometer plus del ADN de linfocito humano obtenido, se llevó esto a una concentración de 1500ng/ul en un volumen final de 150ul para la planta medicinal en estudio.

3.4.7.2 Fase de digestión de ADN genómico de linfocitos humano

3.4.7.2.1 Procedimiento

- Se preparó las soluciones de digestión de ADN genómico humano.

Tabla 2. Preparación de soluciones de digestión de ADN genómico humano para grupo 1 con las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico". Ayacucho 2016.

Condiciones		soluciones de digestión de ADN					
Nº de tubo		1	2	3	4	5	6
						Blanco	Control
ADN genómico extraído (µL)		14	14	14	14	-	14
Muestra	Concentración mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL	
	Volumen (µL)	6	6	6	6	20	-
H ₂ O _d (µL)		-	-	-	-	-	6
Volumen total (µL)		20	20	20	20	20	20
Incubación en baño maría a 37 °C		a 1 hora y 4 horas					

- Se realizó cuatro repeticiones de ensayo de genotoxicidad *in vitro*, de la planta medicinal en estudio.

Tabla 3. Preparación de soluciones de digestión de ADN genómico humano para grupo 2 con las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”. Ayacucho 2016.

Condiciones		soluciones de digestión de ADN					
Nº de tubo		1	2	3	4	5	6
						Blanco	Control
ADN genómico extraído (µL)		14	14	14	14	-	14
Muestra	Concentración mg/mL	200 mg/mL	300 mg/mL	400 mg/mL	500 mg/mL	500 mg/mL	
	Volumen (µL)	6	6	6	6	20	-
H ₂ O _d (µL)		-	-	-	-	-	6
Volumen total (µL)		20	20	20	20	20	20
Incubación en baño maría a 37 °C		a 1 hora y 4 horas					

- Se realizó cuatro repeticiones de ensayo de genotoxicidad *in vitro*, de la planta medicinal en estudio. (Anexo 10, 11 y 12)

3.4.7.3 Fase de electroforesis

3.4.7.3.1 Procedimiento

- Se preparó el gel de agarosa a 1.5% y se dispuso en una cámara de electroforesis Biometra.
- Para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa, se utilizó las siguientes cantidades:
1 µL de loading (colorante señalizador de migración de las bandas), 7 µL de la solución de digestión para la prueba de genotoxicidad *in vitro* y 2 µL de agua bidestilada estéril, obteniendo un volumen final de 10 µL, se mezcló y se cargó en el respectivo pozo del gel de agarosa para electroforesis. (Anexo 13)

Tabla 4. Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN de grupo 1 para el ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”. Ayacucho 2016.

Condiciones		soluciones para el ensayos de genotoxicidad <i>in vitro</i>					
Pocillos		1	2	3	4	5	6
Muestra	Concentración mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	Blanco	Control
	Volumen (µL)	7	7	7	7	7	7
H ₂ O _d (µL)		2	2	2	2	2	2
Loading (µL)		1	1	1	1	1	1
Volumen total (µL)		10	10	10	10	10	10

Tabla 5. Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN de grupo 2 para el ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”. Ayacucho 2016.

Condiciones		Mezclas para ensayos de genotoxicidad <i>in vitro</i>					
Pocillos		1	2	3	4	5	6
Muestra	Concentración mg/mL	200	300	400	500	Blanco	Control
	Volumen (µL)	7	7	7	7	7	7
H ₂ O _d (µL)		2	2	2	2	2	2
Loading (µL)		1	1	1	1	1	1
Volumen total (µL)		10	10	10	10	10	10

- Luego se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se programó a 40 voltios (V) por tres horas de corrida. (Anexo 13)

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 corriente dos veces y para visualizar las bandas y/o fragmentos de ADN productos de la genotoxicidad, se colocó el gel de agarosa en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra *UVsolo TS*. (Anexo 14 y 15)

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 Speit (1995) y Collins (2004), en tesis de Mónica Marisol Larrea Poma.⁸³

Tabla 6. Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.

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

Fuente: Larrea Poma M, 2007.⁸³

3.5 Tipo de investigación

Básico-experimental.

3.5.1 Diseño de investigación

Tabla 7. Diseño de investigación

Grupo	Tiempo de incubación	Tratamiento	Observación
G ₁	1 hora y 4 horas	control	O ₁
		blanco	O ₂
		5 mg/mL	O ₃
		10 mg/mL	O ₄
		50 mg/mL	O ₅
		100 mg/mL	O ₆
G ₂	1 hora y 4 horas	control	O ₇
		blanco	O ₈
		200 mg/mL	O ₉
		300 mg/mL	O ₁₀
		400 mg/mL	O ₁₁
		500 mg/mL	O ₁₂

3.6 Análisis de datos estadísticos

Los datos obtenidos fueron agrupados y presentados en tablas, expresado en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. El daño genotóxico se evaluó mediante el paquete estadístico SPSS versión 22, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis para muestras no paramétricas. El valor de $p < 0,05$ será considerado como el nivel estadísticamente significativo.⁸⁴

IV. RESULTADOS

Tabla 8. Identificación fitoquímica de los metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico". Ayacucho 2016.

Extracto hidroalcohólico	Reactivo	Metabolitos ensayados	Observación	Resultado
Muestra	FeCl ₃	Fenoles y/o taninos	Coloración azul tenue	+++
Muestra	Mayer	Alcaloides	Formación de precipitado	+++

Leyenda:

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

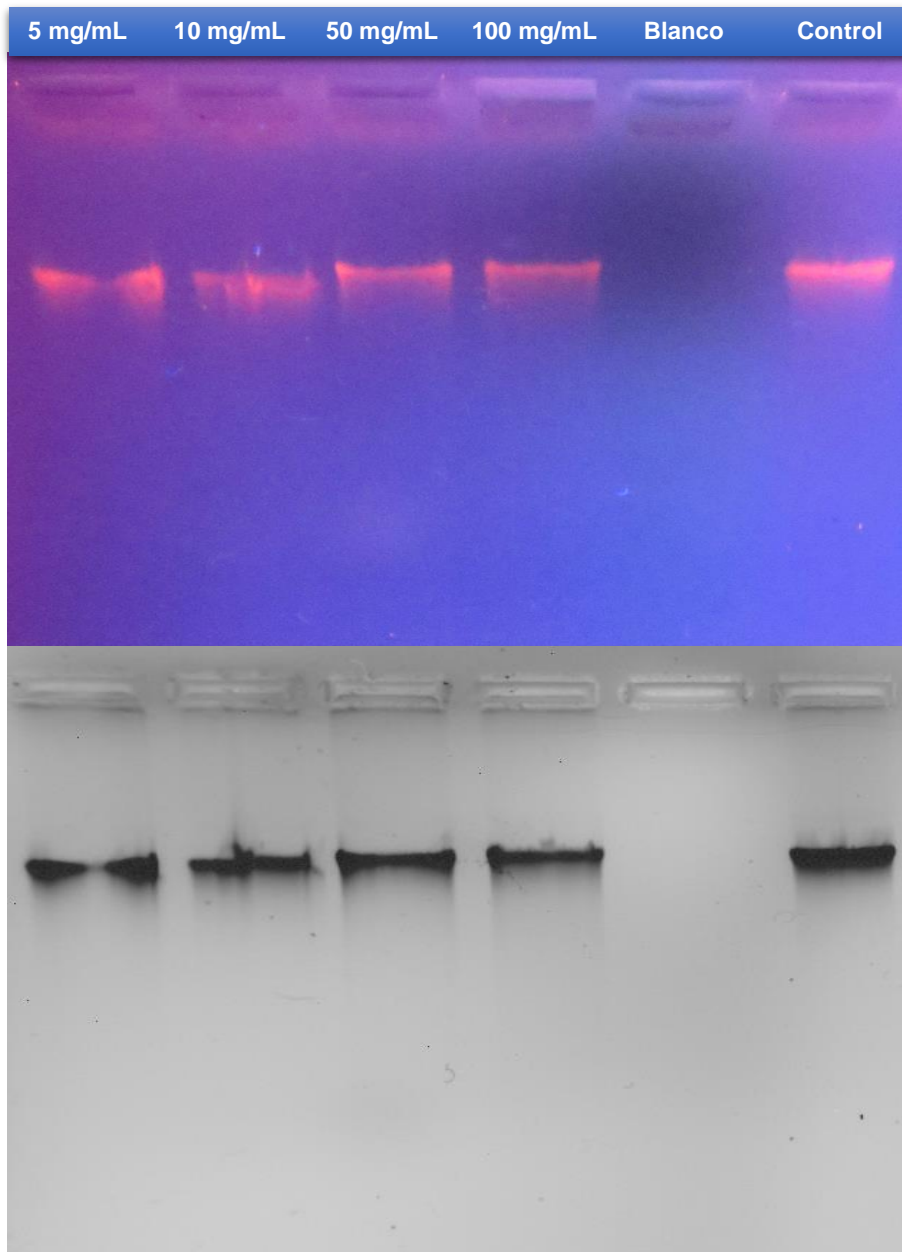


Figura 10. Ensayo genotóxico del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”, a una hora de incubación en baño maría a temperatura de 37 °C a diferentes concentraciones. Laboratorio de Biología Molecular. Ayacucho 2016.



Figura 11. Ensayo genotóxico del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”, a una hora de incubación en baño maría a temperatura de 37 °C a diferentes concentraciones. Laboratorio de Biología Molecular. Ayacucho 2016.

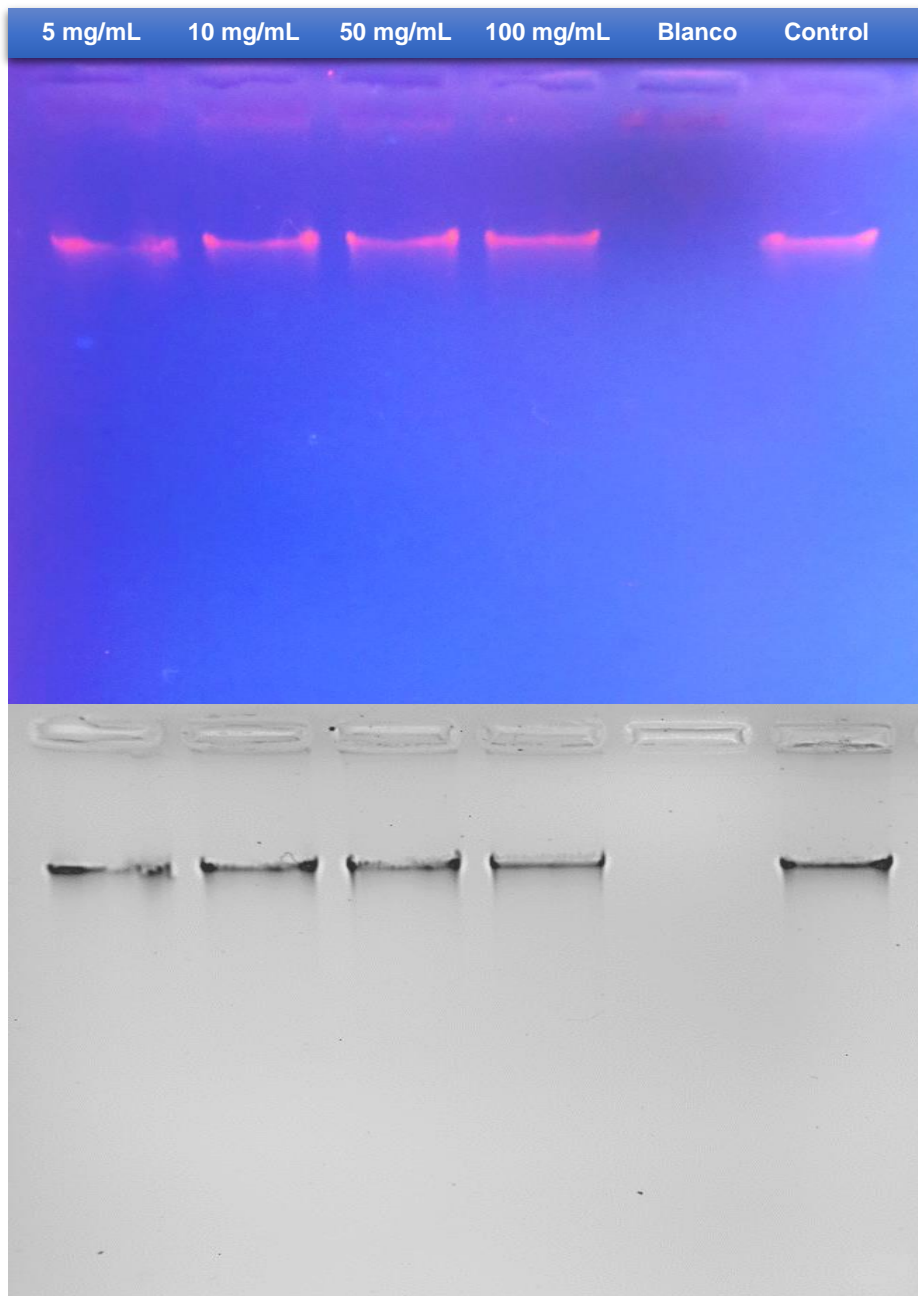


Figura 12. Ensayo genotóxico del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico", a cuatro horas de incubación en baño maría a temperatura de 37 °C, a diferentes concentraciones. Laboratorio de Biología Molecular. Ayacucho 2016.

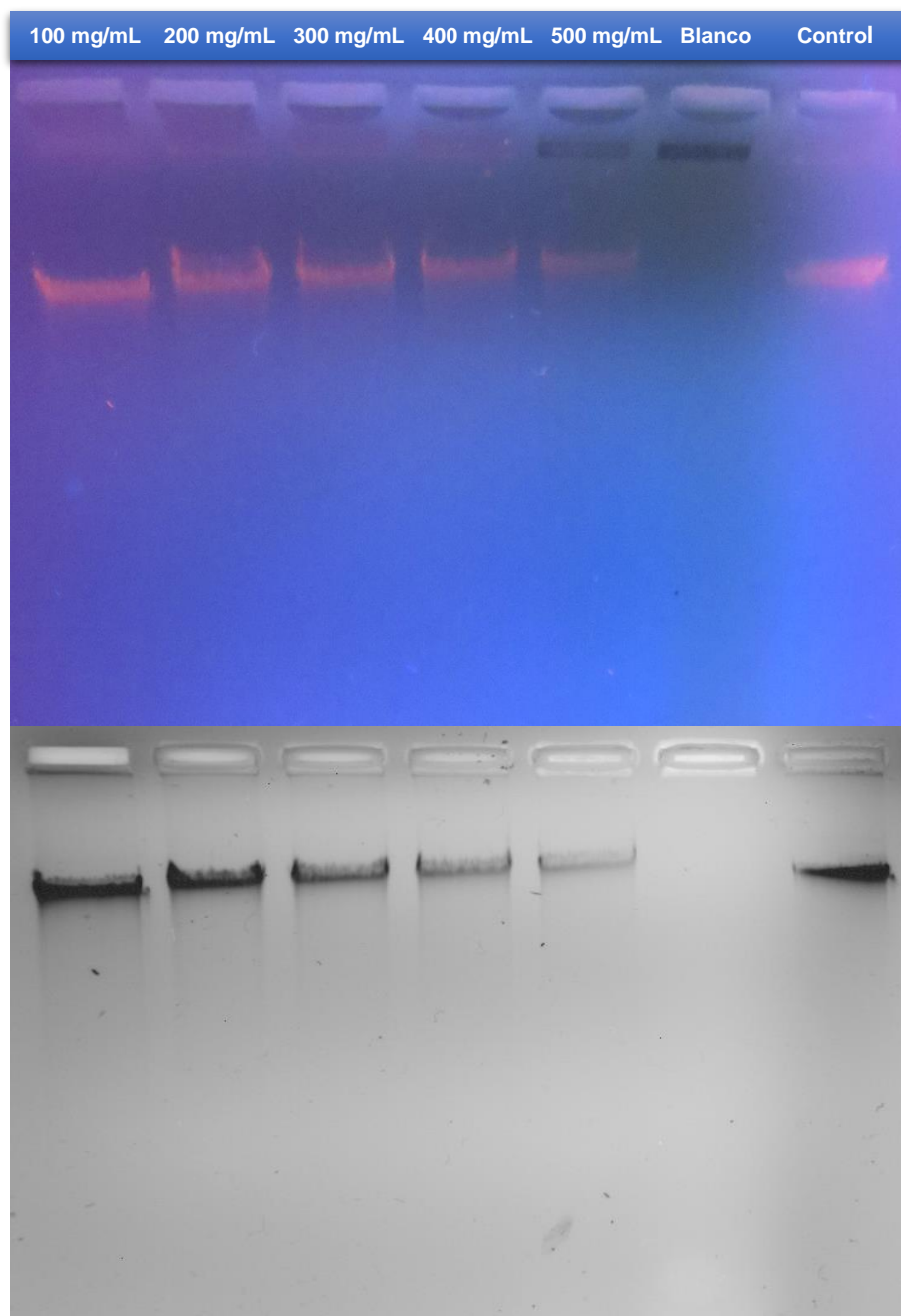


Figura 13. Ensayo genotóxico del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”, a cuatro horas de incubación en baño maría a temperatura de 37 °C a diferentes concentraciones. Laboratorio de Biología Molecular. Ayacucho 2016.

Tabla 9. Grado de genotoxicidad *in vitro* de ADN genómico humano, con soluciones de digestión de ADN de grupo 1 del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico" y tiempo de incubación a 37 °C. Ayacucho 2016.

Tiempo de incubación (hora)	Grado de genotoxicidad <i>in vitro</i> de ADN genómico humano, según diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. "chamico".			
	5 (mg/mL)	10 (mg/mL)	50 (mg/mL)	100 (mg/mL)
1 hora	0	1	1	2
	1	1	1	2
	0	1	1	2
	0	1	2	2
4 horas	1	1	2	2
	0	2	1	3
	1	1	2	2
	1	1	1	3

Tabla 10. Grado de genotoxicidad *in vitro* de ADN genómico humano, con soluciones de digestión de ADN de grupo 2 del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico" y tiempo de incubación a 37 °C. Ayacucho 2016.

Tiempo de incubación (hora)	Grado de genotoxicidad <i>in vitro</i> de ADN genómico humano, según diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. "chamico".			
	200 (mg/mL)	300 (mg/mL)	400 (mg/mL)	500 (mg/mL)
1 hora	2	3	3	3
	2	2	3	4
	3	3	3	4
	2	3	3	4
4 horas	2	3	3	4
	2	3	4	4
	3	4	3	4
	3	3	4	4

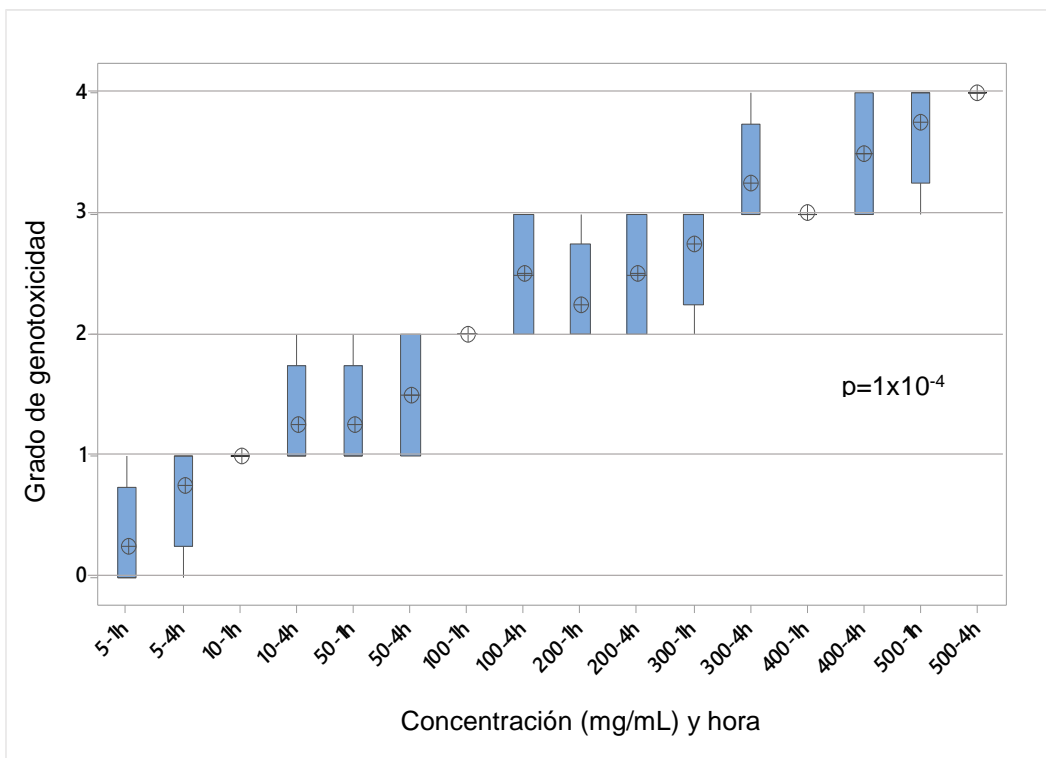


Figura 14. Prueba de Kruskal-Wallis: grado de genotoxicidad vs concentración (mg/mL) y tiempo de incubación a una hora y cuatro horas en baño maría a 37 °C. Ayacucho 2016.

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación tiene la finalidad de determinar el efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”. La población humana en general reconoce que las plantas medicinales poseen propiedades terapéuticas para diferentes males gracias a que éstas contienen diferentes metabolitos secundarios, los mismos que constituyen el principio activo, pero estas pueden tener efectos secundarios, entre ellos aquel que puede causar daño a nivel del ADN (genotoxicidad) de las células del organismo que está recibiendo el tratamiento directamente con las plantas o con los productos procesados, por lo que es necesario conocer si estas pueden estar ejerciendo este efecto a nivel del ADN.¹ Generalmente la actividad farmacológica de las hierbas medicinales se asocia con la toxicidad de las mismas y el efecto tóxico inducido depende de la dosis consumida. Los compuestos químicos presentes en las plantas medicinales pueden interactuar directa o indirectamente con el ADN produciendo cambios que afectan el funcionamiento celular y que a largo plazo causan trastornos en la salud.²

Nuestro país posee una flora rica en plantas medicinales, estos experimentan cada día un incremento en la preferencia del consumo nacional, como también en otros países. En los últimos años las plantas medicinales han adquirido gran importancia en terapias alternativas o complementarias, así mismo en la búsqueda de nuevas estructuras bioactivas para el tratamiento de las enfermedades. Por ello es importante realizar estudios de genotoxicidad a las plantas medicinales y/o fitofármacos más usados en nuestro país, para que así puedan ser registrados y reconocidos como productos farmacéuticos y puedan ser consumidos por el hombre.

En estudios de genotoxicidad las técnicas de elección deben ser capaces de detectar tanto el daño como la reparación consecuente al material genético en células individuales. La genotoxicidad de los agentes químicos es una

característica intrínseca, basada en el potencial electrofílico del agente para unirse a los campos nucleofílicos de macromoléculas presentes en las células tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN), el portador de la información hereditaria.³ La genotoxicidad es la toxicidad que se manifiesta en el material genético de las células, estos incluyen efectos tanto directos como indirectos sobre el ADN.³

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 a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico 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.¹⁴

Para realizar el presente estudio se contó con una unidad de bolsa colectora de sangre “cuádruple” fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos (para el desecho); la misma que se consiguió por donación del Banco de Sangre del Hospital Regional de Ayacucho “Miguel Ángel Mariscal Llerena”, y obtener ADN genómico humano mediante extracción orgánica con cloroformo: alcohol isoamílico y precipitación con isopropanol.

Las reacciones de identificación se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Miranda y Cuellar en el año 2000⁸⁰ (Anexo 4).

Para observar la presencia de alcaloides en el extracto hidroalcohólico se realizó el ensayo de Mayer, para ello se disolvió una alícuota de extracto hidroalcohólico concentrado en agua, luego se llevó a baño María para evaporar la parte orgánica y el residuo se redisolvió con 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Con la solución acuosa ácida obtenida se realizó el ensayo añadiendo 3 gotas del reactivo Mayer, al añadir el reactivo se observó un precipitado coposo que nos indica la presencia de alcaloides en el extracto hidroalcohólico obtenido a partir de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”⁸⁰ (Anexo 8).

Para observar la presencia de taninos se realizó el ensayo de cloruro férrico, para ello se disolvió una alícuota de extracto hidroalcohólico concentrado en agua, luego se añadió 3 gotas de solución de tricloruro férrico al 5 %y se observó una coloración verde intenso que nos indica la presencia de taninos en el extracto hidroalcohólico obtenido a partir de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”⁸⁰ (Anexo 8). De esta manera ambos ensayos de identificación fitoquímica resultaron positivos.⁸⁰

La figura 10, es el registro fotográfico con cámara digital a colores y sistema registrador de imágenes Biometra *UVsolo TS*, en ello se observa el grado de fragmentación del ADN genómico humano sometido a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL de extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico" a 1 hora de digestión (incubación en baño María a temperatura de 37 °C). La corrida se realizó sobre un gel de agarosa al 1.5 % y se dispuso en una cámara de electroforesis Biometra por 3 horas a 40 voltios. Para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa se utilizó las siguientes cantidades: 1 µL de *loading* (colorante señalizador de migración de las bandas), 7 µL de la solución de digestión para la prueba de genotoxicidad *in vitro* y 2 µL de agua destilada estéril obteniendo un volumen final de 10 µL, el cual se mezcló y se cargó sobre los respectivos pocillos en el gel de agarosa para la electroforesis. El carril número 1 corresponde a (14 µL de ADN genómico + 6 µL de extracto hidroalcohólico de concentración de 5 mg/mL), el carril número 2 corresponde a (14 µL de ADN genómico + 6 µL de extracto hidroalcohólico de concentración de 10 mg/mL), el carril número 3 corresponde a (14 µL de ADN genómico + 6 µL de extracto hidroalcohólico de concentración de 50 mg/mL), el carril número 4 corresponde a (14 µL de ADN genómico + 6 µL de extracto hidroalcohólico de concentración de 100 mg/mL), el carril número 5 corresponde al blanco (20 µL de extracto hidroalcohólico de 100 mg/mL) y el carril número 6 corresponde a la muestra control (14 µL de ADN genómico + 2 µL de agua destilada estéril). En la fotografía se observa una ligera variación en la fluorescencia emitida por las bandas, a medida que va aumentando la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico" disminuye la emisión de fluorescencia en comparación con la muestra control (carril número 6).

En la figura 11, se observa la fotografía del grado de fragmentación del ADN genómico humano sometido a concentraciones de 100 mg/mL, 200 mg/mL, 300 mg/mL, 400 mg/mL y 500 mg/mL de extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico" a 1 hora de digestión (incubación en baño María a una temperatura de 37 °C). El carril número 1 corresponde a (14 µL de ADN genómico + 6 µL de extracto hidroalcohólico de concentración de 100 mg/mL), el carril número 2 corresponde a (14 µL de ADN genómico + 6 µL de extracto hidroalcohólico de concentración de 200 mg/mL), el carril número 3 corresponde a (14 µL de ADN genómico + 6 µL de extracto hidroalcohólico de concentración de 300 mg/mL), el carril número 4 corresponde a (14 µL de ADN genómico + 6 µL de extracto

hidroalcohólico de concentración de 400 mg/mL), el carril número 5 corresponde a (14 µl de ADN genómico + 6 µl de extracto hidroalcohólico de concentración de 500mg/mL), el carril número 6 corresponde al blanco (20 µl de extracto hidroalcohólico de 100 mg/mL) y el carril número 7 corresponde a la muestra control (14 µl de ADN genómico + 2 µl de agua destilada). En la fotografía se observa una variación en la fluorescencia emitida por las bandas, a medida que va aumentando la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico” disminuye la emisión de fluorescencia en comparación con la muestra control (carril número 7).

En la figura 12, se observa la fotografía del grado de fragmentación del ADN genómico humano sometido a concentraciones de 5mg/mL, 10mg/mL, 50mg/mL y 100mg/mL de extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”, a 4 horas de digestión (incubación en baño María a una temperatura de 37 °C).El carril número 1 corresponde a (14 µl de ADN genómico + 6 µl de extracto hidroalcohólico de concentración de 5 mg/mL), el carril número 2 corresponde a (14 µl de ADN genómico + 6 µl de extracto hidroalcohólico de concentración de 10 mg/mL), el carril número 3 corresponde a (14 µl de ADN genómico + 6 µl de extracto hidroalcohólico de concentración de 50 mg/mL), el carril número 4 corresponde a (14 µl de ADN genómico + 6 ul de extracto hidroalcohólico de concentración de 100 mg/mL), el carril número 5 corresponde al blanco (20 µl de extracto hidroalcohólico de 100 mg/mL) y el carril número 6 corresponde a la muestra control (14 µl de ADN genómico + 2 µl de agua destilada estéril). En la fotografía se observa una disminución considerable en la fluorescencia emitida por las bandas, a medida que va aumentando la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico” disminuye la emisión de fluorescencia en comparación con la muestra control (carril número 6), lo cual indica que a mayor concentración y a mayor tiempo de incubación la fragmentación del ADN es mayor, por lo tanto la emisión de la fluorescencia disminuye al aumentar la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”.

En la figura 13, se observa la fotografía del grado de fragmentación del ADN genómico humano sometido a concentraciones de 100 mg/mL, 200 mg/mL, 300 mg/mL, 400 mg/mL y 500 mg/mL de extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico” a 4 hora de digestión (incubación en baño María a una temperatura de 37 °C). El carril número 1 corresponde a (14 µl de ADN genómico

+ 6 μ l de extracto hidroalcohólico de concentración de 100 mg/mL), el carril número 2 corresponde a (14 μ l de ADN genómico + 6 μ l de extracto hidroalcohólico de concentración de 200 mg/mL), el carril número 3 corresponde a (14 μ l de ADN genómico + 6 μ l de extracto hidroalcohólico de concentración de 300 mg/mL), el carril número 4 corresponde a (14 μ l de ADN genómico + 6 μ l de extracto hidroalcohólico de concentración de 400 mg/mL), el carril número 5 corresponde a (14 μ l de ADN genómico + 6 μ l de extracto hidroalcohólico de concentración de 500mg/mL), el carril número 6 corresponde al blanco (20 μ l de extracto hidroalcohólico de 100 mg/mL) y el carril número 7 corresponde a la muestra control (14 μ l de ADN genómico + 2 μ l de agua destilada). En la fotografía se observa una disminución considerable en la fluorescencia emitida por las bandas, a medida que va aumentando la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico" disminuye la emisión de fluorescencia en comparación con la muestra control (carril número 7), lo cual indica que a mayor concentración y a mayor tiempo de incubación la fragmentación del ADN es mayor, por lo tanto la emisión de la fluorescencia disminuye al aumentar la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico".

La emisión de la fluorescencia es directamente proporcional a la concentración del ADN genómico, esto indica que a mayor concentración de ADN se observará mayor fluorescencia y a menor concentración de ADN se observará menor emisión de fluorescencia. La emisión de fluorescencia se debe a las moléculas de bromuro de etidio, el cual se intercala en la molécula de ADN, exactamente en el espacio que existe entre nucleótido y otro nucleótido que mide 3,4 angstroms, este espacio es suficiente para que el bromuro de etidio se intercale durante la fase de coloración (la molécula de bromuro de etidio mide 3,4 angstroms), la fluorescencia se da cuando la luz ultravioleta choca y excita a los electrones de bromuro de etidio. Cuando los electrones se excitan saltan de un orbital de menor energía a un orbital de mayor energía (transición electrónica) produciendo la fluorescencia. En la tabla número 8, se observa el grado de genotoxicidad *in vitro* de ADN genómico humano con concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL de extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico" a 1 hora y 4 horas de digestión (incubación en baño María a una temperatura de 37 °C). Se observa la diferencia del grado de genotoxicidad en 1 hora de incubación

con respecto a 4 horas de incubación en baño María. De esta manera a mayor tiempo de incubación, mayor es la fragmentación del ADN.

En la tabla número 9, se observa el grado de genotoxicidad *in vitro* de ADN genómico humano con concentraciones de 200 mg/mL, 300 mg/mL, 400 mg/mL y 500 mg/mL de extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico", a una hora y cuatro horas de digestión (incubación en baño María a una temperatura de 37 °C). Se observa la diferencia del grado de genotoxicidad en 1 hora de incubación con respecto a 4 horas de incubación en baño María.

En la tabla número 8 y 9 se puede observar una diferencia significativa en razón al tiempo de incubación de las soluciones de digestión de ADN genómico humano. Teniendo en cuenta lo anterior se deduce que a mayor tiempo de incubación, mayor es la fragmentación del ADN.

La escala de los valores numéricos correspondientes a los niveles de fragmentación del ADN como producto de la genotoxicidad visualizados en el registro fotográfico fueron basados en la clasificación del "ensayo cometa" propuesto por Speit (1995) y Collins (2004) en tesis de Mónica Marisol Larrea Poma.⁸³

En la figura 14 se presenta la prueba de Kruskal-Wallis. La gráfica representa el grado de genotoxicidad versus la concentración (mg/mL) y el tiempo (hora) de incubación a una hora y cuatro horas. En el gráfico se puede observar mejor que a mayor tiempo de incubación, mayor es la fragmentación del ADN genómico. La velocidad de la reacción se incrementa con el mantenimiento de la temperatura óptima, este incremento se debe a que aumenta el número de moléculas ricas en energía que pueden pasar la barrera energética de estado de transición para formar a los productos.

En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas, por cada 10 °C de incremento la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general, sin embargo al ser proteínas, a partir de cierta temperatura empiezan a desnaturalizarse por el calor. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima. Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura, es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse.

Los alcaloides son compuestos orgánicos cíclicos que contienen nitrógeno (compuesto heterociclo) en un estado de oxidación negativo con una distribución limitado entre los organismos vivos.

En la actualidad existe una definición de alcaloides mucho más amplia, que incluye a todos los productos naturales que contienen nitrógeno que no son clasificados como péptidos, aminoácidos no proteicos, aminas, glicósidos cianogénicos, glucosinolatos, cofactores, fitohormonas o metabolitos primarios tales como bases purinas y pirimidinas.

Como su nombre lo sugiere, la mayoría son sustancias alcalinas que a valores de pH citosólico (pH: 7,2) o vacuolar (pH: 5 a 6), protonizan el átomo de nitrógeno, por lo que la mayoría de los alcaloides están cargados positivamente.

En la presente investigación se reporta las roturas de ADN genómico humano por efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico", sin embargo no se conoce con exactitud cómo se lleva acabo dicho efecto genotóxico, aunque la mayoría de los compuestos no fueron aun estudiados en detalle, han sido identificados una serie de blancos celulares o moleculares susceptibles a inhibición selectiva o modulación por los alcaloides. Estos blancos biológicos pueden ser; ácidos nucleicos, proteínas, membranas, carriers, receptores de neurotransmisores, enzimas, etc.

Con la prueba de Kruskal-Wallis se demuestra que existe diferencia estadísticamente significativa ya que el nivel de significancia es menor a 0,05 ($p < 0,05$).

VI. CONCLUSIONES

- El extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico” presenta efecto genotóxico *in vitro* sobre el ADN genómico de linfocitos humano.
- Los metabolitos secundarios identificados en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”, fueron alcaloides y taninos.
- Las concentraciones que produjeron mayor daño genotóxico fueron de 500 mg/mL, 400 mg/mL y 300 mg/mL, que mediante la prueba de Kruskal-Wallis el daño genotóxico es directamente proporcional a la concentración del extracto hidroalcohólico de *Datura stramonium* L. y al tiempo de incubación ($p=1 \times 10^{-4}$).

VII. RECOMENDACIONES

- 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.
- Ampliar estudios de genotoxicidad *in vitro* con otras plantas medicinales de uso común en nuestra región.
- Impulsar trabajos de investigación sobre estudios de Genotoxicidad y Farmacogenómica en las Facultades y Escuelas de Farmacia y Bioquímica en las universidades del Perú, para así poder mejorar la calidad de vida de nuestra población.

VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

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. Celik H, Arinc E. Bioreduction of Idarubicin and Formation of ROS Responsible for DNA Cleavage by NADPH-Cytochrome P450 Reductase and its Potential Role in the Antitumor Effect. *J Pharm Pharmaceut Sci* ([www. cspsCanada.org](http://www.cspsCanada.org)); 2008.
3. Garaj-Vrhovac V, Gajski G. Evaluation Of The Cytogenetic Status Of Human Lymphocytes After Exposure To A High Concentration Of Bee Venom *In Vitro*. *Arh Hig Rada Toksikol*; 2009.
4. Dusinska M, Andrew R. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. *Mutagenesis*; 2005.
5. Angelis K; Dusinska M; Collins A. Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis*; 2004.
6. Kassie F, Parzefall W, Knasmuller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res. PubMed*; 2002.
7. Chuang C. Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay in vivo and white blood cells for in vitro assay. *Mutat Res. PubMed*; 2004.
8. Monteith D, Vanstone J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage; 2004.
9. 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.
10. Monteith D; Vanstone J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage; 2003.
11. Huges C, Lewis S, Mckelvey-Martin V, Thompson W. The effects of antioxidant supplementation during percoll preparation on human sperm DNA integrity; 2002.
12. Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells; 2004

- 13 Hendriksen P, Viuff D, Greve T, Mullaart E, et al. Effect of the origin of bovine oocytes on cell numbers and numerical chromosome aberration in in vitro embryos collected at day 3 post-insemination. *Theriogenology*; 2004.
- 14 Miranda T, Valer G. *Protocolos de Biología Molecular-Guía de práctica. Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga*; 2013.
- 15 Vizoso Á, Ramos A. “Estudio genotóxico in vitro e in vivo del extracto fluido de *Cassia grandis L.* y el gel de *Aloe vera L.*” Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ciudad de La Habana. Cuba; 2005.
- 16 Carrión L. “Evaluación del efecto genotóxico del extracto hexánico y los metabolitos secundarios de *Clusia latipes* mediante el ensayo cometa en linfocitos humanos”. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja – Ecuador; 2009.
- 17 García A. “Estudio toxicogenético de un extracto fluido de *Ocimum basilicum L.* (albahaca blanca). Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ciudad de La Habana, Cuba; 2006.
- 18 Cofiño G, Gutiérrez A, Pardo B, Gámez R y Curvero D. “Evaluación del efecto genotóxico del D-004 en ratones NMRI empleando la electroforesis alcalina de células individuales en gel (Ensayo cometa)”. Centro de Productos Naturales (CPN). Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Ciudad de la Habana, Cuba; 2006.
- 19 Roldán R, Noriega M, Wagner M, Gurni A y Bassols G. “Estudio de genotoxicidad de *Picrasma crenata* (vell.) Engl. Simaroubaceae”. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina; 2007.
- 20 Toscanon E, Acosta O, Rojas D, Inocente M, Garrido D Y Guevara M. “Estudio genotóxico de una bebida experimental de quinua, kiwicha y kañiwa” Centro de Genética y Biología Molecular (CGBM). Centro de Medicina Tradicional (CMT). Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Martín de Porres. La Molina. Lima – Perú; 2013.
- 21 Ana María Ángel Castañeda. “Evaluación de la actividad genotóxica de propóleos recolectados en diferentes apiarios de Cundinamarca y Boyacá (Colombia)”. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología. Bogotá, Colombia; 2012.

- 22 Gadano A; Gurni A. y Carballo A. "Screening genotóxico de hierbas medicinales utilizadas en la medicina tradicional argentina". Citogenética Humana y Genética Toxicológica, Departamento de Bioquímica Clínica (CIGETOX). Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Argentina; 2004.
- 23 Díaz G, León María del Carmen, Iglesias E. "Evaluación del efecto genotóxico del *Xhantium strumarium* L. (Guisazo de Caballo)". Ciudad de la Habana. Cuba; 2004.
- 24 Brugés K, Reguero M. "Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L." Revista Colombiana de Biotecnología. Colombia; 2006.
- 25 Montero R, Vega Y, Piloto J, Rodríguez J. "Genotoxicidad de *Justicia pectoralis* Jacq. (tilo)" Rev Cubana Plant Med vol 13. Ciudad de la Habana. Cuba; 2008.
- 26 Fuertes C, Jurado B, Gordillo G, Negrón L, Núñez E, Távora A. Estudio Integrado de Plantas Biocidas del Algodonero. Inst. de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara", Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM. Perú; 2010.
- 27 Quintana E, Plascencia M, Burgos A, Guerrero J, Parra N, Onofre M. Extracto metanólico de *Datura stramonium* L. para el control *in vitro* e *in vivo* de *Ramularia cercosporelloides*, agente causal de la falsa cenicienta del cártamo (*Carthamus tinctorius*). Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), Universidad de Sonora, Rosales y Luis Encinas s/n. Hermosillo. México; 2009.
- 28 Rodríguez M, Chico J. Efecto antifúngico *in vitro* del extracto etanólico de chamico, *Datura stramonium* L., sobre *Fusarium oxysporum asparagi* y *Stemphylium vesicarium* aislados del cultivo de espárrago, *Asparagus officinalis*, de Moche. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo-Perú; 2012.
- 29 Spina S, Taddei A. Teenagers with Jimson weed (*Datura stramonium*) poisoning. Canadian Journal of Emergency Medicine; 2007.
- 30 Russell J, Edwards C, Jordan C, Luckman E, Chu A, Blythe D, et al. Jimsonweed poisoning associated with a homemade stew, Maryland; 2008.
- 31 Glatstein M, Alabdulrazzaq F, Garcia-Bournissen F, Scolnik D. Use of physostigmine for hallucinogenic plant poisoning in a teenager: case report and review of the literature. American Journal of Therapeutics; 2012.

- 32 Lorenzo P, Ladero J, Leza J, Lizasoain I. Drogodependencias: Farmacología, Patología, Psicología, Legislación. 3a Ed. Madrid: Médica Panamericana; 2009.
- 33 Bruneton J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Zaragoza: Editorial Acribia S.A; 1991.
- 34 El Bazaoni A, Bellimam M, Soulaymani A. Nine new tropane alkaloids from *Datura stramonium* L. identified by GC/MS. *Fitoterapia*; 2011.
- 35 Montcriol A, Kenane N, Delort G, Asencio Y, Palmier B. Intentional *Datura stramonium* intoxication: an unknown etiology of midriasis. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*; 2007.
- 36 Marc B, Maris A, Moreau C, Arlie G, Kintz P, Leclerc J. Intoxications aiguës: à *Datura stramonium* aux urgences. *La Presse Médicale*; 2007.
- 37 Stella L, Vitelli R, Palazzo E, Oliva P, De Novellis V, Capuano A, et al. *Datura stramonium*: a report on three cases. *Journal of Psychoactive Drugs*; 2010.
- 38 Ferigla J. Enteógenos tradicionales más usados en la cuenca Mediterránea. Apuntes docentes de la Universidad de Chile, Facultad de Medicina; 2001.
- 39 Huerta C. El toloache: magia, ciencia o superchería; 2000.
- 40 Farm S. M. Solanaceas, Trio del delirio, Revista de Asociación Cordobesa de Farmacéuticos homeopáticos; 2006.
- 41 Berkov S, Zayed R, Doncheva T. Alkaloid patterns in some varieties of *Datura stramonium*. *Fitoterapia*; 2007.
- 42 Repetto Jiménez M, Repetto Kuhn G. Toxicología fundamental. 4ª Edición. Madrid: Díaz de Santos; 2009.
- 43 Glosario de términos Toxicológicos. Asociación Española de Toxicología (AETOX).
- 44 Klaassen C, Watkins J, Casarett, Doull. Fundamentos de toxicología. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España; 2005.
- 45 Green Facts: Facts on Health and the Environment. Glosario General. 2001.
- 46 Bello J, López A. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Madrid: Díaz de Santos; 2001.
- 47 Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). Curso de Toxicología Ambiental. Bogotá (Colombia); 2011.
- 48 Carballo M. Centro de Análisis Programas Sanitarios (CAPS). Biomarcadores de genotoxicidad. Universidad de Buenos Aires. Barcelona; 2011.

- 49 Herrera F, De La Peña E. Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Evolución de mutagenicidad y genotoxicidad. Madrid; 2004.
- 50 Ramírez P, Mendoza A. Ensayos toxicológicos para la evolución de sustancias químicas en agua y suelo. Instituto Nacional de Ecología y Cambio climático (INECC). México; 2013.
- 51 Álvarez C, Ochoa S, Ayala N, Andrade M. Prueba Cometa. Universidad de Guadalajara (México); 2001-2013.
- 52 Arencibia D, Rosario L, Rodríguez Y, López Y, Díaz D. Frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones NMRI y Balb-C de ambos sexos. Retel; 2009.
- 53 Arrebola D.; Fernández L. Actualización Sobre el Ensayo Cometa y de Micronúcleos *InVitro*; 2003.
- 54 Ostling O, Johanson K. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 1984.
- 55 Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*; 1988.
- 56 Fairbairn D, Olive P, O'Neill K. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*; 1995.
- 57 Mudry M, Carballo M. Genética Toxicológica. De los Cuatro Vientos Editorial. Primera Edición. Buenos Aires; 2006.
- 58 Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J, Sasaki Y. Single cell gel/comet assay: guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*; 2000.
- 59 Di Giorgio M, Taja M, Nasazzi N, Bustos N, Cavalieri H, Bolgiani A. El ensayo de cometa como herramienta de la dosimetría biológica en la evaluación de sobreexposiciones fuertemente localizadas. Memorias del 5th Regional Congress on Radiation Protection and Safety. Recife, Brasil, 29 abril al 4 mayo; 2001.
- 60 Frenzilli G, Nigro M, Lyons B. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*; 2009.
- 61 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.

- 62 Hartmann A, Plappert U, Poetter F, Suter W. Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. *Mutation Research*; 2003.
- 63 Hwang E, Bowen P. DNA Damage, a Biomarker of Carcinogenesis: Its Measurement and Modulation by Diet and Environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 2007.
- 64 Zúñiga L. Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Departamento de genética y microbiología. Grupo de Mutagénesis; 2009.
- 65 Valverde M, Rojas E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research*; 2009.
- 66 Machado A, Lima P, Alves R, Rodríguez R. Evaluation of Genotoxic Effects of Xenobiotics in Fishes Using Comet Assay—A Review. *Reviews in Fisheries Science*; 2009.
- 67 Goldberg M. *In vitro* and *in vivo* studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Invest*; 2008.
- 68 Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research*; 2009.
- 69 Aitken R, De Iuliis G, McLachlan R. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International Journal of Andrology*; 2008.
- 70 Speit G, Vasquez M, Hartmann A. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. *Mutation Research*. 2009.
- 71 Burriel Coll. “Estructura y propiedades de los ácidos nucleicos”. Master en Ingeniería Biomédica; 2007.
- 72 Dahm R “Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research”. *Human Genetics*; 2008.
- 73 Jelliffe P. “Imagen de la estructura helicoidal del ADN”; 2012.
- 74 Sergio Ferrer. “El verdadero sentido de la vida”. *Journal of Feelsynapsis (JoF)*; 2011.
- 75 Lee J, Gutell R. “Diversity of base-pair conformations and their occurrence in rRNA structure and RNA structural motifs”; 2004.
- 76 Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A. “Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes”; 2008.

- 77 Grosjean, H. Nucleic acids are not boring long polymers of only four types of nucleotides: a guided tour. DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution. Landes Biosciences, Texas, USA; 2009.
- 78 Vázquez F, Vaucheret H, Rajagopalan R, Lepers C, Gascioli V. "Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs"; 2004.
- 79 Daniel L, Elizabeth W. Genetics: Analysis of Genes and Genomes. 6th edition Hartl; 2003.
- 80 Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad de la Habana. Ciudad de Habana. Cuba; 2000.
- 81 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.
- 82 Arena I, López J. "Espectrofotometría de absorción." Métodos de laboratorio. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2004.
- 83 Larrea Poma M. Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay. La Paz. Universidad Mayor de San Andrés; 2007.
- 84 Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. 5^{ta} edición. Perú: Editorial Mc Graw Hill. 2010.

ANEXOS

Anexo 1. Clasificación taxonómica de *Datura stramonium* L. "chamico". Ayacucho 2016.



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

C E R T I F I C A

Que, el Bach. en Farmacia y Bioquímica, Sr. Joel Caroy, MARTÍNEZ FERNANDEZ, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	SOLANALES
FAMILIA	:	SOLANACEAE
GENERO	:	Datura
ESPECIE	:	<i>Datura stramonium</i> L..
N.V.	:	"chamico"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 20 de Mayo del 2016

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

Dña. Laura Arcesime Medina
JEFE

Anexo 2. Descripción botánica de *Datura stramonium* L. "chamico". Ayacucho 2016.

CHAMICO

Nombre científico : *Datura stramonium*

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA :

Planta herbácea anual mide hasta 1 metro de alto, de tallos erguidos dicotómicamente ramificado y lisos, hojas simples , alternas, pecioladas ovaladas, con el ápice agudo y bordes sinuosos, con los nervios pronunciados en el envés, presenta un olor desagradable ; flores grandes blancas o ligeramente azuladas heteroclamídeas bisexuales y tubulares. Cáliz y corola formada por 5 piezas soldadas, 5 estambres libres , ovario súpero, tetra carpelar , con 2 lóculos y conteniendo muchos óvulos, de placentación parietal, fruto cápsula de dehiscencia valvar provista de espinas . Las semillas negruzcas de forma arriñonada.

Hábitat y Distribución:

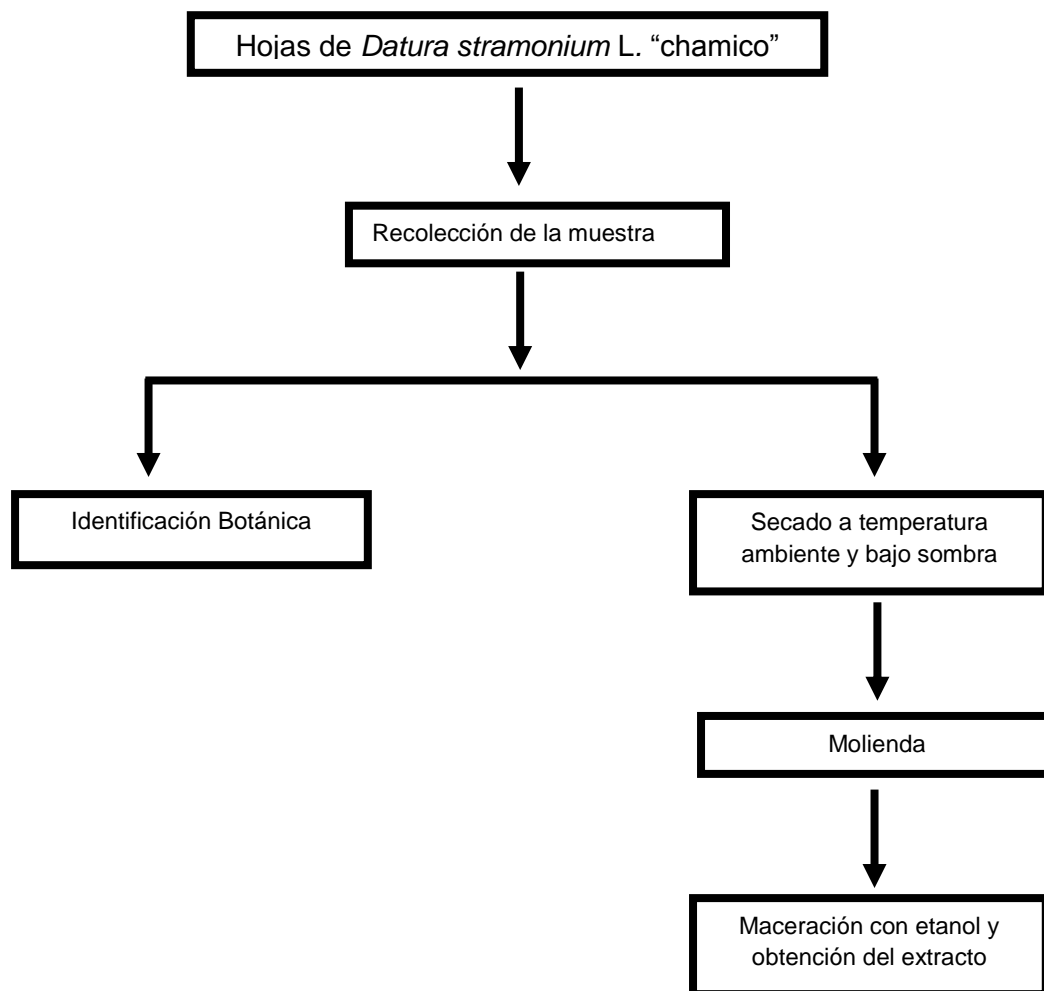
Es una especie introducida, crece al estado silvestre como maleza en los campos de cultivo, terrenos secos y abandonados es propia de climas templados y cálidos hasta los 3 000 msnm. Se propaga mediante semillas

Usos:

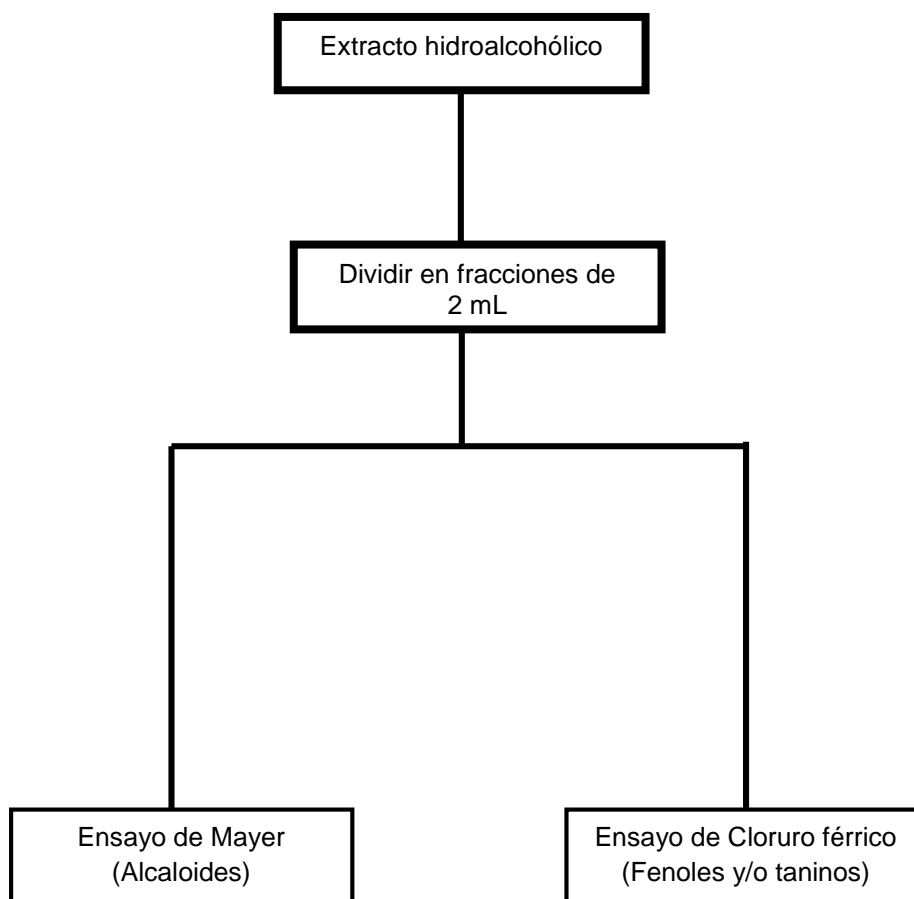
Es una planta tóxica, se usa como plaguicida contra plagas e insectos haciendo fumigaciones con el agua de las hojas machacadas y hervidas .

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAYBAMBA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERNÁNDEZ TRUJANOS
Laura Aucante Medina
JEFE

Anexo 3. Diagrama para la obtención del extracto hidroalcohólico de hojas de datura *Datura stramonium* L. “chamico”. Ayacucho 2016.



Anexo 4. Diagrama de identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Datura stramonium* L. "chamico". Ayacucho 2016.



Anexo 5. Recolección, secado y molienda de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico". Ayacucho 2016.



Recolección de la muestra



Secado de la muestra

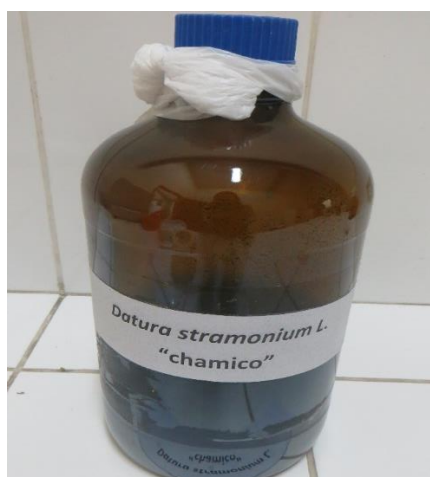


Molienda de la muestra

Anexo 6. Obtención del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico". Ayacucho 2016.



Pesado de la muestra pulverizada



Maceración de la muestra (agua más etanol al 95%) por 7 días



Filtrado del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico"

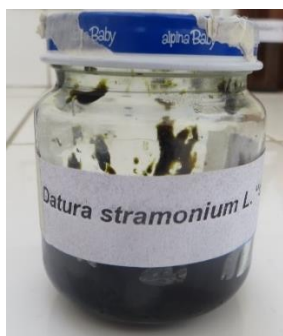
Anexo 7. Concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”, a sequedad en una estufa MEMMERT a 37 °C. Ayacucho 2016.



Extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico” en la estufa

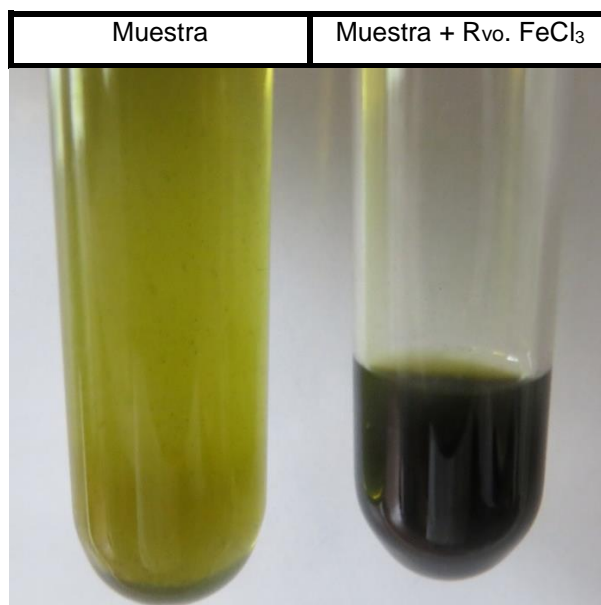


Extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”, en la estufa a una temperatura de 37 °C

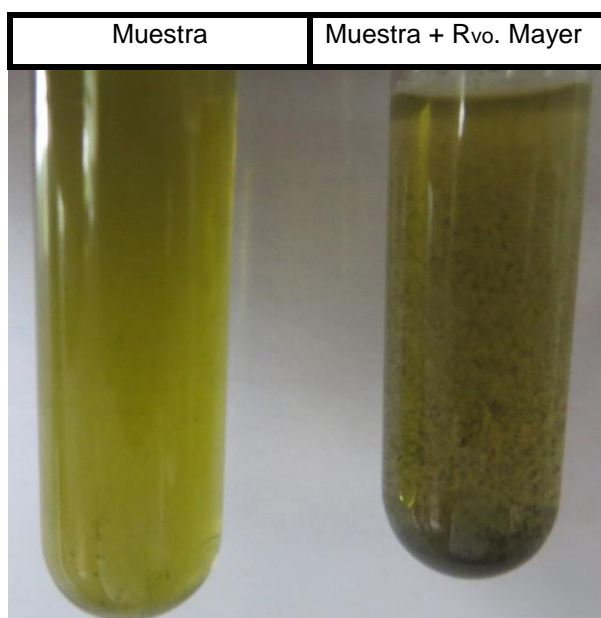


Extracto hidroalcohólico concentrado de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”

Anexo 8. Ensayo de identificación fotoquímico del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico". Ayacucho 2016.



Ensayo de Cloro férrico para determinar la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos (resultado positivo)

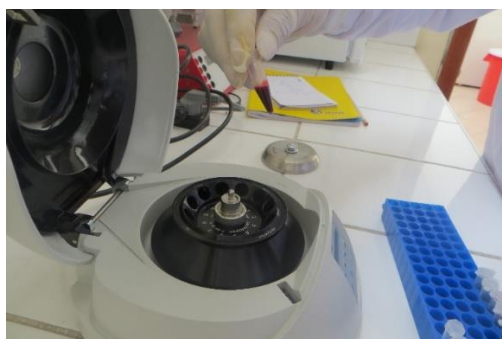


Ensayo de Mayer para determinar la presencia de alcaloides (resultado positivo)

Anexo 9. Proceso de extracción de ADN genómico a partir de linfocitos humano.
Ayacucho 2016.



Proceso de extracción de ADN genómico



Centrifugación de la muestra en tubos eppendorf



ADN genómico humano extraído en tubos eppendorf

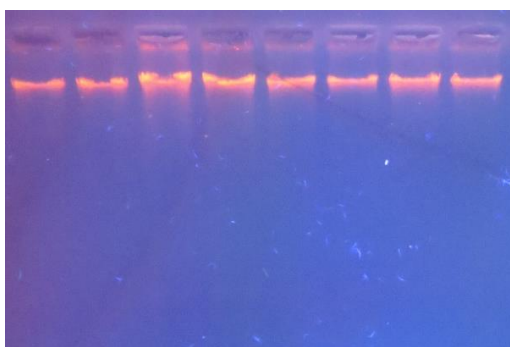


Imagen captado en el equipo transiluminador UV. La fluorescencia observada indica la presencia de ADN

Anexo 10. Proceso de preparación a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico". Ayacucho 2016.



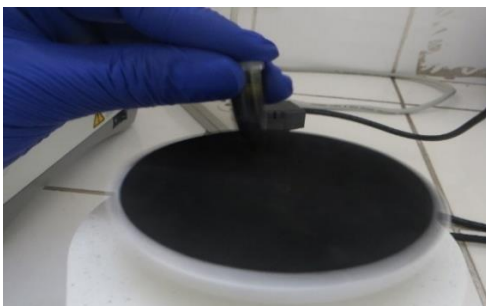
Pesado del extracto hidroalcohólico concentrado en un tubo eppendorf



Disolución con H₂O_d

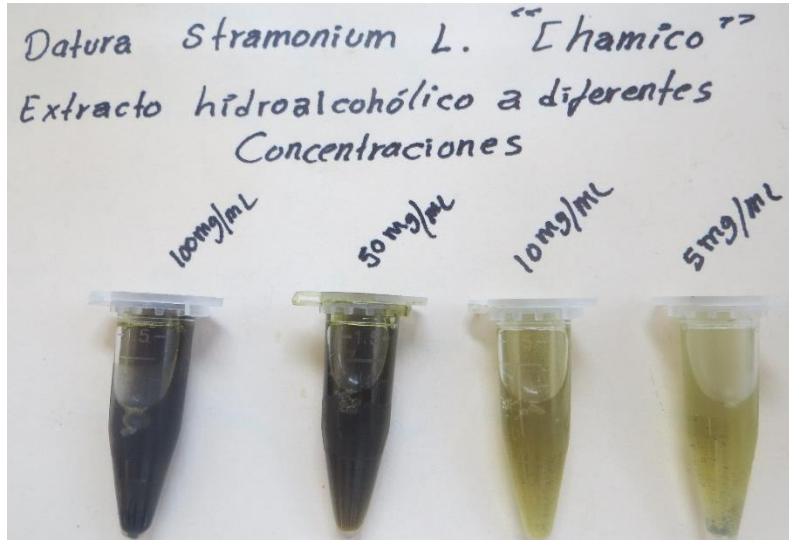


Incubación en baño maría a 37 °C para facilitar la solubilidad del extracto

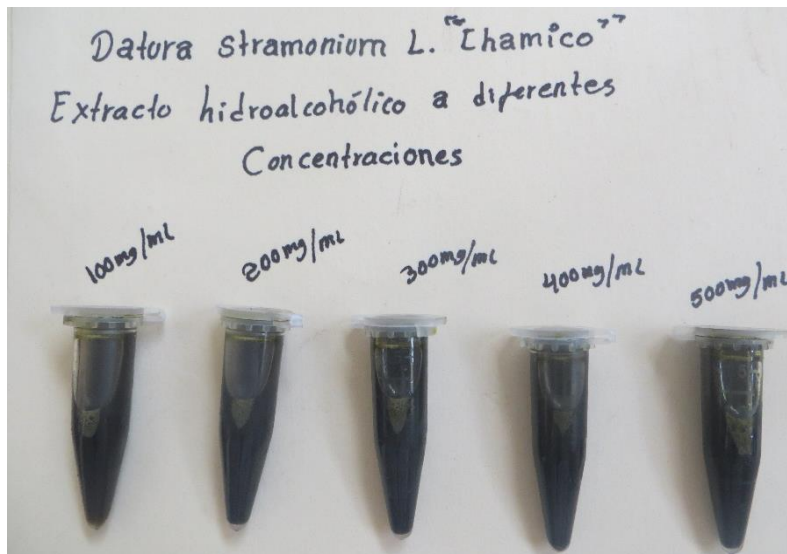


Un ligero bortex para homogenizar la mezcla

Anexo 11. Concentraciones preparadas a partir del extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico". Ayacucho 2016.



Concentraciones preparadas a partir del extracto hidroalcohólico



Concentraciones preparadas a partir del extracto hidroalcohólico

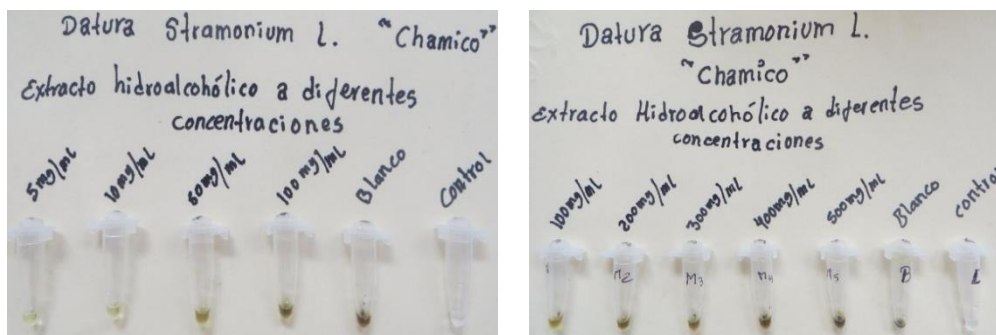
Anexo 12. Preparación de solución de digestión de ADN genómico humano (con las concentraciones de grupo 1 y 2). E incubación en baño maría por uno hora y cuatro horas a 37 °C. Ayacucho 2016.



Concentraciones preparadas para tratamiento de grupo 1 y 2



Preparación para la fase de digestión de ADN genómico humano


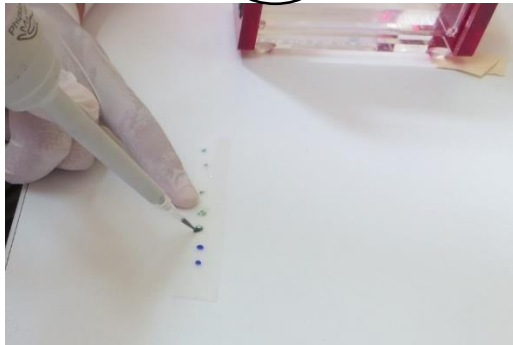



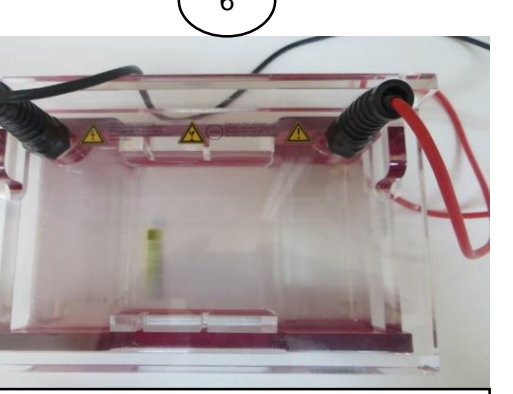


Soluciones de digestión de ADN genómico (ADN genómico humano + diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico)



Incubación en baño maría por una hora y cuatro horas a 37 °C

Anexo 13. Fase de electroforesis en gel de agarosa (se repite el mismo procedimiento para los grupos 1 y 2 de tratamiento). Ayacucho 2016.

<p>1</p>  <p>Acondionamiento de la cámara de electroforesis</p>	<p>2</p>  <p>Mezcla de soluciones de digestión después de la incubación.</p>
<p>3</p>  <p>Proceso de sembrado en los pocillos de gel de agarosa</p>	<p>4</p>  <p>Cámara de electroforesis con gel de agarosa</p>
<p>5</p>  <p>Instalación y programación de la cámara de electroforesis a 40 v por 3 horas</p>	<p>6</p>  <p>La cámara de electroforesis después de 3 horas de corrida a 40 v</p>

Anexo 14. Fase de coloración con bromuro de etidio. Ayacucho 2016.



Adicionar la solución de bromuro de etidio 1% al recipiente hasta cubrir el gel de agarosa



Dejar reposar por 15 minutos



Pasado los 15 minutos se devuelve la solución de bromuro de etidio 1% al frasco, luego se realiza el lavado del gel de agarosa con agua corriendo 2 veces con mucho cuidado

Anexo 15. Fase de lectura por radiación UV. Ayacucho 2016.



Equipo transiluminador UV marca Ultra Lum

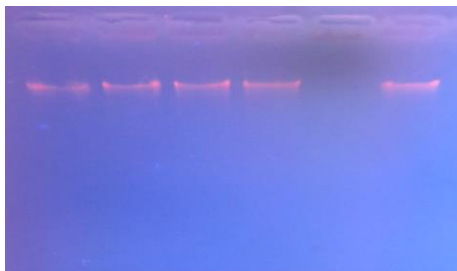


Imagen captada con cámara digital sobre el Equipo transiluminador UV



Cámara oscura del equipo registrador de imágenes Biometra UVsolo TS



Sistema de registrador de imágenes Biometra UVsolo TS

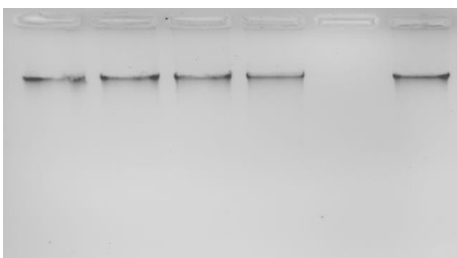


Imagen captada en el sistema de registrador de imágenes Biometra UVsolo TS

Anexo 16. Datos utilizados en el análisis estadístico (en crudo). Ayacucho 2016.

Means

Rank	X hora	std r	Min	Max			
51	5,00	0,25	0,5000000	4	0	1	
54	1,00	0,75	0,5000000	4	0	1	
101	12,50	1,00	0,0000000	4	1	1	
104	16,50	1,25	0,5000000	4	1	2	
501	16,50	1,25	0,5000000	4	1	2	
504	20,50	1,50	0,5773503	4	1	2	
1001	28,50	2,00	0,0000000	4	2	2	
1004	37,00	2,50	0,5773503	4	2	3	
2001	32,75	2,25	0,5000000	4	2	3	
2004	37,00	2,50	0,5773503	4	2	3	
3001	41,25	2,75	0,5000000	4	2	3	
3004	49,00	3,25	0,5000000	4	3	4	
4001	45,50	3,00	0,0000000	4	3	3	
4004	52,50	3,50	0,5773503	4	3	4	
5001	56,00	3,75	0,5000000	4	3	4	
5004	59,50	4,00	0,0000000	4	4	4	

Comparison

	Difference	p value	sig.	LCL	UCL
51 - 54	-5,00	1,0000		-23,53143	13,53143032
51 - 101	-7,50	1,0000		-26,03143	11,03143032
51 - 104	-11,50	1,0000		-30,03143	7,03143032
51 - 501	-11,50	1,0000		-30,03143	7,03143032
51 - 504	-15,50	0,3162		-34,03143	3,03143032
51 - 1001	-23,50	0,0018	**	-42,03143	-4,96856968
51 - 1004	-32,00	0,0000	***	-50,53143	-13,46856968
51 - 2001	-27,75	0,0001	***	-46,28143	-9,21856968
51 - 2004	-32,00	0,0000	***	-50,53143	-13,46856968
51 - 3001	-36,25	0,0000	***	-54,78143	-17,71856968
51 - 3004	-44,00	0,0000	***	-62,53143	-25,46856968
51 - 4001	-40,50	0,0000	***	-59,03143	-21,96856968
51 - 4004	-47,50	0,0000	***	-66,03143	-28,96856968
51 - 5001	-51,00	0,0000	***	-69,53143	-32,46856968
51 - 5004	-54,50	0,0000	***	-73,03143	-35,96856968
54 - 101	-2,50	1,0000		-21,03143	16,03143032
54 - 104	-6,50	1,0000		-25,03143	12,03143032
54 - 501	-6,50	1,0000		-25,03143	12,03143032
54 - 504	-10,50	1,0000		-29,03143	8,03143032

54 - 1001	-18,50	0,0510		-37,03143	0,03143032
54 - 1004	-27,00	0,0002	***	-45,53143	-8,46856968
54 - 2001	-22,75	0,0031	**	-41,28143	-4,21856968
54 - 2004	-27,00	0,0002	***	-45,53143	-8,46856968
54 - 3001	-31,25	0,0000	***	-49,78143	-2,71856968
54 - 3004	-39,00	0,0000	***	-57,53143	-0,46856968
54 - 4001	-35,50	0,0000	***	-54,03143	-6,96856968
54 - 4004	-42,50	0,0000	***	-61,03143	-3,96856968
54 - 5001	-46,00	0,0000	***	-64,53143	-7,46856968
54 - 5004	-49,50	0,0000	***	-68,03143	-0,96856968
101 - 104	-4,00	1,0000		-22,53143	14,53143032
101 - 501	-4,00	1,0000		-22,53143	14,53143032
101 - 504	-8,00	1,0000		-26,53143	10,53143032
101 - 1001	-16,00	0,2359		-34,53143	2,53143032
101 - 1004	-24,50	0,0009	***	-43,03143	-5,96856968
101 - 2001	-20,25	0,0165	*	-38,78143	-1,71856968
101 - 2004	-24,50	0,0009	***	-43,03143	-5,96856968
101 - 3001	-28,75	0,0000	***	-47,28143	-10,21856968
101 - 3004	-36,50	0,0000	***	-55,03143	-17,96856968
101 - 4001	-33,00	0,0000	***	-51,53143	-14,46856968
101 - 4004	-40,00	0,0000	***	-58,53143	-21,46856968
101 - 5001	-43,50	0,0000	***	-62,03143	-24,96856968
101 - 5004	-47,00	0,0000	***	-65,53143	-28,46856968
104 - 501	0,00	1,0000		-18,53143	18,53143032
104 - 504	-4,00	1,0000		-22,53143	14,53143032
104 - 1001	-12,00	1,0000		-30,53143	6,53143032
104 - 1004	-20,50	0,0140	*	-39,03143	-1,96856968
104 - 2001	-16,25	0,2034		-34,78143	2,28143032
104 - 2004	-20,50	0,0140	*	-39,03143	-1,96856968
104 - 3001	-24,75	0,0008	***	-43,28143	-6,21856968
104 - 3004	-32,50	0,0000	***	-51,03143	-13,96856968
104 - 4001	-29,00	0,0000	***	-47,53143	-10,46856968
104 - 4004	-36,00	0,0000	***	-54,53143	-17,46856968
104 - 5001	-39,50	0,0000	***	-58,03143	-20,96856968
104 - 5004	-43,00	0,0000	***	-61,53143	-24,46856968
501 - 504	-4,00	1,0000		-22,53143	14,53143032
501 - 1001	-12,00	1,0000		-30,53143	6,53143032
501 - 1004	-20,50	0,0140	*	-39,03143	-1,96856968
501 - 2001	-16,25	0,2034		-34,78143	2,28143032
501 - 2004	-20,50	0,0140	*	-39,03143	-1,96856968
501 - 3001	-24,75	0,0008	***	-43,28143	-6,21856968
501 - 3004	-32,50	0,0000	***	-51,03143	-13,96856968
501 - 4001	-29,00	0,0000	***	-47,53143	-10,46856968
501 - 4004	-36,00	0,0000	***	-54,53143	-17,46856968

501 - 5001	-39,50	0,0000	***	-58,03143	-0,96856968
501 - 5004	-43,00	0,0000	***	-61,53143	-24,46856968
504 - 1001	-8,00	1,0000		-26,53143	10,53143032
504 - 1004	-16,50	0,1752		-35,03143	2,03143032
504 - 2001	-12,25	1,0000		-30,78143	6,28143032
504 - 2004	-16,50	0,1752		-35,03143	2,03143032
504 - 3001	-20,75	0,0119	*	-39,28143	-2,21856968
504 - 3004	-28,50	0,0001	***	-47,03143	-9,96856968
504 - 4001	-25,00	0,0006	***	-43,53143	-6,46856968
504 - 4004	-32,00	0,0000	***	-50,53143	-13,46856968
504 - 5001	-35,50	0,0000	***	-54,03143	-16,96856968
504 - 5004	-39,00	0,0000	***	-57,53143	-20,46856968
1001 - 1004	-8,50	1,0000		-27,03143	10,03143032
1001 - 2001	-4,25	1,0000		-22,78143	14,28143032
1001 - 2004	-8,50	1,0000		-27,03143	10,03143032
1001 - 3001	-12,75	1,0000		-31,28143	5,78143032
1001 - 3004	-20,50	0,0140	*	-39,03143	-1,96856968
1001 - 4001	-17,00	0,1295		-35,53143	1,53143032
1001 - 4004	-24,00	0,0013	**	-42,53143	-5,46856968
1001 - 5001	-27,50	0,0001	***	-46,03143	-8,96856968
1001 - 5004	-31,00	0,0000	***	-49,53143	-12,46856968
1004 - 2001	4,25	1,0000		-14,28143	22,78143032
1004 - 2004	0,00	1,0000		-18,53143	18,53143032
1004 - 3001	-4,25	1,0000		-22,78143	14,28143032
1004 - 3004	-12,00	1,0000		-30,53143	6,53143032
1004 - 4001	-8,50	1,0000		-27,03143	10,03143032
1004 - 4004	-15,50	0,3162		-34,03143	3,03143032
1004 - 5001	-19,00	0,0371	*	-37,53143	-0,46856968
1004 - 5004	-22,50	0,0037	**	-41,03143	-3,96856968
2001 - 2004	-4,25	1,0000		-22,78143	4,28143032
2001 - 3001	-8,50	1,0000		-27,03143	10,03143032
2001 - 3004	-16,25	0,2034		-34,78143	2,28143032
2001 - 4001	-12,75	1,0000		-31,28143	5,78143032
2001 - 4004	-19,75	0,0229	*	-38,28143	-1,21856968
2001 - 5001	-23,25	0,0022	**	-41,78143	-4,71856968
2001 - 5004	-26,75	0,0002	***	-45,28143	-8,21856968
2004 - 3001	-4,25	1,0000		-22,78143	14,28143032
2004 - 3004	-12,00	1,0000		-30,53143	6,53143032
2004 - 4001	-8,50	1,0000		-27,03143	10,03143032
2004 - 4004	-15,50	0,3162		-34,03143	3,03143032
2004 - 5001	-19,00	0,0371	*	-37,53143	-0,46856968
2004 - 5004	-22,50	0,0037	**	-41,03143	-3,96856968
3001 - 3004	-7,75	1,0000		-26,28143	10,78143032
3001 - 4001	-4,25	1,0000		-22,78143	14,28143032

3001 - 4004	-11,25	1,0000	-29,78143	7,28143032
3001 - 5001	-14,75	0,4863	-33,28143	3,78143032
3001 - 5004	-18,25	0,0597	-36,78143	0,28143032
3004 - 4001	3,0	1,0000	-15,03143	22,03143032
3004 - 4004	-3,50	1,0000	-22,03143	15,03143032
3004 - 5001	-7,00	1,0000	-25,53143	11,53143032
3004 - 5004	-10,50	1,0000	-29,03143	8,03143032
4001 - 4004	-7,00	1,0000	-25,53143	11,53143032
4001 - 5001	-10,50	1,0000	-29,03143	8,03143032
4001 - 5004	-14,00	0,7394	-32,53143	4,53143032
4004 - 5001	-3,50	1,0000	-22,03143	15,03143032
4004 - 5004	-7,00	1,0000	-25,53143	11,53143032
5001 - 5004	-3,50	1,0000	-22,03143	15,03143032

H = 26,55 GL = 7 p = 0,000
H = 28,27 GL = 7 p = 0,000

Anexo 17. Screening fitoquímico de extractos acuosos liofilizados de plantas biocidas. Estudio Integrado de Plantas Biocidas del Algodonero. Instituto. De Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM. Perú; 2010.

Nombre científico y común	Saponinas (Esteroidales, triterpenoides y aza-esteroidales)	Triterpenoides y esteroides libres	Taninos	Quinonas (Naftoquinonas y Antraquinonas)	Alcaloides	Flavonoides
<i>Clibadium asperum</i> (huaca)	-	-	-	-	+ trazas	+
<i>Hura crepitans</i> (catahua)	+++	+	-	-	-	+++
<i>Chromolaena laevigata</i> (sacha huaca)	+++	+	+	-	+	+++
<i>Agave americana</i> (maguey)	++	+	-	-	-	+
<i>Lonchocarpus nicou</i> (barbasco)	+++	+	-	-	+	+
<i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco)	+	-	-	+	+++	-
<i>Chenopodium ambrosioides</i> (paico)	+	+	-	-	+ trazas	+
<i>Minthostachys mollis</i> (muña)	++	+	-	-	-	+++
<i>Juglans neotropica</i> (nogal)	+++	+	+	++	-	++
<i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)	-	+	++	++	-	++
<i>Erythrina ulei</i> (amasisa)	++	+	-	-	+++	++
<i>Cissampelos grandifolia</i> (legía)	-	-	++	++	++	-
<i>Schinus molle</i> (molle)	-	++	+++	++	-	+++
<i>Datura Stramonium</i> (chamico)	-	-	++	-	++	-
<i>Tanacetum parthenium</i> (santa maría)	++	++	+	++	++	-
<i>Centropogon cornutus</i> (arco sacha)	++	+	+++	++	-	+
<i>Melia azedarach</i> L. (árbol del Neem)	++	+	+	-	++	-
<i>Tephrosia cinerea</i> (sacha barbasco)	-	-	-	-	+++	++
<i>Ricinus communis</i> (tártago)	++	+	-	-	++	++

Anexo 18. Cuantificación de alcaloides de extractos acuosos liofilizados de plantas biocidas. Estudio Integrado de Plantas Biocidas del Algodonero. Instituto. De Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM. Perú; 2010.

Nombre vulgar	Nombre científico	% de Alcaloides Totales (mg de alcaloides / 100 g de liofilizado)
Huaca	<i>Clibadium sp</i>	0,053 mg% expresados en harmalina.
Sachahuaca 1	<i>Chromolaena laevigata</i>	0,053 mg% expresados en harmalina.
Chamico	<i>Datura stramonium</i>	0,71 mg% expresados en escopolamina.
Amasisa I	<i>Erythrina ulei</i>	0,66 mg% expresados en erisodina
Legía	<i>Cissampelos grandifolia</i>	0,18 mg% expresados en nicotina.
Paico	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	0,040 mg% expresados en anabasina.
Santa María	<i>Tanacetum parthenium</i>	0,14 mg% expresados en piperina.
Árbol del Neem	<i>Melia azedarach</i>	Cantidad no significativa.
Tartago	<i>Ricinus communis</i>	0,020 mg% expresados en ricinina.
Sacha Barbasco	<i>Tephrosia cinerea</i>	0,080 mg% expresados en 1-Desoximanojirimicina
Phaseolus	<i>Phaseolus vulgaris</i>	0,056 mg% expresados en n-metil-agmantina.
Catahua	<i>Hura crepitans</i>	0,04 mg% expresados en ricinina.
Sachahuaca 2	<i>Clibadium sp. 1</i>	0,053 mg% expresados en harmalina.
Chirimoya	<i>Annona cherimola</i>	0,25 mg% expresados es isocompalmina
Barbasco del Monte	<i>Lonchocarpus nicou</i>	0,1 mg% expresados en 1-Desoximanojirimicina.
Plátano del monte	<i>Porcelia nitidifolia</i>	1,37 mg% expresados en isocompalmina.
Laurel rosa	<i>Nerium oleander</i>	Cantidad no significativa.

Anexo 19. Matriz de consistencia

TÍTULO: Genotoxicidad *in vitro* de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”. Ayacucho, 2016.

PERSONAL INVESTIGADOR: Bach MARTINEZ FERNANDEZ, Joel Caroy

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	MARCO TEÓRICO	VARIABLES	METODOLOGÍA
Genotoxicidad <i>in vitro</i> de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”. Ayacucho, 2016.	¿Cuál será la genotoxicidad <i>in vitro</i> de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”. Ayacucho, 2016?	<p>General Determinar la genotoxicidad <i>in vitro</i> y de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”.</p> <p>Específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> Identificar los metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico o de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”. Determinar las concentraciones del extracto hidroalcohólico o de hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”. 	Las hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”, presentan genotoxicidad a determinadas concentraciones del extracto hidroalcohólico.	<p>Aspectos Botánicos <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”: Clasificación taxonómica, Descripción Botánica, Composición Química, Actividades Biológicas.</p> <p>Genotoxicidad. Lagenotoxicidad, es la capacidad para causar daño al material genético por agentes físicos, químicos o biológicos; el daño en el material genético incluye no sólo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula.</p>	<p>Variables independientes: Las hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”.</p> <p>Indicador:</p> <ul style="list-style-type: none"> Metabolitos secundarios. Concentración miligramos por mililitro (mg/ ml) del extracto hidroalcohólico. <p>Variable dependiente: Efectos genotóxicos <i>in vitro</i> de las hojas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”.</p> <p>Indicador:</p> <ul style="list-style-type: none"> Fragmentación del Ácido desoxirribonucleico (ADN). 	<p>Tipo de investigación : Básica – experimental.</p> <p>Diseño Experimental: El experimento se realiza bajo la guía del modelo <i>in vitro</i> para estudiar la actividad genotóxica.</p> <p>Población: <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”, que crece en los diferentes pisos ecológicos de la ciudad de Ayacucho</p> <p>Muestra:</p> <ul style="list-style-type: none"> Dos Kg de hojas frescas de <i>Datura stramonium</i> L. “chamico”. <p>Unidad experimental:</p> <ul style="list-style-type: none"> ADN de linfocitos humano a 1500 ng/μL por ensayo. <p>Análisis estadístico Los datos fueron analizados utilizando paquete estadístico SPS versión 22, empleando la prueba de Kruskal-Wallis.</p>