

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Toxicidad aguda y genotoxicidad del extracto
hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum
bicolor* Lindl “sacato” en *Mus musculus* “ratón”.

Ayacucho 2018

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA

Presentado por la:

Bach. TINEO CANALES, Mónica Miryan

Ayacucho - Perú

2019

A mis padres Moisés y Maura por darme
la vida y amor
A mis hermanos: Yuri, Tait, Deisson,
Katia, Camila y Leylani.
A Félix Jhon, por brindarme su amor,
apoyo y comprensión.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga forjador de excelentes profesionales al servicio de la sociedad y del país.

A la Facultad de Ciencias de la Salud y a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y a sus docentes quienes con tanta generosidad han compartido sus conocimientos y que con su sabiduría han sido escultores de mis conocimientos.

A mi asesor Dr. Q.F. Edwin Carlos, Enciso Roca, por su valioso asesoramiento y apoyo en la conducción del presente trabajo de investigación.

A todos aquellas personas que de alguna manera colaboraron en la realización de la presente investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes del estudio	3
2.2. <i>Odontoglossum Bicolor Lindl "sacato"</i>	10
2.3. Tóxico	11
2.4. Toxicidad	11
2.5. Genotoxicidad	12
2.6. Micronúcleos	13
2.7. Método para evaluar la toxicidad aguda y genotoxicidad	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Ubicación del trabajo de investigación	19
3.2. Definición de la población y muestra	19
3.3. Metodología y recolección de datos	19
3.3.1. Recolección de la muestra	19
3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico	20
3.4. Tipo y diseño de investigación	23
3.5. Análisis de datos	23
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN	31
VI. CONCLUSIONES	37
VII. RECOMENDACIONES	39
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS	47

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Criterios definidos por el <i>HUMN</i> para considerar una célula apta para el análisis estadístico.	17
Tabla 2. Identificación fitoquímica de los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontoglossum bicolor Lindl</i> “sacato” Ayacucho 2019.	26
Tabla 3. Comportamiento general de los ratones a la dosis de 2000 mg/kg con extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontoglossum bicolor Lindl</i> “sacato” Ayacucho 2019.	27

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Variación del peso corporal de los ratones por efecto de la administración de 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontontoglossum bicolor Lindl</i> "sacato" Ayacucho 2019.	28
Figura 2. Porcentaje de micronúcleos analizados en sangre periférica de ratón por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontontoglossum bicolor Lindl</i> "sacato" Ayacucho 2019.	29

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de identificación botánica de <i>Odontontoglossum bicolor Lindl</i> “sacato” Ayacucho 2019.	48
Anexo 2. Certificado de descripción botánica de <i>Odontontoglossum bicolor Lindl</i> “sacato” Ayacucho 2019.	49
Anexo 3. Flujograma de equipo para la obtención del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontontoglossum bicolor Lindl</i> “sacato” Ayacucho 2019.	50
Anexo 4. Flujograma de equipo para la determinación de la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontontoglossum bicolor Lindl</i> “sacato” Ayacucho 2019.	51
Anexo 5. Flujograma de equipo para la determinación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontontoglossum bicolor Lindl</i> “sacato” Ayacucho 2019.	52
Anexo 6. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontontoglossum bicolor Lindl</i> “sacato” Ayacucho 2019.	54
Anexo 7. Variación del peso de los animales administrados con extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontoglossum bicolor Lindl</i> “sacato” por vía oral en la evaluación de la toxicidad aguda. Ayacucho 2019.	55
Anexo 8. Variación del peso de los animales usados como control en la evaluación de la toxicidad aguda de los pseudobulbos de <i>Odontoglossum bicolor Lindl</i> “sacato”. Ayacucho 2019.	56
Anexo 9. Resultados del ensayo de micronúcleos en eritrocitos y médula ósea de ratón por efecto del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontoglossum bicolor Lindl</i> “sacato”. Ayacucho 2019.	57
Anexo10. Análisis de varianza del peso de los ratones en la evaluación de la toxicidad aguda de <i>Odontoglossum bicolor Lindl</i> “sacato”. Ayacucho 2019.	58

Anexo 11.	Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett de la variación de pesos de los ratones en la evaluación de la toxicidad aguda de <i>Odontoglossum bicolor Lindl</i> “sacato”. Ayacucho 2019.	59
Anexo 12.	Análisis de varianza del porcentaje de micronúcleos en la evaluación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontoglossum bicolor Lindl</i> “sacato” en sangre periférica. Ayacucho 2019.	60
Anexo 13.	Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett del porcentaje de micronúcleos en la evaluación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontoglossum bicolor Lindl</i> “sacato” en sangre periférica. Ayacucho 2019.	61
Anexo 14.	Matriz de consistencia.	62

RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó con el objetivo de evaluar la toxicidad aguda y genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato". Se realizó en los laboratorios de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga durante los meses de Noviembre de 2018 a Marzo del 2019. La investigación fue de tipo básico-experimental. La obtención del extracto hidroalcohólico se realizó por maceración con etanol al 80 % por 7 días. La toxicidad aguda se evaluó por el método de dosis límite a 2000 mg/kg de peso y el efecto genotóxico por la prueba de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos test N°474 de la OECD. A las dosis de 200, 400, 800 mg/kg, se usó NaCl 0.9 % como control y la ciclofosfamida como inductor de micronúcleos. Los metabolitos secundarios presentes fueron: flavonoides, catequinas, compuestos fenólicos, taninos y saponinas. En el ensayo de toxicidad aguda los resultados demostraron la inocuidad del extracto al no observarse síntomas de manifestación tóxica, ni alteración en el desarrollo del peso corporal, ubicándose la DL50 por encima de 2000 mg/kg y clasificándose como categoría 5 en el rango de toxicidad. En los estudios de genotoxicidad no hubo variación estadística en comparación con el control negativo del porcentaje de micronúcleos en sangre periférica ($p > 0,05$). Se concluye que el extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato" no presenta efecto genotóxico por ensayo de micronúcleos en ratones.

Palabras clave: *Odontoglossum bicolor Lindl*, toxicidad aguda, genotoxicidad, micronúcleos.

I. INTRODUCCIÓN

El estudio y la utilización de las plantas medicinales y medicamentos herbolarios han tenido un marcado y ascendente auge en el ámbito mundial a partir que la Organización Mundial de la Salud (OMS) llamó a introducir estos recursos medicinales en los sistemas de salud en 1977^{1,2}. Así mismo la OMS ha recomendado la promoción de la medicina tradicional y las plantas medicinales, esto debido a que en los países en vías de desarrollo la medicina tradicional a menudo es el único modo de tratamiento accesible y económicamente factible para la población³. En la actualidad no existe duda sobre la importancia de las plantas y a pesar del desarrollo alcanzado por la síntesis química, las plantas constituyen un valioso arsenal terapéutico. El uso de las plantas medicinales en la terapéutica requiere, al igual que los productos sintéticos, de investigaciones previas y posteriores a su comercialización, donde sigan siendo observadas mediante estudios de farmacovigilancia⁴.

Por ello se hace necesario de estudios toxicológicos y genotóxicos de los extractos fluidos, acuosos, tinturas y liofilizados de las plantas. Las pruebas toxicidad se realizan con el fin de identificar posibles daños para el ser humano debido a que, se ha detectado extracto de plantas medicinales que poseen actividad embriotóxica y/o teratogénica⁵.

Entre los efectos que pueden dañar el material hereditario, se puede señalar las mutaciones génicas y las aberraciones cromosómicas, las cuales pueden producir transformaciones malignas e incluso la transmisión de alteraciones genéticas a la descendencia⁶. Los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* es consumida directamente para controlar la presión alta, dolor de pie, diabetes, limpieza de los riñón (diurético) y gastritis (anexo 2). Debido a que el uso de la planta es de manera empírica, es necesario realizar estudios farmacológicos y toxicológicos para asegurar que su uso sea seguro para la salud de la población que la consume. Es por ello que el estudio se centrara en determinar la toxicidad aguda y genotoxicidad al extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos *Odontoglossum*

bicolor Lindl “sacato”, mediante el método de dosis fija a dosis límite según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo (OECD) y el test de micronúcleos. EL ensayo de toxicidad por administración a dosis única brinda información acerca del potencial tóxico de sustancias que pueden tener interacción directa o indirecta con el hombre, por tanto son exigidas por las agencias regulatorias como parte de las evaluaciones de seguridad y de estimación de riesgo para la salud de las sustancias químicas, aditivos alimentarios y comestibles obtenidos por vías no convencionales⁷. Este ensayo tiene entre sus objetivos determinar los signos y síntomas tóxicos que se producen luego de una administración en dosis única a altas concentraciones del compuesto objeto de estudio⁸. La genotoxicidad se evaluó mediante el ensayo de micronúcleos el cual está considerado como un ensayo práctico, universalmente validado, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos⁹.

El ensayo de micronúcleos permite detectar agentes aneuploidogénicos que bloquean la polimerización de microtúbulos durante la formación del huso mitótico; originando de este modo el rezago de cromosomas completos, que no se incluyen en los núcleos hijos^{10, 11}.

Por este motivo se ha evaluado la toxicidad y genotoxicidad.

Objetivo general.

Evaluar la toxicidad aguda y genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor* Lindl “sacato” en *Mus musculus* “ratón”.

Objetivos específicos.

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor* Lindl “sacato”.
- Evaluar el efecto tóxico agudo del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor* Lindl “sacato” en *Mus musculus* “ratón”.
- Evaluar el efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor* Lindl “sacato” en *Mus musculus* “ratón”.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

La Organización Mundial de la Salud reconoce la importancia del rol que desempeña el uso y utilización de la plantas medicinales en la “Atención Primaria de la Salud”, recomienda y respalda su integración en los sistemas nacionales de salud, quienes estiman que casi el 80 % de todo los habitantes de la tierra los usan para resolver sus principales problemas de salud¹².

La familia Orchidaceae, es una de las más grandes dentro de las plantas vasculares, con alrededor de 30,000 especies, se distribuye en todos los continentes, excepto en la Antártica, el Ártico y los desiertos más secos de la tierra. Sin embargo, la mayor riqueza se halla en el trópico, sobre todo en Centro y Sudamérica donde según los catálogos florísticos y cálculos aproximados, países como Colombia, Ecuador y Perú. Para la flora peruana constituye la familia más diversa, con alrededor de 212 géneros y 2120 especies de orquídeas que representan el 88% del total de especies¹³.

Mencias y Salazar¹⁴, realizaron el estudio fitoquímico, actividad antioxidante de especies de orquídeas de los géneros *Epidendrum*, *Oncidium* y *Caucaea*. Identifico que los metabolitos secundarios más resaltantes entre todas fueron los flavonoides, triterpenos y saponinas. El género *Caucaea* y *Oncidium* presentaron reacción positiva para flavonoides y triterpenos en mayor cantidad respecto a los demás, mientras que las muestras del género *Epidendrum* presentaron saponinas en un 100 %. En el análisis de actividad antioxidante con metodología DPPH, las especies más sobresalientes fueron *Oncidium* y *Epidendrum*, la última especie se destacó por que necesito una concentración de 3,50 ppm para inhibir el 50 % de los radicales libres de DPPH presentes en una solución de ensayo.

Sut et al¹⁵, evaluaron diferentes clases de fitoconstituyentes, dentro de ellos: estilbenoides, fenantrenos, derivados fenólicos, estudiadas por sus actividades biológicas, especialmente en el campo del cáncer. Por otro lado, se menciona que se aislaron también alcaloides y terpenoides con actividad sobre el sistema nervioso central. Llegando a la conclusión que la familia Orchidaceae, es una de

las familias más grandes que represen un enorme reservorio de metabolitos secundarios bioactivos, y hasta ahora ha sido poco estudiado en general, ofreciendo nuevas oportunidades en la búsqueda de nuevas clases de productos bioactivos naturales.

Naia et al⁹, evaluaron la genotoxicidad inducida en ratones por la administración repetida de anestésicos locales, mediante el test de micronúcleos descrita por la OECD 474. Obteniéndose como resultado que la mediana del número de micronúcleos en los grupos con anestésicos locales expuestos durante uno o 5 días varió de 0 a 1; en el grupo expuesto a la ciclofosfamida fue de 10 y en el grupo control negativo en el primero y quinto día fue de 1 y 0 respectivamente ($p < 0,0001$). Concluyendo que no se observó ningún efecto de genotoxicidad tras la exposición repetitiva a ninguno de los anestésicos locales evaluados.

Chowdhury et al¹⁶, evaluaron en el 2014 la actividad anticonceptiva y citotóxica de *Vanda tessellata Roxb* (orquídea medicinal), el método fue la administración oral de extractos de hojas de *V. tessellata* acuoso (VTA) y metanol a dosis de 200 y 400 mg / kg de peso corporal, para determinar la actividad antinociceptiva se realizó las prueba en ratones: contorsión inducida por ácido acético, placa caliente y la inmersión en la cola. En este estudio también se examinó la citotoxicidad de los extractos mediante el ensayo de letalidad de la salmuera del camarón (*Artemia salina*). Se observó una citotoxicidad muy baja en el ensayo de letalidad de camarones de salmuera. Llegando a una conclusión que el extracto de la hoja tiene una actividad antinociceptiva potencial con una citotoxicidad mínima.

Rivadeneira et al⁷, realizaron estudios de toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de la planta *Chuquiraga jussieui*, administrado vía oral en ratas. Evaluaron la toxicidad por administración oral a dosis única de un extracto hidroalcohólico concentrado de la planta *Chuquiraga jussieui*. El estudio se realizó en ratas de la línea *Sprague Dawley* (Cenp:SD) y se aplicó el método de dosis fija a dosis límite OECD 4235. El extracto se administró por vía oral en dosis única de 2000 mg/kg en un volumen de 20 mL/kg de peso corporal. No se observaron signos de toxicidad durante los 14 días post administración en los animales en estudio. Hubo ganancia de peso en todos los animales del grupo. No se apreciaron lesiones anatomopatológicas macroscópicas en los animales tratados con la dosis del producto de ensayo. El extracto hidroalcohólico concentrado de la planta *Chuquiraga jussieui* se catalogó como No Clasificado según la metodología de la OMS y como Categoría 5 por la GHS, OECD, por lo que se considera de muy baja toxicidad vía oral.

Ávila et al⁸, evaluaron la toxicidad aguda a dosis fijas del extracto de *Werneria Dactylophylla* (Pupusa) realizaron un estudio con el objeto de evaluar el posible efecto tóxico para el cual se utilizó el procedimiento de dosis fijas, utilizando dosis límite de 2000 mg/Kg y 5000 mg/kg de peso corporal, administradas por vía orogástrica, con observación de 14 días. Los animales seleccionados fueron ratones Swiss albinos hembras con un pesos comprendido entre 18 y 20 g. La metodología y el diseño experimental se llevó a cabo siguiendo la orientación descrita por la norma EPA (Agencia de Protección Ambiental) 870.1100, OECD 425 (Organización Económica para el Comercio y Desarrollo), que abarca las 24 naciones más desarrolladas del mundo, para la aplicación del método de las Clases de Toxicidad Aguda (CTA). Los resultados demostraron la inocuidad de la planta al no observarse signos ni síntomas de toxicidad. El peso corporal se comportó acorde a la curva de crecimiento de la especie y no aparecieron alteraciones macroscópicas en los órganos estudiados.

Neira¹⁷, evaluó el “Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antioxidante del extracto de cloroformo de la orquídea comestible *Prosthechea michuacana*, utilizando el método de decoloración β - caroteno y la decoloración del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), demostrando que tiene buena actividad antioxidante en los extractos de cloroformo de raíz y bulbo con un valor de Ec_{50} $174,68 \pm 3,72 \mu\text{g/ml}$; $310,96 \pm 4,17 \mu\text{g/ml}$ respectivamente, usando como control positivo el ácido ascórbico con un Ec_{50} $122,25 \mu\text{g/ml}$. El análisis fitoquímico cualitativo del extracto metanólico del pseudobulbo y raíz presentaron prueba positiva de coloración para compuestos fenólicos, flavonoides y negativos para alcaloides.

Cervantes¹⁸, realizó un estudio de “Evaluación farmacológica de *Prosthechea michuacana* (Orchidaceae), especie potencial agronómico” donde evaluó la actividad antiinflamatoria, cicatrizante e hipoglucemiante de los extractos de hexano, cloroformo y metanol a partir de hojas, rizomas y pseudobulbos de *Prosthechea michuacana* (Orchidaceae), empleando para ello el modelo de edema inducido con TPA, heridas quirúrgicas y ratones *Wistar* normoglucémicos respectivamente. Los resultados mostraron propiedades antiinflamatorias de los extractos provenientes de hojas-cloroformo, rizoma-hexano, pseudobulbo-hexano y pseudobulbo-metanol; las propiedades cicatrizantes se encontraron en los extractos de rizoma y pseudobulbo con cloroformo, hexano y metanol, así como propiedades hipoglucemiantes de los extractos hojas-cloroformo, hojas-hexano, rizoma cloroformo, rizoma-hexano, rizoma-metanol, pseudobulbo-cloroformo y

pseudobulbo-agua a una concentración de 200 mg/kg de peso. Concluyendo que *Prosthechea michuacana* presenta actividad antiinflamatoria, cicatrizante e hipoglucemiante.

Alonso et al¹⁹, determinaron la toxicidad subcrónica en ratas wistar mediante la administración oral de una tintura de orquídea silvestre (*Oncidium luridum Lindl*). La experiencia duro 45 días; se realizó examen físico diario individual y se controló semanalmente el consumo de agua, alimentos y peso corporal. El experimento no evidencio signos de intoxicación el cual se evidencio con el examen histopatológico que no arrojó lesiones toxicas. Concluyéndose que esta planta carece de efecto tóxico según el modelo experimental.

Godos y Bárdales²⁰, realizaron el tamizaje fitoquímico y actividad toxicológica del extracto etanólico de las hojas de *Momordica charantia Linn* "papailla", con el objetivo de conocer la presencia de metabolitos secundarios y el potencial toxicológico agudo en ratones albinos de acuerdo a los resultados obtenidos registramos varios metabolitos secundarios de los cuales se encontró moderada presencia de alcaloides, triterpenos y esteroides, posteriormente se determinó la toxicidad aguda oral mediante el método de clases toxicas agudas, encontrando que no hubo variación de los pesos, no se halló signos de toxicidad, como parte final se sacrificó a los ratones para la observación macroscópica no encontrando diferencias significativas. Se concluyó en el estudio las hojas de *Momordica charantia Linn* "papailla" no tienen efecto nocivo en los animales de experimentación.

Pérez y Quispe²¹, evaluaron la toxicidad aguda, genotoxicidad y efecto teratogénico del extracto acuoso liofilizado de las semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi, Chocho), en ratas, realizaron estudios de Toxicidad aguda, Genotoxicidad y Teratogenicidad, con el objetivo de determinar los efectos adversos que pudieran producirse tras la administración por vía oral mediante intubación forzada de dosis prefijadas del extracto acuoso liofilizado de *Lupinus mutabilis Sweet* (LmS). Los métodos empleados fueron los descritos por Lorke para determinar la Toxicidad aguda, las normas OCDE N° 474 y 414 para evaluar la Genotoxicidad y Teratogenicidad respectivamente. Por lo que, el extracto evaluado se clasificó como: Sustancia que no provoca daño citotóxico y genotóxico en células de médula ósea de rata, si es ingerida por vía oral. Llegando a la conclusión que el extracto acuoso liofilizado de las semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi, Chocho); no es genotóxico, ni teratogénico administrado

por vía oral y tiene una DL50 de 3808 mg/Kg la cual la clasifica como atóxica bajo las condiciones experimentales.

Cruz²², realizó un trabajo de investigación de, Genotoxicidad de cloroquina en *Mesocricetus auratus* "hámster". El presente estudio tuvo como finalidad evaluar la genotoxicidad de cloroquina mediante el análisis de micronúcleos y alteraciones cromosómica en células de médula ósea y el ensayo de anomalías en los espermatozoides de *Mesocricetus auratus*. Se trabajó con un control negativo (agua destilada estéril), un control positivo (50 mg/Kg/pc ciclofosfamida) y tres grupos experimentales tratados con cloroquina a razón de 250, 300 y 350 mg/Kg. pc. Se concluye que Cloroquina es genotóxico para células de médula ósea e induce alteraciones en la morfología de los espermatozoides de *M. auratus* y puede representar un riesgo para la salud humana.

Damián²³, realizó un trabajo titulado Composición de la familia Orchidaceae en el Sector Setapo de la Reserva Comunal Amarakaeri (Manu-Madre de Dios). En el presente estudio, se determinó la diversidad alfa de la familia Orchidaceae en la Reserva Comunal Amarakaeri (Sector Setapo) en Madre de Dios; además se estableció el estado de conservación y endemismo de las orquídeas, siendo los géneros *Epidendrum* (8 spp.) y *Dichaea* (6 spp.). Los que muestran la mayor riqueza. Por su parte, el análisis del estado de conservación y endemismo reporta 5 especies en estado Vulnerable (VU) y 4 especies restringidas solo al Perú, categorizadas como en peligro (EN) y en peligro crítico (CR). Finalmente, como resultado adicional, se listan 2 nuevos registros para el país: *Anathallis rabei* (Foldats) Luer, vel sp aff. y *Masdevallia posadae* Luer & R. Excoibar, llegando a la conclusión que la familia Orchidaceae representa más del 70 % de todos los epífitos vasculares, llegando a constituir en el país, el grupo de plantas más diversa para la flora peruana (>2800 especies).

Eustaquio²⁴. En su trabajo de investigación tuvo como objetivo demostrar la genotoxicidad de fenitoína en eritrocitos policromáticos (EPC) de *Rattus norvegicus cepa Holtzman*, mediante la prueba de micronúcleos. Se establecieron cinco grupos de cinco especímenes cada uno, un grupo de control negativo (SSF), tres grupos experimentales tratados con fenitoína (5; 7,5 y 10 mg/kg PC), los tratamientos a estos grupos fueron diariamente por vía intraperitoneal durante 14 días; un grupo control positivo con ciclofosfamida (50 mg/kg PC) tratado vía intraperitoneal por 24 horas. Se determinó la frecuencia de EPC micronucleados en un total de 2000 por animal. Los resultados muestran incremento significativo del índice de genotoxicidad de fenitoína ($4,62 \pm 0,54$; $5,39 \pm 0,43$; $5,49 \pm 0,41$) y

ciclofosfamida ($8,18 \pm 0,29$), respecto al grupo control negativo ($0,08 \pm 0,15$); se evidenció aumento significativo de la frecuencia de EPC micronucleados en los individuos tratados con fenitoína ($92,4 \pm 10,89$; $107,8 \pm 8,52$; $109,8 \pm 8,11$) y con ciclofosfamida ($163,6 \pm 5,77$), en razón al grupo control negativo ($1,6 \pm 3,05$), observándose variación en el tamaño y número de micronúcleos. Se concluye que fenitoína posee efecto genotóxico micronucleados.

Aquino²⁵, evaluó el potencial tóxico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R & P) Don. “huamanpinta, para garantizar como agente terapéutico. Evaluó la toxicidad aguda oral y efecto genotóxico en ratones, con un modelo experimental por el método de toxicidad a dosis límite de 2000 mg/kg y test de micronúcleos respectivamente según las directrices de la OECD. La genotoxicidad se evaluó en sangre periférica y médula ósea a diferentes concentraciones de extracto: 100, 250 y 500 mg/kg, como control negativo se usó NaCl 0,9 % 10 mL/kg y una sustancia de referencia para la inducción de micronúcleos (ciclofosfamida 40 mg/kg disuelto en NaCl 0,9 %), en el ensayo de toxicidad aguda no se observaron signos de toxicidad durante los 14 días post administración en los animales. En cuanto a los estudios de genotoxicidad no hubo variación estadística significativa del porcentaje de micronúcleos en sangre como en médula ósea en comparación con el control negativo. Por tanto se concluye que en las condiciones experimentales el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* (R & P) Don. “huamanpinta” no presentan toxicidad aguda y efecto genotóxico por ensayo de micronúcleos en ratones.

Enciso y Aguilar²⁶, evaluaron el efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico y del aceite esencial extraídos de las hojas en ratones. El ensayo de toxicidad aguda oral se llevó a cabo en ratones mediante el método de dosis límite a 2000 mg/kg de peso y el efecto genotóxico mediante la inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón, según el test N° 474 de la OECD. El ensayo de toxicidad aguda no mostró signos tóxicos ni causó la muerte de los animales ni alteración en el peso corporal clasificándose en la categoría 5. En los estudios de genotoxicidad no hubo variación estadística significativa en comparación con el control negativo del porcentaje de micronúcleos en sangre como en médula ósea. Se concluye que el extracto hidroalcohólico y aceite esencial de *Satureja brevicalyx* “wayra muña” no presentan efecto genotóxico por ensayo de micronúcleos en ratones.

Marca²⁷, en su trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la evaluación preliminar de la genotoxicidad in vitro del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum* L. “ajo”; la determinación genotóxica se realizó a diferentes

concentraciones, exponiéndose éstos frente al ADN de *Staphylococcus sp.* 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; el extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum L.* “ajo” a concentraciones de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500mg/mL, no presentó efecto genotóxico frente al ADN genómico de *Staphylococcus sp.*; mientras que el zumo del bulbo del “ajo”, a concentraciones de 5, 10, 50 y 100 %, si presentó un potente efecto genotóxico. Se llegó a la conclusión, que el zumo del bulbo de *Allium sativum L.* “ajo”, presenta una potente actividad genotóxica frente al ADN genómico de *Staphylococcus sp.*

Rudas²⁸, evaluó el Efecto antiulceroso del extracto acuoso de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* “sacato” en *Cavia porcellus*. Para la evaluación del efecto antiulceroso, se aplicó la técnica descrita por Arroyo y Cisneros, a dosis de 400, 600 y 800 mg/kg de extracto. Se indujo ulcera gástrica con histamina 50 ug/kg mediante el modelo de ligadura de píloro. Se usó como fármaco de referencia a la ranitidina 50 mg/kg. Las principales medidas de resultados fueron el pH y volumen del contenido gástrico. La evaluación macroscópica fue mediante la escala de Marhuenda. Los resultados indican que el extracto acuoso del pseudobulbo de *Odonthoglosum bicolor Lindl.* “sacato” tiene compuestos fenólicos, tales como flavonoides y taninos, cumarinas, saponinas, triterpenos, azúcares reductores y alcaloides. El tratamiento con el extracto produjo una inhibición de las lesiones gástricas respectivamente ($p < 0,05$) y el estándar ranitidina 87,75% de inhibición de las lesiones gástricas. El valor de pH analizado fue de 2,89; 3,43 y 3,49 para los tratamientos con el extracto y el volumen de contenido gástrico de 14,81; 12,66 y 11,32 mL respectivamente. En el grupo de la ranitidina se obtuvo un pH de 3,64 y 10,55 mL de contenido gástrico. Por tanto se concluye que en las condiciones experimentales el extracto acuoso del pseudobulbo de *Odonthoglosum bicolor Lindl.* “sacato” presenta efecto antiulceroso según el modelo experimental en cobayos.

Cabana²⁹, determinó la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl.* “Sacato”. La actividad diurética se determinó utilizando el método de Naik y col; en la que se empleó 30 cobayos machos, a los cuales se administró agua destilada 25 mL/kg, furosemida 20 mg/kg, espironolactona 25 mg/kg y 100, 200 y 400 mg/kg de peso hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl.* Luego de administrada las dosis correspondientes se sometieron en la jaula de diuresis por un periodo de

cuatro horas midiendo el volumen excretado en cada hora. Los metabolitos secundarios encontrados fueron: flavonoides, catequinas, compuestos fenólicos, taninos y saponinas. El volumen de orina excretado por los grupos experimentales superó al excretado por el agua destilada. La actividad diurética se expresa de acuerdo a la escala como moderada a la dosis de 400 mg/kg de peso de $0,8 \pm 0,07$ de actividad diurética comparada al estándar furosemida y alta de $1,36 \pm 0,2$ de actividad diurética en relación al estándar la espironolactona. Con respecto a las concentraciones de sodio no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) y las concentraciones de potasio se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Se concluye que el extracto hidroalcohólico posee actividad diurética moderada en relación a furosemida y es un ahorrador de potasio comparado con la espironolactona, el efecto es dosis dependiente.

2.2. *Odontoglossum bicolor* Lindl “sacato”

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	LILIOPSIDA
SUB CLASE	:	LILIIDAE
ORDEN	:	ORCHIDALES
FAMILIA	:	ORCHIDACEAE
GÉNERO	:	<i>Odontoglossum</i>
ESPECIE	:	<i>Odontoglossum bicolor</i> Lindl
N.V	:	“sacato”

Fuente: Certificado emitido por la bióloga Laura Aucasime Medina, especialista en taxonomía y sistemática de plantas (Anexo 1)

2.2.2. Descripción botánica.

Es una planta herbácea perenne, acaule, de hábito terrestre, de tamaño pequeño, presenta numerosas pseudobulbos elipsoidales, ovoides de donde emergen raíces fasciculadas o fibrosas; hojas lineales, oblongolanceoladas, coriáceas, de nervaduras paralelas, atenuadas al peciolo, dísticas que nacen 2 hojas de cada bulbo. Inflorescencia en panícula con el eje erecto o arqueado, delgado y flexible de 60 -120 cm de largo, las ramas del eje cortas, con 6 a 8 flores como promedio. La inflorescencia nace del pseudobulbo maduro a través de la axila de la vaina de la hoja; las flores son bisexuales homoclamídeas, son perigonio corolino, los tépalos externos de un color marrón rojizo y los tépalos internos de un color amarillo entero, el labelo, que es el tépalo más grande y espolonada está provisto

de un diente en la parte media a manera de una lengua; Ovario ínfero tricarpelar, trilocular. Fruto cápsula, trigonal, con numerosas semillas pequeñas de color marrón oscuro. (Anexo 2)

2.2.3. Hábitat y distribución geográfica.

Son plantas de habito terrestre, originario de Sudamérica, crecen en terrenos pedregosos en laderas de la zona alto andina de 2700 - 3500 msnm, florecen en primavera (setiembre a octubre). (Anexo 2)

2.2.4. Uso en medicina tradicional

Los pobladores de la zona alto andina consumen los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl.* “sacato” para controlar la diabetes y otros males. (Anexo 2)

2.2.5. Composición química

Según Cabana D y Rudas A. Los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* “sacato” contiene los siguientes metabolitos secundarios: flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, cumarinas, saponinas, triterpenos, azúcares reductores y alcaloides^{28, 29}.

2.3. Tóxico

Sustancia química o biológica que en contacto con un organismo es capaz de producir algún efecto nocivo (orgánico, genético, molecular, funcional, celular o bioquímico) sobre los equilibrios dinámicos que sustentan la vida de ese organismo, como consecuencia de lo cual se menoscaba su salud pudiendo provocar incluso la muerte^{30, 31}.

2.4. Toxicidad

Se entiende por “toxicidad” a la cantidad de una sustancia que, bajo un conjunto específico de condiciones, causa efectos perjudiciales. La toxicidad indica la potencia de una sustancia venenosa y no la afección producida por esta (concepto que corresponde a “intoxicación” o “envenenamiento”). La toxicidad se expresa como la cantidad de la sustancia en mg/Kg de peso vivo que origina efectos biológicos determinados, en un tiempo dado y en una especie establecida. Existen diversos indicadores de toxicidad, siendo uno de los más usados la “dosis letal 50” (DL₅₀); este es un indicador estadístico de toxicidad aguda, el cual señala la cantidad del tóxico que causa la muerte del 50 % de los animales intoxicados. Con el nombre de “CL₅₀” (concentración letal 50) se proyecta el indicador anterior a la toxicidad de un gas en el aire, aunque se suele referir al agua^{30, 31}.

2.4.1. Toxicidad aguda.

Capacidad de una sustancia para producir efectos adversos dentro de un corto plazo de tiempo (usualmente 24 horas, pero se admite hasta 14 días) después de la administración de una dosis única (o una exposición dada) o tras dosis o exposiciones múltiples en 24 h³².

2.4.2. Toxicidad crónica

Capacidad de una sustancia para producir efectos adversos consecuentes a una exposición prolongada; estos pueden aparecer durante o después de interrumpida la exposición. Dicho de otra manera es la toxicidad acumulativa de sustancias químicas a largo plazo³².

2.4.3. Toxicidad subcrónica. Efectos adversos ocasionados por administración o exposición repetida de una sustancia durante un corto periodo de tiempo, usualmente el 10 % de la vida (al menos 90 días en animales)^{32,33}.

2.5. Genotoxicidad

La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos adversos no solo en el ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula³⁴. Ejemplo de estos últimos 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 mutágeno o carcinógeno³⁵.

2.5.1. Clases de daño genético

2.5.1.1. Mutaciones de genes

También denominados mutaciones de punto, son cambios en la secuencia del ADN en un gen; típicamente se detectan con base en los cambios que producen en el fenotipo. Las dos clases principales de mutaciones de genes son sustituciones de pares de bases y mutaciones por desplazamiento de marco. En una sustitución de par de bases, un par de bases en el ADN (por ejemplo, G: C) queda remplazada por otro (por ejemplo A: T). Las sustituciones de par de bases se denominan transiciones si la orientación de purina a pirimidina del par de bases permanece igual. En contraste, una sustitución de par de bases en la cual una purina queda reemplazada por una pirimidina (y viceversa) se denomina una transversión³⁵.

En una mutación por desplazamiento de marco, el producto de gen queda gravemente alterado porque cada triplete se cambia en el ARN mensajero después del punto de la mutación³⁵.

2.5.1.2. Aberraciones de cromosomas. Son cambios en la estructura o el número de cromosomas que implica una variación en la organización de los genes. Las que suponen pérdida o duplicación de segmentos o pares del cromosoma. Esta alteración se detecta mediante microscopía óptica de los cromosomas en metafase en células preparadas apropiadamente³⁵.

Las mutaciones cromosómicas se originan por la rotura espontánea de los cromosomas. Este fenómeno a veces se incrementa por las condiciones ambientales o por agentes mutágenos pueden ser de varios tipos:

- **Delecciones:** Consiste en la pérdida de un segmento cromosómico y por tanto la pérdida de la parte de la información genética contenida en él. Normalmente si la delección es grande se pierden muchos genes y tiene consecuencias patológicas o incluso letales para el individuo que la sufra.
- **Duplicación:** consiste en la repetición de un segmento cromosómico de mayor o menor extensión. La réplica puede encontrarse en el mismo cromosoma o en otro distinto.
- **Inversiones:** consiste en el cambio de sentido de un fragmento en el cromosoma. No suelen tener repercusiones negativas ni positivas para el individuo que la sufre puesto que no pierde información genética, sólo cambia de orden. Pero si puede provocar aparición de mutaciones en los gametos formados por el individuo portador.
- **Translocación:** Un segmento cromosómico de un cromosoma se encuentra situado en otro cromosoma.

2.6. Micronúcleos

Los micronúcleos (MN) son corpúsculos citoplasmáticos esférico, detectados en interfase, más pequeños y con las mismas características morfológicas que el núcleo celular, se originan por la pérdida de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros durante la división nuclear, se forman espontáneamente o por causa de agentes genotóxicos³⁶.

Los MN reflejan aberraciones cromosómicas y son expresados en células en división que contienen rupturas de cromosomas por pérdida de los centrómeros (fragmentos acéntricos) y/o pérdida de cromosomas completos, en ambos casos son incapaces de viajar con el resto de los cromosomas a través del huso mitótico,

a los polos del núcleo celular durante el anafase de la división celular. En la telofase las estructuras cromosómicas son envueltas por la membrana nuclear y tanto los cromosomas completos, como los fragmentos de cromosomas retardados, asumen gradualmente la morfología de un núcleo en interfase con la excepción de que son más pequeños que el núcleo principal de la célula, de aquí el término de MN³⁶.

Durante la división celular el material genético (ADN) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea durante la replicación y posterior división del ADN, a roturas cromosómicas y al efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y haciendo que el reparto del material no sea equitativo. Cuando esto ocurre, el material genético que se desprende y que por tanto, queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que es denominado “micronúcleo” (MN), visible fácilmente a microscopio óptico. El material genético desprendido puede derivar de cromosomas enteros o, más frecuentemente, de fragmentos cromosómicos acéntricos que quedan excluidos de los núcleos de las nuevas células durante a anafase mitótica³⁶.

2.7. Método para evaluar la toxicidad aguda y genotoxicidad.

2.7.1. Método para evaluar la toxicidad aguda

método de dosis límite OECD 423. El método de toxicidad a dosis límite está referido como el estudio cualitativo y cuantitativo de los fenómenos tóxicos y su aparición en función del tiempo tras la administración de una dosis única de la sustancia o de varias dosis fraccionadas en el transcurso de 24 horas^{8, 37}. Brinda información acerca del potencial tóxico de sustancias que pueden tener interacción directa o indirecta con el hombre, por tanto son exigidas por las agencias regulatorias como parte de las evaluaciones de seguridad y de estimación de riesgo para la salud de las sustancias químicas, medicamentos, plaguicidas, aditivos alimentarios y comestibles obtenidos por vías no convencionales. Este ensayo tiene entre sus objetivos determinar los signos y síntomas tóxicos que se producen luego de la administración en dosis única a altas concentraciones del compuesto objeto de estudio, así como definir la concentración del mismo que provoca la muerte de los animales sometidos a estudio⁷.

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

El ensayo de micronúcleos está incluido actualmente dentro de la batería de estudios toxicológicos obligatorios exigidos por las agencias reguladoras, tales como la Organización para la Cooperación y el Desarrollo (OECD)³⁸.

La prueba de micronúcleos, es un método utilizado para la detección del daño genotóxico, producido por diferentes sustancias químicas y agentes físicos. Esta indica el daño de agentes mutagénicos sobre los cromosomas, mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados³⁸. Es decir este sistema permite registrar *in vivo* la capacidad de las sustancias químicas de inducir rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas.

Según la OECD, La prueba de micronúcleos se usa para la detección de daño inducido a los cromosomas o al aparato mitótico de eritroblastos de mamíferos roedores, mediante el análisis de eritrocitos muestreados en médula ósea y/o células de sangre periférica después de la administración de una sustancia de prueba. El objetivo de esta prueba es identificar sustancias que puedan causar daño citogenético dando como resultado la formación de micronúcleos que contienen fragmentos de cromosomas rezagados o cromosomas completos. Un aumento en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en animales tratados es una indicación de daño cromosómico inducido. En el experimento los animales se exponen a la sustancia de prueba por una ruta apropiada (generalmente mediante alimentación forzada usando una cánula intragástrica, o mediante inyección intraperitoneal). La médula ósea y/o las células sanguíneas se recogen, preparan y tiñen. Las preparaciones se analizan para determinar la presencia de micronúcleos. Cada grupo tratado y de control debe incluir al menos 5 animales analizables por sexo. La administración de los tratamientos consiste en una dosis única de sustancia de prueba o dos dosis diarias (o más). La dosis límite es de 2000 mg/kg/peso corporal/día para un tratamiento de hasta 14 días, y de 1000 mg/kg/peso corporal/día para un tratamiento de más de 14 días³⁸.

El test de micronúcleos registra sólo las células binucleadas por bloqueo de la citocinesis con citocalasina B (CBMN), descartando el conteo de mononucleadas, trinucleadas, tetranucleadas, etc. Este artificio permite determinar qué células han estado expuestas al mutágeno o sustancia a probar y han pasado recientemente primera división³⁹.

La prueba de micronúcleos permite detectar agentes clastogénicos y aneuploidogénicos. Los agentes aneuploidogénicos (como colchicina, vincristina y vinblastina), se caracterizan por bloquear la polimerización de microtúbulos durante la formación del huso mitótico; originando de esta manera el rezago de cromosomas completos, que no se incluyen en los núcleos hijos. Mientras que los agentes clastogénicos, como son las radiaciones y algunos medicamentos antineoplásicos (como la ciclofosfamida, la arabinosa-c, el busulfan y el metotrexate), actúan como análogos de base. Por lo tanto, se intercalan en el ADN, e inhiben su síntesis y ocasionan posteriormente un debilitamiento de enlace entre las bases, lo que termina por producir una fractura cromosómica. Los compuestos aneuploidogénicos causan micronúcleos más grandes que los causados por los agentes clastogénicos⁴⁰.

El ensayo que utiliza médula ósea evalúa un efecto agudo de los productos químicos, pero el método que usa eritrocitos de sangre periférica de ratón puede evaluar un efecto crónico de la sustancia problema analizando los eritrocitos maduros que albergan micronúcleos hasta su vida⁴⁰.

Por lo general en los estudios de genotoxicidad in vivo se utilizan sustancias mutagénicas, dentro de las más utilizadas se encuentra la ciclofosfamida (CF) y la bleomicina (BL)⁴¹.

El animal ideal para evaluar la genotoxicidad de sustancias químicas mediante el test de micronúcleos es el ratón debido a que en la rata el micronúcleo apenas se ve en la sangre periférica, porque el bazo captura y destruye los eritrocitos, incluidos micronúcleos, de manera rápida y efectiva, al igual que sucede en los humanos. En los ratones, los eritrocitos micronucleados existen exactamente igual que las células normales en la sangre periférica⁴¹.

Ciclofosfamida. La ciclofosfamida pertenece al grupo de las cloroetilaminas. Con el desarrollo de este agente se logró mayor selectividad de la droga hacia el tejido tumoral, considerado un agente alquilante bifuncional, no posee especificidad por fase alguna del ciclo celular. Es decir, es un agente alquilante que forma monoadductos y enlaces cruzados entre cadenas como consecuencia de la aparición de rupturas por efectos de los mecanismos reparativos⁴¹.

Bleomicina. Es un antibiótico tumoral, induce labilidad y ruptura de la estructura del ADN, al interactuar con el oxígeno y el hierro, produciendo radicales libres⁴¹.

2.7.2.1. Criterios de selección

La iniciativa internacional The International Collaborative Project on Micronucleus Frequency in Human Populations (HUMN) es un órgano encargado de uniformizar

el test de micronúcleos y establece ciertos criterios de selección para considerar una célula apta para el análisis estadístico⁴².

Tabla 1. Criterios definidos por el HUMN para considerar una célula apta para el análisis estadístico⁴².

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

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

2.7.2.1. Ventajas del ensayo de micronúcleos frente al de aberraciones cromosómicas

El ensayo de MN frente al ensayo de aberraciones cromosómicas consigue⁴².

- Reducir la dificultad a la hora de realizar el recuento.
- Mejorar la sensibilidad del ensayo, ya que los MN sólo se cuentan en células que han completado una división celular.
- Incrementar la potencia estadística de los estudios al analizar miles de células en lugar de cientos de ellas.
- Reducir el coste del ensayo.

El ensayo de MN es, por tanto, un ensayo práctico, universalmente validado y accesible tecnológicamente, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Farmacia de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga durante los meses de enero a abril de 2019.

3.2. Definición de la población y muestra

3.2.1. Población: Los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl.* “sacato” que crecen a 3500 msnm en las faldas del cerro Razuhuillca, en la provincia de Huanta, región Ayacucho.

3.2.2. Muestra: Dos kilogramos de pseudobulbos secos de *Odontoglossum bicolor Lindl.* “Sacato”, muestreadas por conveniencia en horas de la mañana.

Criterios de inclusión: Pseudobulbos en buen estado, maduros.

Criterios de exclusión: Pseudobulbos en mal estado, inmaduros.

3.2.3. Unidad de análisis

60 ratones de ambos sexos de 25 a 30 g de peso corporal seleccionados aleatoriamente, mantenidos en un ambiente y una alimentación balanceada y agua.

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Recolección de la muestra

La selección, recolección y secado de la muestra se realizaron según los procedimientos establecidos por Villar del Fresno⁴³.

Los pseudobulbos fueron recolectados en horas de la mañana, durante los meses de octubre, se seleccionaron los pseudobulbos en buen estado y fueron transportados en bolsas de papel para evitar su descomposición, luego serán limpiados, secados y trozados transversalmente, después se procedió a su secado a sombra sobre papel kraft para mantener sus propiedades químicas y farmacológicas con una buena ventilación durante 14 días.

Con una parte de la planta con hojas y flor se procedió a la identificación botánica por la especialista en taxonomía y sistemática de plantas, Laura Aucasime Medina.

3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico

Se tomó 500 gramos pseudobulbos secos de *Odontoglossum bicolor Lindl.* “Sacato”, la cual fue vertida en un frasco de vidrio con solución hidroalcohólico al 80 %, luego se maceró por un espacio de 7 días.

Después se procedió a la filtración al vacío utilizando el papel whatman y luego concentrada a sequedad en baño maría a 40 °C el extracto obtenido será almacenado en un frasco ámbar hasta su posterior análisis. (Anexo 3)

3.3.3. Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico

A partir del extracto etanólico obtenido se realizó las pruebas pertinentes para la identificación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios, directamente sobre el extracto de la planta con reacciones simples específicas de coloración y precipitación, siguiendo los protocolos de referencia establecidos Miranda y Cuellar⁴⁴.

- **Ensayo de Dragendorff:** a 2 mL de extracto se le añadirá 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se calentará suavemente, luego se dejará enfriar. A la solución obtenida se le añadirá 3 gotas del reactivo de Dragendorff, luego se evaluará el resultado de la siguiente manera: opalescencia (+), turbidez definida (++) , precipitado naranja (+++).
- **Ensayo de Baljet:** a 2 mL de extracto se le añadirá 1 mL del reactivo, el resultado será positivo cuando aparezca una coloración (++) o precipitado rojo (+++)
- **Ensayo de Lieberman-Bouchard:** 2 mL de extracto se disolverá con 1 mL de cloroformo. Luego se adicionara 1mL de anhídrido acético y se mezclara bien. Luego por la pared de tubo de ensayo se dejara caer 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. El ensayo será positivo cuando se da un cambio rápido de coloración:
 1. Rosado-azul muy rápido.
 2. Verde intenso–visible, rápido.
 3. Verde oscuro – negro – final de la reacción.
- **Ensayo de la espuma:** a 1 mL de extracto se adicionara 5 mL de agua destilada, luego se agitara fuertemente durante 3 minutos.

El ensayo se considerara positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y que persista por más de 2 minutos.

- **Ensayo del cloruro férrico:** A 2 mL de extracto se le adicionara 2 gotas de solución de cloruro férrico al 5 %. Un ensayo positivo dará la siguiente información:

Desarrollo de una coloración roja - vino, compuestos fenólicos en general.

Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos de tipo pirocaticólicos.

Desarrollo de una coloración azul, taninos de tipo pirogalotánicos

- **Ensayo de shinoda:** A 2 mL de extracto se le adicionara 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado, luego 2 tiras de magnesio metálico. El ensayo se considerara positivo, cuando haya coloración naranja, carmelita o rojo.
- **Ensayo de Kedde:** 2 mL de extracto se mezclara con 1mL del reactivo y se dejara reposar durante 5 minutos. El ensayo será positivo si se forma un anillo de una coloración rojo y/o violáceo.
- **Ensayo de catequina:** en un papel de filtro se colocara una gota del extracto, al cual se le adicionara una gota de ácido clorhídrico más una gota de bicarbonato de sodio, luego se dejara secar por varios minutos para luego observar en luz ultravioleta, el ensayo será positivo cuando se observe una coloración verde fluorescente.

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

3.3.4.1. Determinación de la toxicidad aguda

Se ha utilizado el método de la clase tóxica aguda descrito en la normativa N° 423 de la OECD³⁸ y Rivadeneira A⁷.

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

Los animales fueron distribuidos en dos grupos (grupo control y grupo experimental) con igual número de hembras y machos en ambos grupos.

La sustancia experimental fue administrada en una sola dosis de 2000 mg/kg de acuerdo al peso corporal por vía oral, usando una cánula adecuada

Al grupo control se le administrara 0,3 mL de agua destilada. Terminada la dosificación se volvió a colocar la comida 2 horas después.

Se observaron a los animales individualmente, después de la dosificación con atención especial durante las primeras 4 horas, periódicamente durante las primeras 24 horas y después diariamente, hasta un total de 14 días.

Los pesos individuales de los animales, se determinaron antes de administrar la sustancia experimental, a los 7 días y 14 días.

3.3.4.2. Determinación de la genotoxicidad (test de micronúcleos)

Para la determinación de la genotoxicidad se usó “la prueba de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos”, según el Test N°474 de la OECD 2016³⁸.

- Los animales fueron aclimatados siete días antes de iniciado el experimento y durante 14 días de ensayo, en las condiciones adecuadas en el bioterio (temperatura controlada de 22 ± 2 °C, ciclos de luz –oscuridad de 12 h, cama con viruta y cambio cada 48 horas).
- Se formaron cinco grupos de ocho animales cada uno los cuales fueron distribuidas, cada grupo estuvo formado por cuatro machos y cuatro hembras.
- Posteriormente fueron pesadas y marcadas.
- Luego se calcularon y administraron las dosis de los extractos objeto de estudio a cada uno de los grupos de la siguiente manera: al primer grupo se administró solución salina 0,9 % 10 mL/kg, el segundo ciclofosfamida 50 mg/kg en dosis única administrando (vía intraperitoneal) inmediatamente después a los tercer, cuarto y quinto grupo los extractos preparados en agua a la dosis de 200, 400 y 800 mg/kg por vía oral, empleando para ello una cánula intragástrica.
- Los tratamientos fueron dados dos veces al día durante 48 horas, los animales fueron sacrificados 24 horas después de la última administración con pentobarbital 100 mg/Kg, este tiempo está basado en la cinética de maduración de eritrocitos en ratones.
- El procedimiento empleado para la obtención de las preparaciones de sangre periférica fue realizada de la siguiente manera: se tomó una pequeña muestra de sangre periférica debiendo realizar frotis de sangre (3 aplicadas por individuo), se fijaron con etanol al 95 % (v/v) durante 5 min y se secaron al aire durante 24 horas, posteriormente se tiñeron con colorante de Giemsa al 5 % en agua corriente durante 10 minutos.
- Se contó aproximadamente 1000 eritrocitos por animal, en campos oculares a 400 aumentos a fin de observar frecuencia de micronúcleos en eritrocitos maduros o inmaduros.
- Los datos fueron expuestos en porcentajes de micronúcleos

3.4. Tipo y diseño de investigación

3.4.1. Tipo de investigación

Básico-Experimental⁴⁵.

3.4.2. Diseño de investigación

Diseño experimental con post prueba únicamente y grupo de control⁴⁵.

G X O

Donde:

G = Grupo experimental

X = Tratamiento o intervención

O = efecto toxico

3.5. Análisis de datos

Los datos obtenidos se expresaron en forma de medias y desviación estándar, y se representaron mediante tablas y figuras. La significancia estadística del peso corporal de los ratones, se estimaron haciendo uso de la prueba Dunnett para ver la variabilidad de peso del día 7 y 14 respecto al día 1, así mismo el porcentaje de micronúcleos en sangre periférica se analizó mediante la prueba de Dunnett con un nivel de confianza del 95 %, utilizando el software SPSS versión 22.

IV. RESULTADOS

Tabla 2. Identificación fitoquímica de los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato" Ayacucho 2019.

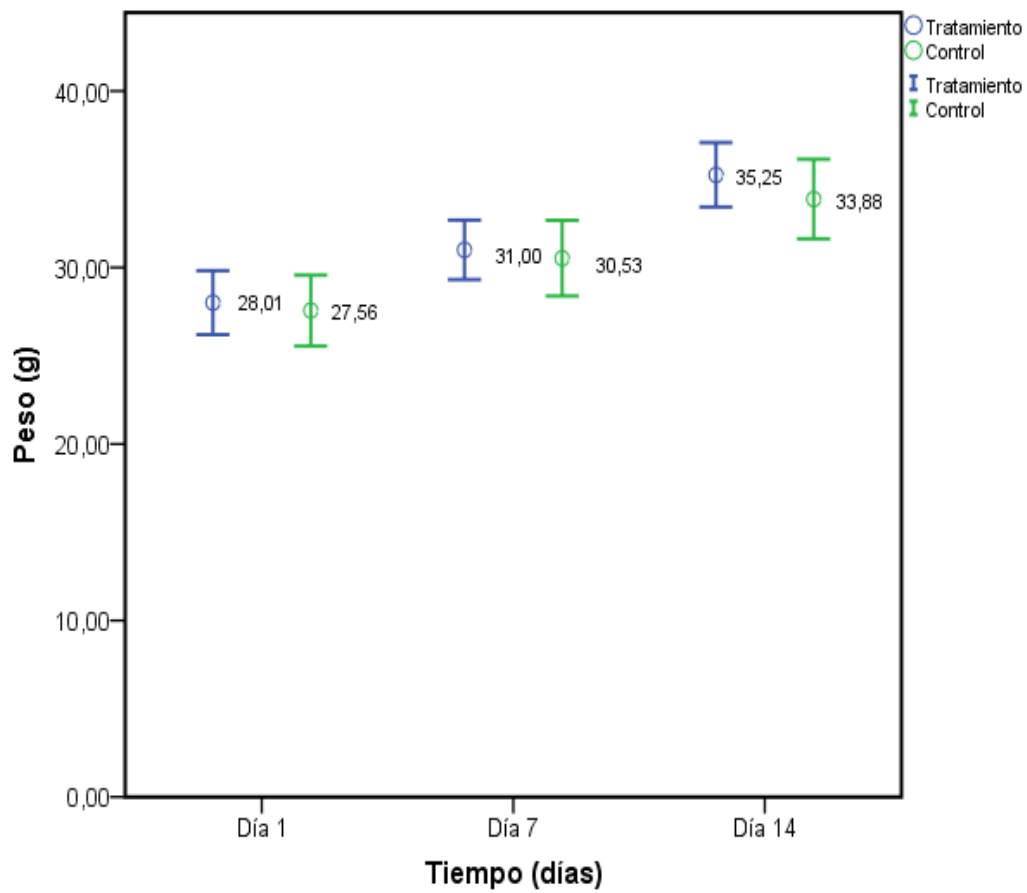
Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Dragendorff	+	No se observa ninguna precipitación naranja ,se observa una ligera opalescencia
Lactonas y cumarinas	Bajlet	-	No se observó ningún cambio de coloración o precipitación
Flavonoides	Shinoda	+++	Fase amílica de color amarillo a rojo
Saponinas	Espuma	++	Formación de espuma
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico	+++	Coloración marrón oscura
Glicosidos cardiotónicos	Kedde	-	No se presenta la formación de un anillo de color rojo y/o violácea
Catequinas	Catequinas	+++	Verde carmelita en UV

Leyenda

- (-) : sin evidencia
- (+) : Baja evidencia
- (++) : Evidencia
- (+++): Alta evidencia

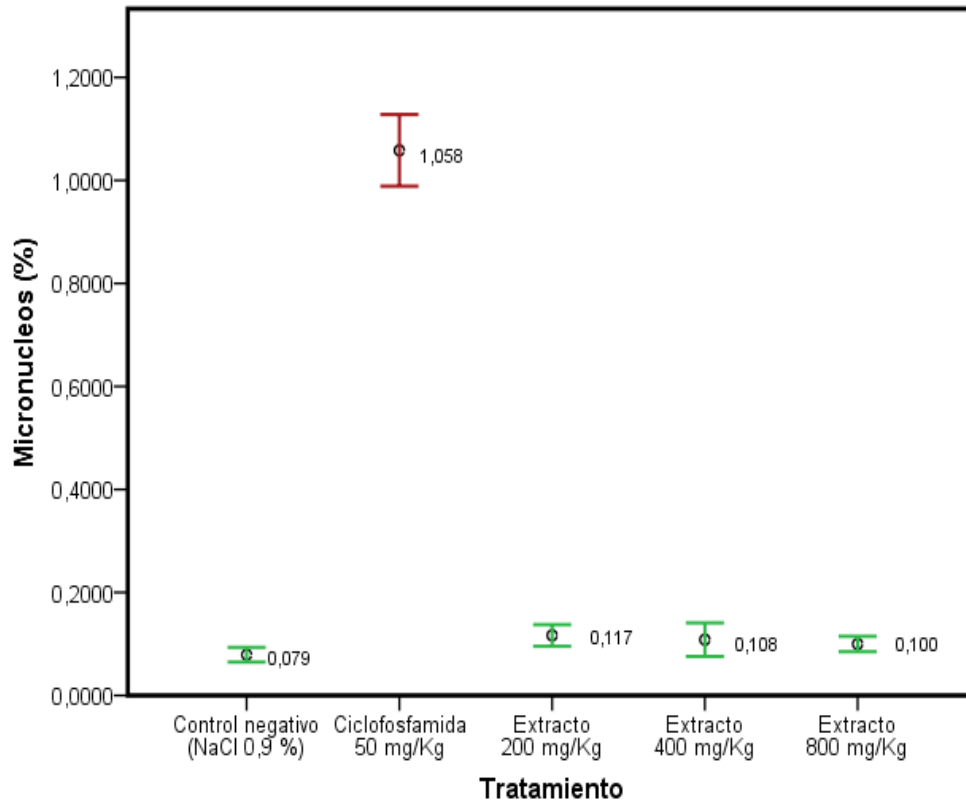
Tabla 3. Comportamiento general de los ratones a la dosis de 2000 mg/kg con extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato" Ayacucho 2019.

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



ANOVA: $p < 0,05$

Figura 1. Variación del peso corporal de los ratones por efecto de la administración de 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato" Ayacucho 2019.



$p > 0,05$

Figura 2. Porcentaje de micronúcleos analizados en sangre periférica de ratón por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato" Ayacucho 2019.

V. DISCUSIÓN

El Perú es un país con una enorme riqueza, tanto natural como cultural debido a que se puede contar con una amplia gama de microclimas y probablemente nuestro país posee la mayor diversidad de orquídeas a nivel mundial, con alrededor de 212 géneros y 2120 especies registradas, así lo afirma también Damián L²³, en su trabajo Composición de la familia Orchidaceae en el Sector Setapo de la Reserva Comunal Amarakaeri (Manu-Madre de Dios), afirma que familia Orchidaceae representa más del 70 % de todos los epífitos vasculares, llegando a constituir en el país, el grupo de plantas más diversa para la flora peruana (>2800 especies).

La familia Orchidaceae también se considera como la familia más diversa en las monocotiledóneas que posee especies con una amplia gama de aplicaciones en cosméticos, fármacos y perfumes¹⁷.

La Tabla 2 y Anexo 6, representan los resultados hallados en la identificación de fitoquímica de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor* Lindl “sacato” los metabolitos con mayor presencia son: compuestos fenólicos, flavonoides, catequinas y saponinas en mayor porcentaje que los demás metabolitos analizados, en la actualidad existe escasa información acerca del género *Odontoglossum* que facilitaría la comparación de los resultados, sin embargo, de los pocos estudios realizados a esta especie vegetal los resultados son similares con los resultados reportados por Cabana²⁹.

Según Rudas²⁸, los metabolitos secundarios presentes, expresados de manera semicuantitativa en los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor* Lindl “sacato” son: fenoles, flavonoides, cumarinas, saponinas, taninos, triterpenos, azúcares reductores, catequinas y leve presencia de alcaloides. Los resultados de su investigación demuestran el extracto acuoso de los pseudobulbos de *Odonthoglossum bicolor* Lindl. “sacato”, poseen metabolitos secundarios anti ulcerosos que protegen contra el daño de la mucosa gástrica inducido por la histamina, a través de una inhibición de la secreción de ácido y pepsina. Los

posibles compuestos implicados en la protección de la mucosa gástrica están atribuidos principalmente a los metabolitos secundarios como son los flavonoides ya que ayudan a la secreción de prostaglandinas endógenas favoreciendo de esta manera la secreción de mucus gástrico en el interior del estómago ejerciendo un mecanismo de defensa, a su vez los taninos por su capacidad de precipitar las proteínas ejercerían un mecanismo de defensa de protección de la pared de la mucosa gástrica.

otros estudios realizados a distintas especies de géneros de orquídeas mediante un screening fitoquímico, como son el de Mencias et al¹⁴, quienes realizaron pruebas de alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos y triterpenos a diversos géneros de orquídeas, cuyo resultado mostro que los metabolitos secundarios más resaltantes entre todas fueron los flavonoides, triterpenos y saponinas. El género *Caucaea* y *Oncidium* presentaron reacción positiva para flavonoides y triterpenos en mayor cantidad respecto a los demás, mientras que las muestras del género *Epidemdrum* presentaron saponinas en un 100 %.

En las investigaciones realizadas por Sut et al¹⁵, mencionan que, dentro de la familia de las orquídeas, se han identificado varias clases de fitoconstituyentes. Dentro de ellos: estilbenoides, fenantrenos, derivados fenólicos, estudiadas por sus actividades biológicas, especialmente en el campo del cáncer. Por otro lado, se menciona que se aislaron también alcaloides y terpenoides con actividad sobre el sistema nervioso central llegando a la conclusión que la familia Orchidaceae, es una de las familias más grandes que represen un enorme reservorio de metabolitos secundarios bioactivos, y hasta ahora ha sido poco estudiado en general, ofreciendo nuevas oportunidades en la búsqueda de nuevas clases de productos bioactivos naturales.

Las plantas medicinales contienen principios activos, que, si bien son los responsables de las propiedades terapéuticas, no están exentos de inducir toxicidad y la aparición de reacciones adversas que pueden aparecer si se emplean en dosis inadecuadas o por períodos prolongados^{3,5}.

La falta de información sobre los posibles riesgos y beneficios que puede ocasionar el uso de las plantas medicinales, es una de las causas más importantes de que la población se auto medique con ellas, alegando que son inocuas y más seguras, por el simple hecho de ser naturales. El uso de las plantas medicinales requiere de profundas investigaciones que no se limitan al campo de la

experimentación, pues una vez que se comercializan deben ser observados mediante estudios de farmacovigilancia⁴.

Las pruebas de toxicidad de las plantas medicinales se realizan con el fin de identificar posibles daños para el ser humano, ya que se ha detectado extractos de plantas medicinales que pueden causar la muerte de animales de experimentación, así mismo poseer actividad embriotóxica y/o teratogénico⁵.

El cual incentiva a realizar estudios farmacológicos y toxicológicos de los distintos tipos de extractos de las plantas medicinales de la región de Ayacucho previo a su uso por la población, para asegurar su inocuidad. Es por ello que la investigación tiene como fin evaluar la toxicidad aguda y el posible efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico de *Odontoglossum bicolor* Lindl “sacato” utilizado en la medicina tradicional peruana.

Respecto a los ensayos de toxicidad aguda a dosis límite la administración del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor* Lindl “sacato” mostró que el extracto posee un bajo potencial tóxico, dado a la ausencia de mortalidad y signos tóxicos como se observan en la Tabla 3, estos resultados no arrojaron una diferencia significativa entre los grupos (control y extracto dosis de 2000 mg/kg) durante los 14 días post administración en los animales en estudio, no se llegó a observar que los animales presentaran convulsiones o incoordinación motora, diarrea, mucosas pálidas o signos de temor, solo se observó que en algunos animales cambios no tan significativos como: disminución de la actividad motora y agresividad solo en las primeras horas de la administración posteriormente no se observó, ninguna anormalidad.

El peso corporal es un indicador de gran importancia, pues está involucrado en una serie de cambios orgánicos en diferentes etapas de la vida. Es por ello que una variación en su valor sugiere algún efecto adverso de drogas o químicos y se considera significativa si hay una disminución de más del 10 % del peso corporal inicial⁴⁶. Este indicador, en este estudio, tuvo un comportamiento normal de ganancia de peso y no se encontró diferencias significativas con respecto al control. (Figura 1) (Anexos: 7 y 8)

Al realizar el análisis de las medias no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,5$) en ambos grupos y en los días de evaluación, así lo muestran el Anexo 9.

Los resultados demostraron la inocuidad del extracto hidroalcohólico al no observarse signos ni síntomas de toxicidad. El peso se comportó acorde a la curva

de crecimiento de la especie y no se apreciaron alteraciones en los parámetros evaluados, todo lo que permite afirmar que la Dosis letal 50 (DL50) estaría encima de los 2000 mg/kg de peso corporal, clasificándose en la categoría 5 según el Sistema Globalmente Armonizado (SGA)⁴⁷ y No clasificado según la metodología de la OMS¹². Estos resultados demuestran semejanza con los resultados presentados por Rivadeneira et al⁷ y Ávila et al⁸ quienes utilizaron el mismo método y las mismas dosis del extracto.

Dentro de los múltiples daños de los contaminantes se encuentra el efecto genotóxico, expresado en sus diversas formas; como por ejemplo: teratogénesis, mutagénesis y por su puesto cancerogénesis. Por lo tanto, un agente genotóxico es aquel compuesto de naturaleza química o física que puede inducir, directa o indirectamente, alteraciones en el material genético de los seres vivos con el consiguiente bloqueo de la replicación así como la aparición de mutaciones que derivan en patologías y/o cambios en las características de dichos organismos. Por esto, es importante detectar estos compuestos o agentes dañinos⁴⁰.

Existen varias pruebas para identificar los agentes genotóxicos y la prueba de micronúcleos es la más sencilla y económica⁴⁰.

La prueba de micronúcleos, es un método ampliamente utilizado para la detección del daño genotóxico, producido por diferentes sustancias químicas y agentes físicos. Esta indica el daño de agentes mutagénicos sobre los cromosomas, mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados. Esta prueba está ampliamente aceptada y es posible utilizada *in vivo* e *in vitro* en diversas especies, así como en especies de laboratorio y silvestres; entre ellos se encuentra: al humano, rata, ratón, hámster, primates, anfibio, aves, peces y moluscos; y en gran variedad de tejidos como: sangre periférica, reticulocitos de la medula ósea, linfocitos, hepatocitos y células de mucosa bucal⁴⁰.

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que espontáneamente o por causa de agentes genotóxicos, quedan fuera del núcleo durante la división celular que reflejan aberraciones cromosómicas, su forma generalmente redonda o almendrada y alcanza un diámetro entre 0,4 a 1,6 micras⁴⁰.

Los bioensayos de genotoxicidad sirven para valorar el daño potencial que pueda ocasionar una sustancia en el material hereditario de los individuos expuestos. En las experiencias los indicadores de los efectos genotóxicos de cloroquina en *Mesocricetus auratus* y efecto genotóxico de la fenitoína en *rattus norvegicus cepa*

Holtzman, se evidenciaron por la presencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (PCE-MN) y rupturas cromosómicas en células de medula ósea y anomalías en la cabeza de los espermatozoides evaluados post-tratamiento teniendo como resultado que tanto la cloroquina como la fenitoína son agentes genotóxicos²²; estos resultados evidenciarían el efecto de los metabolitos tóxicos de la fenitoína como los epóxidos o iones carbonio, tal es el caso del óxido areno, el cual tiene propiedad electrofílica, es decir, capacidad de unirse covalentemente al ADN e inducir lesiones a nivel de los cromosomas C5 y C6 de las bases nitrogenadas, o también reaccionar con el nitrógeno N7 de las bases puricas llevando a rupturas en los cromosomas, evidenciadas en la investigación como micronúcleos²³.

Al evaluar el efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato" resulta imprescindible para este ensayo la utilización de un control negativo (vehículo o solvente de los compuestos evaluados), pues las respuestas genotóxicas y tóxicas de dichos compuestos se evidencian en la comparación con los valores de sus respectivos controles en este ensayo se puede observar los resultados en la figura 2 y Anexo 9 sobre el porcentaje de micronúcleos en la administración se encontró una mayor inducción de micronúcleos en los ratones con administración de 200 mg/kg del extracto llegando a presentar 0,117 % con respecto al 0,079 % del control negativo (NaCl 0,9 %) pero no mayor al control positivo (ciclofosfamida 50 mg/kg) con un 1,058 % de inducción de micronúcleos. Respecto a los demás dosis de extracto es de 0,108 % en dosis de 400 mg/kg y 0,100 % en 800 mg/kg en esta prueba se utilizaron los ratones como un biomonitor de genotóxicos ya que este presenta un número importante de eritrocitos micronucleados de manera espontánea, ya que en esta especie el control que ejerce el bazo es menor, y por consiguiente, cuando estos organismos son expuestos a genotóxicos micronucleogénicos, los micronúcleos se incrementan de manera significativa en sus eritrocitos; es por ello que los organismos con tales características pueden ser bioindicadores naturales⁴⁸.

Del análisis estadístico (Anexo.12) se demuestra que no hay diferencia estadística significativa ($p > 0,05$) en la inducción del porcentaje de micronúcleos ejercida por el grupo experimental (extracto hidroalcohólico de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato") administrados a los ratones en dosis de (200, 400 y 800 mg/kg) respecto al control negativo (NaCl 0,9 %) evaluadas en sangre periférica del ratón, estas

fueron evaluadas mediante la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Pero si se observa una diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) del control positivo (ciclofosfamida 50 mg/kg) con el control negativo (NaCl 0,9 %) y con los extractos. Por otro lado, Marca²⁷ realizó un estudio planteándose como objetivo determinar el efecto genotóxico *in vitro* del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum* L. "Ajo". Lo determino a diferentes concentraciones, exponiéndose estos sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*; la estimación del daño genotóxico *in vitro* fue determinada con el "método Tomasevich", mediante la electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1 % y visualizada en radiación de luz ultra violeta dentro del sistema de registrador de imágenes biometra UV solo TS. Las concentraciones del extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. "Ajo" no presento efecto genotóxico frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*. Esto se debería porque en el extracto etanólico del ajo solo se identificó fenoles y/o taninos, que no ejercen la función genotóxica.

Esto explicaría que en el extracto hidroalcohólico de hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato" solo se identificaron compuestos fenólicos y flavonoides, que no ejercen la función genotóxica, mientras la presencia de diferentes metabolitos secundarios en mayor porcentaje presentan efecto genotóxico estos casos se podría ser dilucidado al realizar posteriores estudios con fraccionamiento de los extractos.

En general los resultados obtenidos tanto estadísticos como experimentales nos muestran que el extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato", no presentan efecto genotóxico debido a que los componentes presentes no tienen efecto sobre los procesos hereditarios como reporta al evaluar el efecto genotóxico de los extracto acuoso liofilizado de las semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (tarwi, chocho)²¹.

Estos resultados amplían los conocimientos sobre las propiedades biológicas de los extractos naturales, fruto de nuestra biodiversidad, contribuyendo a la estimación de riesgo beneficio que puede derivarse del uso de plantas como fitoterapéuticos por el hombre.

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato", no posee toxicidad aguda y efecto genotóxico en *Mus musculus* "ratón".
2. El extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato" contiene los siguientes metabolitos secundarios: flavonoides, catequinas, compuestos fenólicos y saponinas.
3. El extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato" no presenta toxicidad aguda, según el modelo de dosis límite, ubicándose en el rango de toxicidad de una $DL_{50} > 2000$ mg/kg de peso corporal.
4. El extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato" no presenta efecto genotóxico en ratones, según el test de micronúcleos.

VII. RECOMENDACIONES

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

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lores D, Lazo Y. Caracterización de las sospechas de reacciones adversas a medicamentos herbolarios notificadas a la Unidad Coordinadora Provincial de Farmacovigilancia Santiago de Cuba. Rev. Med Cienc Farm. 2011; 42(1): 37-44.
2. Ochoa A, González Y, Viso F. Las reacciones adversas de las plantas medicinales y sus interacciones con medicamentos. MEDISAN.Cuba. 2006; 10(4):13-23.
3. Elizagaray B, Castro R. Producción científica cubana sobre plantas medicinales y productos naturales a partir de la base de datos PlantMedCUBA, 1967-2010. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2013; 18(3):348-360.
4. Danneris D., Lazo R. Y. Caracterización de las sospechas de reacciones adversas a medicamentos herbolarios notificadas a la Unidad Coordinadora Provincial de Farmacovigilancia Santiago de Cuba. Rev. mex. cienc. farm [revista en la Internet]. 2013 Mar [citado 2019 Abr 22]; 42(1): 58-64. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S187001952011000100004&lng=es.
5. Carballo M, Cortada, C. M., Gadano, A. B., Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. Theoria [en línea] 2005, 14 [Fecha de consulta: 22 de abril de 2019] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=29914211>> ISSN 0717-196X
6. Vizoso A, Ramos A, Villaescusa A, Décalo M, Betancourt J. Evaluación del efecto genotóxico en extractos fluidos de *Plantago lanceolata* L. (Ilantén menor) y *matricaria recutita* L. (manzanilla). Rev Cubana Plant Med [Internet]. 2000 Ago [citado 2019 Abr 22];563. Disponible en:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962000000200007&lng=e
7. Rivadeneira A. Cortés R, Marrero O, Pérez J, Olazábal E. Toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de la planta *Chuquiraga jussieui*, administrado vía oral en ratas. Rev. La Técnica. Cuba 2013; 30(5): 12-17.
8. Ávila J, Ruiz G, Tórrez C, Mollinedo P, Vila J, Bugiardini M, Sauvain M, Gonzáles E, Bravo A. Evaluación de la toxicidad aguda a dosis fijas del

- extracto de *Werneria dactylophylla* (pupusa). *Revista Boliviana de Química*. Bolivia, 2011; 28(2): 87-90.
9. Naia G, Casanova de Oliveirab M, De Oliveira G, Fonseca L, Lemes N, Gatti P. Evaluación de la genotoxicidad inducida por la administración repetida de anestésicos locales: un estudio experimental en ratones. *Rev Bras Anesthesiol. Brazil*, 2015; 65(1): 21-26.
 10. Díaz G, León M, Iglesias E. Evaluación del efecto genotóxico del *Xhantium strumarium* L. (Guisazo de Caballo). *Rev Cub Plant Med*. 2004; 9(3): 23-27.
 11. Remigio A, Pérez G, Fernández N, Bada A, Arteaga M, Mancebo A. Estudio genotóxico in vivo de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. *Rev. Toxicol*. 2001; 18 (1): 75-78.
 12. Organización Mundial de la Salud. Promoción y desarrollo de la medicina tradicional. Consejo ejecutivo de Medicina tradicional 124^a Reunión. Ginebra/Alma Ata URSS: OMS; 2009.
 13. Nauray W. Manual de Orquídeas Identificación y Origen. 1a Ed. Lima Perú 2003.[accesado 08 de abril de 2019].disponible en:<http://www.minam.gob.pe/diversidadbiologica/wpcontent/uploads/sites/21/2014/02/manual+de+orquideas.compressed.pdf>
 14. Mencias H, Salazar T. Estudio fitoquímico, actividad antioxidante de especies de orquídeas de los géneros *Epidendrum*, *Oncidium* y *Caucaea*. [Tesis para optar el título de ingeniero en biotecnología de los recursos naturales]. Quito: Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. 2018.
 15. Sut S, Maggi F, Dall f, Acqua S. Bioactive secondary metabolites from orchids (Orchidaceae). *Chem Biodivers*. Italia 2017; 14 (11): 1-30.
 16. Chowdhury M, Rahman M, Chowdhury M, Uddin M, Sayeed M, Hossain M. Actividades antinociceptivas y citotóxicas de una orquídea medicinal epífita: *Vanda tessellata* Roxb. *India J Pharm Sci* 2014; 14 (1): 464-468.
 17. Neyra A. Aislamiento e Identificación de los Compuestos con Actividad Antioxidante del Extracto de Cloroformo de la Orquídea comestible *Prosthechea michuacana*. [Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias en alimentos] México: Instituto Politécnico Nacional-Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2009.
 18. Cervantes M. Evaluación Farmacológica de *Prosthechea michuacana* (Orchidaceae), especie de potencial agronómico. [Tesis para obtener el

- Grado Académico de Maestro en Ciencias] México: Instituto Politécnico-Nacional centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca; 2008.
19. Alonso M, Sotolongo M, Miranda R, Curi M, Pérez E, Perdomo E. Toxicidad en dosis repetida del *Oncidium luridum* Lindl. Rev. Cubana Plant Med. Cuba ,1997; 2(3): 9-13.
 20. Godos E y Bardalez J. Tamizaje Fitoquímico y Toxicidad aguda en ratones albinos Cepa Balb C53 del extracto etanólico de hojas de *Momordica charantia* Linn “papaila” [Tesis] Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Facultad de Farmacia y Bioquímica Iquitos 2018.
 21. Pérez R, Quispe M. Evaluación de la toxicidad aguda, genotoxicidad y efecto teratogénico del extracto acuoso liofilizado de las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi, Chocho), en ratas.[Tesis para optar al título profesional de químico farmacéutico] Cuzco, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cuzco;2016
 22. Cruz M. Genotoxicidad de cloroquina en *Mesocricetus auratus* “hamster” [tesis doctoral] Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Medicina; Trujillo 2015.
 23. Damián L. Composición de la familia Orchidaceae en el Sector de la Reserva Comunal Amarakaeri (Manu-Madre de Dios) [tesis], Universidad Peruana Cayetano Heredia. Facultad de Ciencias y Filosofía. Lima 2013
 24. Eustaquio, E. Genotoxicidad de fenitoína en eritrocitos policromáticos de *rattus norvegicus* cepa Holtzman. [tesis]Universidad Nacional de Trujillo, Escuela de Postgrado; Trujillo 2009.
 25. Aquino L. Toxicidad aguda y genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.)D. Don.”humanpinta “[Tesis para optar el título de químico farmacéutico] Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2017.
 26. Enciso E y Aguilar E. Efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico y aceite esencial de las hojas de *Satureja brevicalyx* Epling “wayra muña” en ratones. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2017
 27. Marca P. Evaluación preliminar de la genotoxicidad in vitro del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum* L. “ajo” frente a ADN de *Staphylococcus* sp. “[Tesis para optar el título de químico farmacéutico] Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2017.

28. Rudas A. Efecto antiulceroso del extracto acuoso del pseudobulbo de *Odonthoglossum bicolor* Lindl “sacato” en *Cavia porcellus*. [Tesis para optar el título de químico farmacéutico] Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2017.
29. Cabana D. Actividad diurética y dosaje de electrolitos del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor* Lindl. “sacato” en *Cavia porcellus* “cobayo”. [Tesis para optar el título de químico farmacéutico] Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2014.
30. Palacio E, Ribero M, Restrepo J, Toxicidad hepática por té verde (*Camellia sinensis*): Revisión de tema. Rev Col Gastroenterol. Medellín, Colombia 2012; 8 (1): 46-52.
31. Bello J, López A. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. 1ª Edición. Edit. Díaz de Santos S.A. Madrid. 2001.
32. Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la terapéutica. Undécima edición. Edit. Mc Graw Hill Interamericana –México 2007
33. Repetto M, Repetto G. Toxicología fundamental. 4ª Edición. Edit. Díaz de Santos S.A. Madrid. 2009.
34. Klaassen C, Watkins III J. Fundamentos de Toxicología de Casarett y Doull. 5ª Edición. Edit. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid.2005.
35. De la Peña y Cols. Mutagénesis y carcinogénesis química. En M, Repetto (ed) postgrado en Toxicología. Ilustre Colegio Oficial de Químicos. Sevilla. CD-ROM.2012. ISBN: 13:978-84-695-3142-6. Depósito legal: SE-1047-08.
36. Castillo E, Guevara M, Fujita R. Optimización del test de micronúcleos en linfocitos cultivados usando una metodología de gradiente y frotis. Rev.peru.biol.2011;18(2):261-263
37. OECD. Organización para la cooperación económica y el desarrollo Acute Oral Toxicity-Acute toxic class methods, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals and Health effects, Series on Testing and Assessment, No. 423, OECD Publishing, Paris.
38. OECD. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals and Health effects, Series on Testing and Assessment, No. 474, OECD Publishing, Paris.
39. Hayashi M. The micronucleus test most widely used in vivo genotoxicity test. Genes and Environment. 2016; 38 (1): 18.

40. Cedano A, Martínez S, Escalera F, Salgado S, Carrillo F, Macías H, Peña B. La prueba de micronúcleos en sangre como bioindicador de genotóxicos. *Abanico Veterinario*. 2012; 2(2):43-54.
41. Arencibia D, Vidal A, Rosario L, Suárez Y, Delgado L. Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *VacciMonitor*. 2011; 20(1): 28-33.
42. Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *An. Sist. Sanit. Navar*. 2005; 28(2): 227-236.
43. Villar de Fresno M. *Farmacognosia General*. Editorial Síntesis. España. 1999.
44. Miranda M, Cuellar A. *Manual de prácticas de laboratorio, farmacognosia y productos naturales*. Instituto de farmacia y alimentos. Universidad la Habana; 2000.
45. Hernández R, Fernández C. Baptista P. *Metodología de la investigación*. 4a Ed. Editorial McGraw Gill Interamericana. México 2008.
46. Rojas J, Díaz D, Evaluación de la toxicidad del extracto metanólico de hojas de *Passiflora edulis Sims* (maracuyá), en ratas Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú
47. SGA. Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos. 6ª Edición. Naciones Unidas. Nueva York y Ginebra, 2015:115-291.
48. Remigio AC, Pérez G, Fernández N, Bada AM, Arteaga ME, Estudio genotóxico in vivo de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) La Habana. CUBA. 2001 grupo control

ANEXOS

Anexo1. Certificado de identificación botánica de *Odontoglossum bicolor* Lindl
"sacato" Ayacucho 2019.

C O N S T A N C I A

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

Que, la Bachiller en Farmacia y Bioquímica, **Srta. Mónica Miryan, TINEO CANALES**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	LILIOPSIDA
SUB CLASE	:	LILIIDAE
ORDEN	:	ORCHIDALES
FAMILIA	:	ORCHIDACEAE
GENERO	:	Odontoglossum
ESPECIE	:	<i>Odontoglossum bicolor</i> Lindl.
N.V.	:	" sacato "

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

Ayacucho, 30 de Octubre del 2018


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

Anexo 2. Certificado de descripción botánica de *Odontoglossum bicolor* Lindl
"sacato" Ayacucho 2019.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL SACATO

NOMBRE CIENTÍFICO: *Odontoglossum bicolor* Lindl
NOMBRE COMÚN : "sacato"
FAMILIA : ORCHIDACEAE

CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA:

Es una planta herbácea perenne, acaule, de hábito terrestre, de tamaño pequeño, presenta numerosos pseudobulbos elipsoidales, ovales de donde emergen raíces fasciculadas o fibrosas; hojas lineales, oblongolanceoladas, coriáceas, de nervaduras paralelas, atenuadas al peciolo, dísticas que nacen 2 hojas de cada bulbo.

Inflorescencia en panícula con el eje erecto o arqueado, delgado y flexible de 60-120 cm de largo, las ramas del eje cortas, con 6 a 8 flores como promedio. La inflorescencia nace del pseudobulbo maduro a través de la axila de la vaina de la hoja; las flores son bisexuales homoclamídeas, con perigonio corolino, los tépalos externos de un color marrón rojizo y los tépalos internos de un color amarillo entero, el labelo, que es el tépalo más grande y espolonado está provisto de un diente en la parte media a manera de una lengua; Ovario ínfero tricarpelar, trilocular. Fruto cápsula, trigonal, con numerosas semillas pequeñas de color marrón oscuro.

HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN:

Son plantas de hábito terrestre, originaria de Sudamérica, crecen en terrenos pedregosos en laderas de la zona altoandina de 2700 - 3500 msnm, florece en primavera (Setiembre - Octubre).

USOS:

Los pobladores de la zona consumen los pseudobulbos para controlar la diabetes y otros males.

Ayacucho, 30 de Octubre del 2018

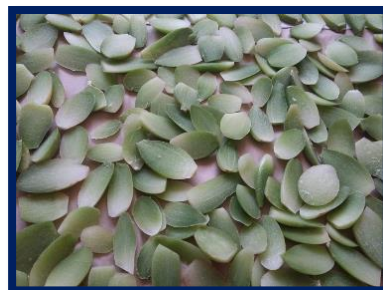


LAURA AUCASIME MEDINA
BIOLOGA
Reg. C.B.P. N° 563 C.R. - XIII

Anexo 3. Flujograma de equipo para la obtención del extracto hidroalcohólico de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato" Ayacucho 2019.



Muestra: *Odontoglossum bicolor Lindl.* "sacato"



Secado a temperatura ambiente



Trituración



Muestra triturada



Extracto hidroalcohólico seco



Concentración del extracto hidroalcohólico en baño maría



Filtrado



Maceración con alcohol al 80 % por 7 días

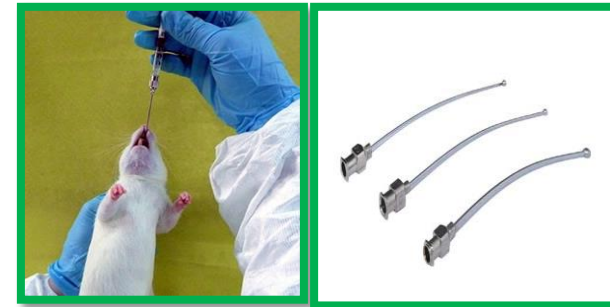
Anexo 4. Flujograma de equipo para la determinación de la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de *Odontoglossum bicolor* Lindl "sacato" Ayacucho 2019.



20 ratones previamente aclimatadas



Pesado de los animales



Administración del extracto (2000mg/kg)
Y al grupo control (NaCl 0,9%)



Observación



Pesado de los animales a los
7 y 14 días pasados la
administración

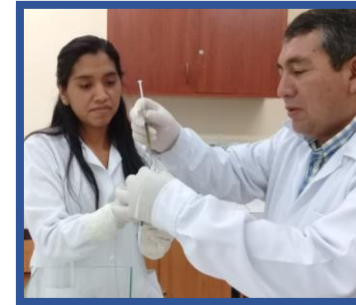
Anexo 5. Flujograma de equipo para la determinación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Odontoglossum bicolor* Lindl “sacato” Ayacucho 2019.



40 ratones previamente acimatadas



Pesado de los animales



Administración de las dosis de los extractos (vía oral)



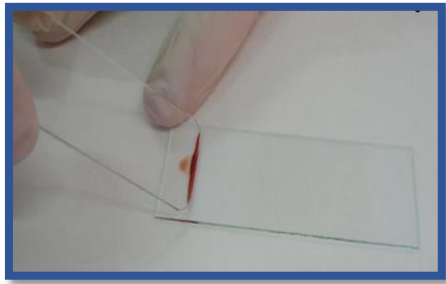
Obtención de muestra de sangre



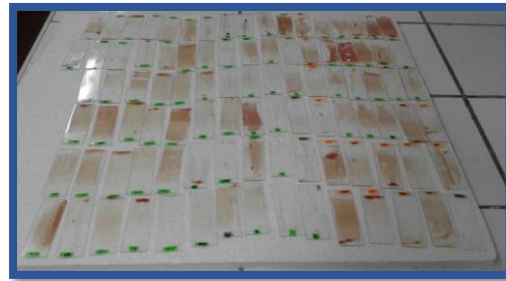
Sacrificar con pentobarbital 100mg/kg



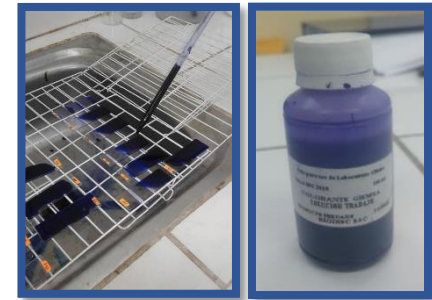
La admistración de ciclofosfamida (vía intraperitoneal)



Frotis de sangre



Fijación con etanol 95%

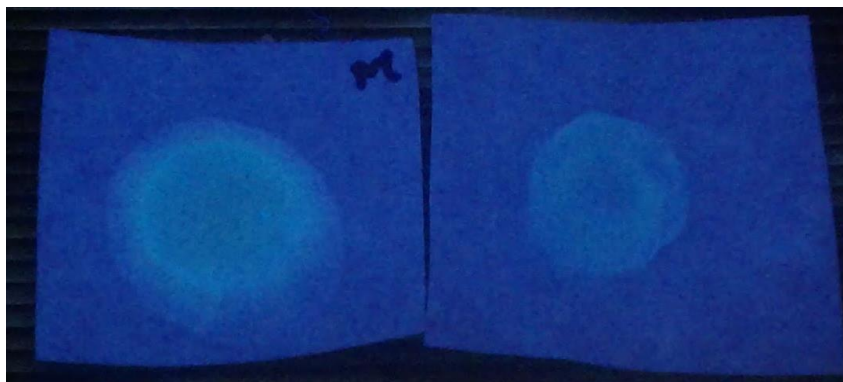
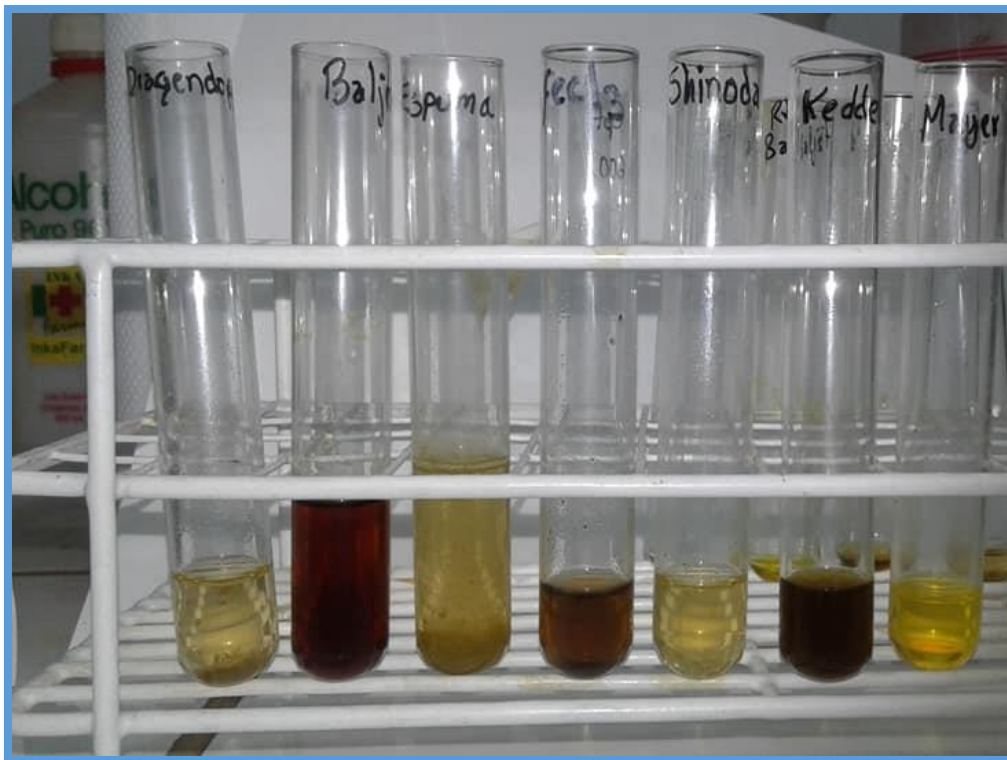


Teñido con colorante Giemsa al 5% durante 10 minutos



Observación de la frecuencia de micronúcleos

Anexo 6. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor* Lindl "sacato" Ayacucho 2019.



Anexo 7. Variación del peso de los animales administrados con extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato" por vía oral en la evaluación de la toxicidad aguda Ayacucho 2019.

Sexo	Peso (g)				
	día 0	día 7	Δ peso	día 14	Δ peso
Macho (1)	30.1	33.2	3.1	37.2	4
Macho (2)	29.9	32.8	2.9	38.2	5.4
Macho (3)	30.2	32.5	2.3	35.8	3.3
Macho (4)	29.6	33.3	3.7	35.8	2.5
Macho (5)	30.3	32.2	1.9	38.7	6.5
Hembra (6)	23.5	27.9	4.4	31.2	3.3
Hembra (7)	27.3	29.6	2.3	34.6	5
Hembra (8)	28.6	30.6	2	34.6	4
Hembra (9)	26.1	31.5	5.4	35.2	3.7
Hembra (10)	24.5	26.4	1.9	31.2	4.8

Anexo 8. Variación del peso de los animales usados como control en la evaluación de la toxicidad aguda de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* “sacato” Ayacucho 2019.

Sexo	Peso (g)				
	día 0	día 7	Δ peso	día 14	Δ peso
Macho (1)	28.1	32.3	4.2	35.9	3.6
Macho (2)	29.8	33	3.2	38.2	5.2
Macho (3)	32.3	35.1	2.8	37.8	2.7
Macho (4)	28.2	31.9	3.7	35.9	4
Macho (5)	30.3	33.7	3.4	36.1	2.4
Hembra (6)	24.2	27.9	3.7	30.8	2.9
Hembra (7)	23.1	26.4	3.3	30.7	4.3
Hembra (8)	26.9	28.3	1.4	31.5	3.2
Hembra (9)	26.9	28.8	1.9	30.8	2
Hembra (10)	25.8	27.9	2.1	31.1	3.2

Anexo 9. Resultados del ensayo de micronúcleos en eritrocitos y médula ósea de ratón por efecto del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato" Ayacucho 2019.

Tratamientos	Células analizadas	Numero de micronúcleos	% de micronúcleos ±DE
Control negativo NaCl 0,9%	24000	18	0.025
Ciclofosfamida 50 mg/kg	24000	254	0.083
Extracto 200 mg/kg	24000	28	0.025
Extracto 400 mg/kg	24000	26	0.039
Extracto 800 mg/kg	24000	24	0.018

Anexo 10. Análisis de varianza del peso de los ratones en la evaluación de la toxicidad aguda de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato" Ayacucho 2019.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamiento	Entre grupos	264,734	2	132,367	21,461	,000
	Dentro de grupos	166,534	27	6,168		
	Total	431,268	29			
Control	Entre grupos	199,953	2	99,976	11,185	,000
	Dentro de grupos	241,341	27	8,939		
	Total	441,294	29			

Anexo 11. Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett de la variación de pesos de los ratones en la evaluación de la toxicidad aguda de *Odontoglossum bicolor Lindl* “sacato” Ayacucho 2019.

Comparaciones múltiples

T de Dunnett (bilateral)^a

Variable dependiente	(I) Tiempo (días)	(J) Tiempo (días)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
Tratamiento	Día 7	Día 1	2,99000*	1,11067	,022	,3984	5,5816
	Día 14	Día 1	7,24000*	1,11067	,000	4,6484	9,8316
Control	Día 7	Día 1	2,97000	1,33705	,063	-,1499	6,0899
	Día 14	Día 1	6,32000*	1,33705	,000	3,2001	9,4399

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

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

Anexo 12. Análisis de varianza del porcentaje de micronúcleos en la evaluación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato" en sangre periférica Ayacucho 2019.

ANOVA

Micronúcleos (%)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5,871	4	1,468	759,878	,000
Dentro de grupos	,068	35	,002		
Total	5,939	39			

Anexo 13. Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett del porcentaje de micronúcleos en la evaluación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de *Odontoglossum bicolor Lindl* "sacato" en sangre periférica Ayacucho 2019.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Micronúcleos (%)

T de Dunnett (bilateral)^a

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Ciclofosfamida 50 mg/Kg	Control negativo (NaCl 0,9%)	.9791500*	.0219751	.000	.922940	1.035360
Extracto 200 mg/Kg	Control negativo (NaCl 0,9%)	.0374750	.0219751	.275	-.018735	.093685
Extracto 400 mg/Kg	Control negativo (NaCl 0,9%)	.0291500	.0219751	.490	-.027060	.085360
Extracto 800 mg/Kg	Control negativo (NaCl 0,9%)	.0208125	.0219751	.749	-.035397	.077022

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05

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

Anexo 14. Matriz de consistencia.

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	MARCO TEORICO	VARIABLE	DISEÑO METODOLOGICO
Toxicidad aguda y genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontoglossum bicolor</i> Lindl "sacato" Ayacucho 2018.	¿El extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontoglossum bicolor</i> Lindl "sacato" presentara efecto tóxico agudo y genotóxico en <i>Mus musculus</i> "ratón"?	<p>Objetivo general Evaluar el efecto tóxico agudo y genotóxico del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontoglossum bicolor</i> Lindl "sacato" en <i>Mus musculus</i> "ratón".</p> <p>Objetivos específicos Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Odontoglossum bicolor</i> Lindl "sacato". Evaluar el efecto tóxico agudo del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontoglossum bicolor</i> Lindl "sacato" en <i>Mus musculus</i> "ratón" Evaluar el efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontoglossum bicolor</i> Lindl "sacato" en <i>Mus musculus</i> "ratón"</p>	<p>Hi: El extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontoglossum bicolor</i> Lindl "sacato" no presenta efecto tóxico agudo y genotóxico en <i>Mus musculus</i> "ratón".</p>	<p><i>Odontoglossum bicolor</i> Lindl "sacato" Descripción botánica Habitad y distribución Composición química Uso tradicional</p> <p>Tóxico Toxicidad Toxicidad aguda Toxicidad subcrónica Toxicidad crónica</p> <p>Método para evaluar la toxicidad aguda: método de dosis fija a dosis límite OECD 423.</p> <p>Genotoxicidad. Definición Clases de daño genotóxico Micronúcleos</p> <p>Método para evaluar la genotoxicidad: Test de micronúcleos</p> <p>Ciclofosfamida Bleomicina Ventajas del ensayo de micronúcleos frente al de aberraciones cromosómicas</p>	<p>Variable independiente. Extracto hidroalcohólico de los pseudobulbos de <i>Odontoglossum bicolor</i> Lindl "sacato"</p> <p>Indicador para toxicidad aguda: Extracto a 2000 mg/kg</p> <p>Indicador para genotoxicidad: Extracto a 200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kg.</p> <p>Variable dependiente. Toxicidad aguda</p> <p>Indicador: comportamiento general, pérdida de peso y muerte inducidos Efecto genotóxico</p> <p>Indicador:% de micronúcleos</p>	<p>Tipo de investigación Experimental</p> <p>Población: Pseudobulbos de <i>Odontoglossum bicolor</i> Lindl. "sacato" que crecen a 3500 msnm en las faldas del cerro Razuhuilca, en la provincia de Huanta, región Ayacucho.</p> <p>Muestra: Dos kilogramos de pseudobulbos secos de <i>Odontoglossum bicolor</i> Lindl. "sacato".</p> <p>Tipo de muestreo: por conveniencia</p> <p>Unidad experimental: <i>Mus musculus</i> "ratón"</p> <p>Determinación de la toxicidad aguda. Se realizó por el método de la clase tóxica aguda descrito en la normativa N° 423 de la OECD</p> <p>Determinación de la genotoxicidad "Prueba de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos" Test N° 474 de la OCDE 2016.</p> <p>Análisis de datos Los datos obtenidos se expresaron en forma de medias y desviación estándar, y se representaron mediante tablas y figuras. La significancia estadística del peso corporal de los ratones se estimaron haciendo uso de la prueba de Dunnett al igual que el % de micronúcleos con un nivel de confianza del 95%, utilizando el software SPSS versión 22</p>