

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 *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo” en  
*Mus musculus* “ratón”. Ayacucho 2019.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICA

Presentado por la:

**Bach. CERVANTES AMAO, Fairus**

AYACUCHO – PERÚ

A mis padres y a mis hermanos  
que a través de su amor y  
buenos valores ayudan a trazar  
mi camino.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por guiarme en mi camino y por permitirme lograr mi objetivo.

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, así mismo a todos los docentes que me impartieron sus conocimientos y experiencias en el transcurso de mi vida estudiantil.

A mi asesor el Dr. Q.F Edwin Enciso Roca, quien accedió a brindarme su conocimiento, paciencia, capacidad y experiencia científica.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes del estudio	3
2.2. Redacción del marco teórico	12
2.2.1 <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”	12
2.2.2 Tóxico, Toxicidad y Genotoxicidad.	15
2.2.3 Método de dosis fija a dosis límite OECD 423.	18
2.2.4 Micronúcleos	18
2.2.5 Método para evaluar la genotoxicidad: Test de micronúcleos.	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Lugar de ejecución	23
3.2 Población y muestra	23
3.3 Unidad experimental	23
3.4 Metodología y recolección de datos	23
3.4.1 Recolección de la muestra	23
3.4.2 Lavado y secado de la muestra	23
3.4.3 Molienda	24
3.4.4 Obtención del extracto hidroalcohólico	24
3.4.5 Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico	24
3.4.6 Determinación de la toxicidad aguda	25
3.4.7 Determinación de la genotoxicidad	26
3.5 Tipo de investigación	27
3.6 Análisis de datos estadísticos	28
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSIÓN	39
VI. CONCLUSIONES	47
VII. RECOMENDACIONES	49
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	57

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1:</b> Criterios definidos por la HUMN para la selección de células binucleadas y micronúcleos en cultivos de células humanas.	21
<b>Tabla 2:</b> Dosis y tratamiento por grupo para la determinación de genotoxicidad. Ayacucho 2019.	26
<b>Tabla 3:</b> Diseño de investigación con post prueba y grupo control de la toxicidad aguda. Ayacucho 2019.	28
<b>Tabla 4:</b> Diseño de investigación con post prueba y grupo control del efecto genotóxico. Ayacucho 2019.	28
<b>Tabla 5:</b> Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.	31
<b>Tabla 6:</b> Comportamiento general de los ratones en la evaluación de la toxicidad aguda a 2000 mg/kg con el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1:</b> <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”	13
<b>Figura 2:</b> Formación de micronúcleos (MN).	19
<b>Figura 3:</b> Variación de peso corporal de ratones en función al día 1 al evaluar la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”, Ayacucho 2019.	33
<b>Figura 4:</b> Variación de peso corporal de ratones en función al día 7 al evaluar la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”, Ayacucho 2019.	34
<b>Figura 5:</b> Variación de peso corporal de ratones en función al día 14 al evaluar la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”, Ayacucho 2019.	35
<b>Figura 6:</b> Variación del porcentaje de micronúcleos de la sangre periférica de <i>Mus musculos</i> “ratones” con el extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”, Ayacucho 2019.	36
<b>Figura 7:</b> Variación del porcentaje de micronúcleos de la médula ósea de <i>Mus musculos</i> “ratones” con el extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”, Ayacucho 2019.	37

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
<b>Anexo 1:</b> Certificado de identificación botánica de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo” Ayacucho 2019.	59
<b>Anexo 2:</b> Procedimiento para la obtención del extracto hidroalcohólico <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.	60
<b>Anexo 3:</b> Recolección, secado y molienda de las hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. “hinojo”. Ayacucho 2019.	61
<b>Anexo 4:</b> Obtención y concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019	62
<b>Anexo 5:</b> Ensayo de identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.	63
<b>Anexo 6:</b> Ensayo de toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.	64
<b>Anexo 7:</b> Micronúcleos presentes en el ensayo de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019	65
<b>Anexo 8:</b> Pesos individuales de los <i>Mus musculos</i> “ratones”, antes de administrar el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”, a los 7 días y 14 días. Para la evaluación de la toxicidad aguda a dosis de 2000 mg/kg. Ayacucho 2019.	66
<b>Anexo 9:</b> Cantidad de micronúcleos en sangre periférica de <i>Mus musculos</i> “ratones” con el extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019	67
<b>Anexo 10:</b> Cantidad de micronúcleos en médula ósea de <i>Mus musculos</i> “ratones” con el extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019	69

<b>Anexo 11:</b>	Prueba de normalidad del peso corporal de ratones al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.	71
<b>Anexo 12:</b>	Datos descriptivos del peso corporal de ratones del día 1, al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.	72
<b>Anexo 13:</b>	Datos descriptivos del peso corporal de ratones del día 7, al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.	73
<b>Anexo 14:</b>	Datos descriptivos del peso corporal de ratones del día 14, al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.	74
<b>Anexo 15:</b>	Análisis de varianza del peso corporal de ratones del día 1, al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.	75
<b>Anexo 16:</b>	Análisis de varianza del peso corporal de ratones del día 7, al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.	76
<b>Anexo 17:</b>	Análisis de varianza del peso corporal de ratones del día 14, al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.	77
<b>Anexo 18:</b>	Prueba T student del peso corporal de ratones del grupo experimental, al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.	78

<b>Anexo 19:</b>	Prueba T student del peso corporal de ratones del grupo control, al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.	79
<b>Anexo 20:</b>	Prueba de normalidad del porcentaje de micronúcleos de la sangre periférica, en la prueba de genotoxicidad, tratados con el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. “hinojo”. Ayacucho 2019.	80
<b>Anexo 21:</b>	Prueba de normalidad del porcentaje de micronúcleos de la médula ósea, en la prueba de genotoxicidad, tratados con el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. “hinojo”. Ayacucho 2019.	81
<b>Anexo 22:</b>	Datos descriptivos del porcentaje de micronúcleos de la sangre periférica, en la prueba de genotoxicidad Ayacucho 2019.	82
<b>Anexo 23:</b>	Datos descriptivos del porcentaje de micronúcleos de la médula ósea, en la prueba de genotoxicidad Ayacucho 2019.	83
<b>Anexo 24:</b>	Prueba de Kruska - Wallis del porcentaje de micronúcleos de la sangre periférica, en la prueba de genotoxicidad, tratados con el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.	84
<b>Anexo 25:</b>	Prueba de Kruskal - Wallis del porcentaje de micronúcleos de la médula ósea, en la prueba de genotoxicidad, tratados con el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.	85
<b>Anexo 26:</b>	Análisis de comparaciones múltiples del porcentaje de micronúcleos de la sangre periférica, en la prueba de genotoxicidad, tratados con el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.	86

<b>Anexo 27:</b>	Análisis de comparaciones múltiples del porcentaje de micronúcleos de la médula ósea, en la prueba de genotoxicidad, tratados con el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. “hinojo”. Ayacucho 2019.	87
<b>Anexo 28:</b>	Matriz de consistencia. Ayacucho 2019.	89

## RESUMEN

Los estudios de toxicidad de las plantas medicinales son escasos y es necesario realizarlos, sobre todo en aquellas que son ampliamente utilizadas, tal como *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”, ya que los compuestos químicos presentes en las plantas medicinales pueden interactuar directa o indirectamente con el ADN, produciendo cambios que afectan el funcionamiento celular y que pueden causar trastornos en la salud. El presente trabajo de investigación experimental se desarrolló con el objetivo de determinar la toxicidad aguda y genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”. Esta investigación se realizó en los laboratorios de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. El extracto hidroalcohólico se obtuvo por maceración con etanol al 80 % durante 7 días, la toxicidad aguda se realizó por el método de dosis fija a dosis límite según la OECD 423 y la genotoxicidad se realizó por el test de micronúcleos. Los metabolitos secundarios identificados fueron: alcaloides, cumarinas, catequinas, terpenos, esteroides, glicósidos cardiotónicos, taninos, fenoles, saponinas y flavonoides. El extracto hidroalcohólico no produjo muerte ni signos tóxicos posteriores a la administración. En el estudio de genotoxicidad se observó que hay un menor porcentaje de micronúcleos a concentraciones de 200 y 400 mg/kg a diferencia de la concentración de 800 mg/kg ( $p < 0,05$ ). Concluyendo que el extracto hidroalcohólico no produce toxicidad aguda y es genotóxico a dosis de 800 mg/kg.

**Palabras clave:** Genotoxicidad, toxicidad aguda, *Foeniculum vulgare* Mill.

## I. INTRODUCCIÓN

La existencia de plantas con un elevado potencial terapéutico constituye una alternativa farmacológica de marcado interés en el tratamiento de muchas enfermedades, de ahí la importancia de realizar estudios pre-clínicos con el propósito de detectar posibles efectos tóxicos post- administración<sup>1</sup>.

La población humana en general reconoce que las plantas medicinales poseen propiedades terapéuticas para diferentes males gracias a que estas contienen diferentes metabolitos secundarios, los mismos que constituyen el principio activo, la propiedad curativa, pero estas también pueden tener efectos secundarios, entre ellos aquel que puede causar daño a nivel del ADN de las células del organismo que está recibiendo el tratamiento directamente con estas plantas o con los productos procesados, por lo que es necesario conocer si estas pueden ser potencialmente tóxicas, ejerciendo este efecto en el ADN y qué concentraciones se puede presentar. Generalmente la actividad farmacológica de las hierbas medicinales se asocia con la toxicidad de las mismas y el efecto tóxico inducido depende de la dosis consumida<sup>1</sup>.

El presente estudio de investigación se planteó las siguientes hipótesis:

Hi: El extracto extracto hidroalcohólico de las hojas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo” presenta toxicidad aguda y genotoxicidad en *Mus musculus* “ratón”.

Ho: El extracto extracto hidroalcohólico de las hojas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo” no presenta toxicidad aguda y genotoxicidad en *Mus musculus* “ratón”.

Uno de los ensayos para evaluar la toxicidad aguda es descrito por la normativa N° 423 de la OECD4 y Rivadeneira A. En el cual consiste en la distribución en dos grupos (grupo control y grupo experimental) con igual número de hembras y machos en ambos grupos. Después se procederá a administrar al grupo experimental el extracto en una sólo dosis de 2000 mg/kg de peso corporal por vía oral. Al grupo control se le administrara agua destilada. Luego se observarán el comportamiento de los animales y el peso<sup>2,3</sup>.

Para evaluar la genotoxicidad se empleó el ensayo de micronúcleos considerado como un ensayo práctico, universalmente validado y accesible tecnológicamente, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos, capaz de detectar indirectamente rotura o pérdida cromosómica y que actualmente se encuentra en gran auge dada su utilización en líneas de investigación sobre mutagenesis. El resultado se considera positivo cuando se obtiene un incremento estadísticamente significativo en el número de micronúcleos encontrados en el grupo tratado con respecto al grupo control negativo<sup>4</sup>.

Los métodos utilizados son eficaces y eficientes que pueden ser utilizados como un procedimiento primario para determinar genotoxicidad en trabajos de investigación científica, para la búsqueda de plantas con este efecto, para advertir y prevenir el consumo indiscriminado de plantas medicinales y/o productos derivados de las mismas, o utilizarse para tratamiento anticancerígeno; así mismo en el control de calidad y vigilancia de los medicamentos de origen vegetal, sea en forma natural o productos semi-industrializados e industrializados, en resguardo de la salud de los consumidores.

Actualmente en Ayacucho una de las plantas con mayor valor cultural y uso constante es el hinojo. Por ello los objetivos del presente estudio son:

Objetivo general:

- Determinar la toxicidad aguda y genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo” en *Mus musculus* “ratón”.

Objetivos específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”.
- Determinar la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo” en *Mus musculus* “ratón”.
- Determinar la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo” en *Mus musculus* “ratón”.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes del estudio

Nuestro país posee una flora rica en plantas medicinales, experimentando cada día un incremento de la preferencia en el consumo nacional, como también en otros países. En los últimos años las plantas medicinales han adquirido gran importancia en terapias alternativas o complementarias, por esta razón los estudios las propiedades medicinales y genotóxicos de los fitofármacos son esenciales.

Son diversas las investigaciones realizadas que demuestran las propiedades medicinales de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”:

En Iran el año 2019 Mokaberinejad *et al*<sup>5</sup>, realizó una investigación titulada “La comparación del infuso de hinojo más ventosas en seco versus metformina en el tratamiento de la oligomenorrea en pacientes con síndrome de ovario poliquístico (un ensayo clínico aleatorizado)”. Se realizó un ensayo clínico en 61 pacientes con oligomenorrea. Los pacientes recibieron tratamiento al azar durante seis meses en dos grupos: infusión de hinojo más ventosas en seco (grupo A); versus tratamiento con metformina (grupo B). En los días entre los dos períodos, se evaluaron el IMC de los pacientes, los niveles de dolor y los efectos secundarios. Se incluyeron 31 pacientes (edad media: 26 a 68 años) en el Grupo A y 30 pacientes (edad media: 28 a 90 años) en el grupo B. La media de días entre los dos períodos después de tres y seis meses en el grupo A fue, respectivamente; 32,59 y 30,69, frente a 40,66 y 431,22 en el grupo B. La severidad media del dolor se redujo significativamente en el grupo A. El estudio concluye que la infusión de semillas de hinojo más ventosas en seco es una intervención terapéutica segura y eficaz para reducir los días entre los períodos menstruales y controlar la oligomenorrea.

En Iran el año 2018 Akhbari *et al*<sup>6</sup>, realizó una investigación titulada “Análisis y evaluación de las actividades antimicrobianas y anticancerígenas del aceite

esencial aislado de *Foeniculum vulgare* de Hamedan”. Evaluó las propiedades biológicas del aceite esencial aislado de semillas de *Foeniculum vulgare* (*F. vulgare*). El análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS) reveló que los compuestos principales del aceite esencial eran trans-anetol (80,63 %), L-fenchona (11,57 %), estragol (3,67 %) y limoneno (2,68 %). La actividad antibacteriana del aceite esencial contra nueve cepas gram-positivas y gram-negativas se estudió mediante la difusión de discos y los ensayos de dilución de micropocillos. El aceite esencial exhibió la actividad antibacteriana contra tres cepas gram negativas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Shigella dysenteriae*. El estudio preliminar sobre la toxicidad del aceite de semilla se realizó utilizando la prueba de letalidad de camarón de salmuera (BSLT). Los resultados indicaron el efecto de alta toxicidad del aceite esencial ( $CL_{50} = 10 \mu\text{g/mL}$ ). La actividad anticancerígena *in vitro* del aceite de semilla se investigó contra el cáncer de mama humano (MDA-Mb) y las líneas celulares de carcinoma epitelioide cervical (hela) mediante el ensayo del bromuro de [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazo (MTT). Los resultados mostraron que el aceite de semilla se comporta como un agente anticanceroso muy potente con  $IC_{50}$  de menos de  $10 \mu\text{g/mL}$  en ambos casos.

En Pakistan el año 2017 Bartool *et al*<sup>7</sup>, realizó un estudio titulado “Estudio de las actividades anticancerígenas y antibacterianas de *Foeniculum vulgare*, *Justicia adhatoda* y *Urtica dioica* como curativos naturales”. Analizó el potencial antibacteriano de algunas plantas medicinales contra patógenos resistentes a múltiples fármacos (MDR) y el efecto anticancerígeno contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Los extractos metanólicos y etanólicos se analizaron para determinar su actividad antibacteriana mediante el método de difusión en disco contra seis cepas bacterianas MDR y para la evaluación de la citotoxicidad mediante el ensayo MTT. Los extractos etanólicos de las tres plantas analizadas mostraron un efecto inhibitor del crecimiento contra la neumonía por *Klebsiella*, *Serratia marcescens* y *Serratia aureus* resistente a la meticilina. *Pseudomonas aeruginosa* fue más resistente a todos los extractos ya que su crecimiento fue inhibido por los extractos de todas las plantas probadas. El extracto de etanol de *Foeniculum vulgare* mostró una inhibición significativa de la proliferación de células cancerosas y el extracto de metanol de *Justicia adhatoda* también mostró una inhibición considerable de las células cancerosas.

En Iraq el año 2015 Hussein *et al*<sup>8</sup>, realizó un estudio titulado “Estudio de la composición química de *Foeniculum vulgare* utilizando el espectrofotómetro infrarrojo por transformada de Fourier y la cromatografía de gases - espectrometría de masas”. El análisis se realizó del extracto de semilla metanólica de *Foeniculum vulgare*, por el método de cromatograma GC-MS hallando la presencia de 56 picos. Los principales compuestos fitoquímicos identificados fueron: L-fenchona (actividad antitumoral), 2-propil-tetrahidropiran-3-ol (efecto antagigénico), estragol (efecto antiinflamatorio), anetol (antiematogénico), 2- metoxi- 4- vinilfenol (antiinflamatorio), d-manosa (previene infecciones del tracto urinario), corimbolona (agente antifúngico), fenretinida (actividad anticancerígena), ácido vaccénico (actividad anticancerígena) y apíol (antiperético, diurético).

En Ethiopia el año 2015 Abdurazak<sup>9</sup>, realizó una investigación titulada “Evaluación de la actividad diurética del extracto acuoso y metanol al 80 % de las hojas de *Foeniculum vulgare* Mill (*Apiaceae*) en ratas”. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto diurético. Las ratas *Spargue Daweley* se dividieron en ocho grupos, cada uno con seis ratas. El grupo de control recibió 10 mL/kg de agua destilada, el grupo de referencia recibió 10 mg/kg de hidroclorotiazida y los grupos de prueba recibieron diferentes dosis de extracto acuoso y metanol al 80 % (100, 200 y 400 mg/kg) por vía oral. La producción de orina se recogió hasta 24 h y se analizó el contenido de electrolitos. Las ratas tratadas con dosis de 200 y 400 mg/kg de extracto acuoso y metanol al 80 % de *Foeniculum vulgare* mostraron un aumento en el volumen de orina ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, la dosis de 100 mg/kg de ambos extractos no pudo producir un aumento significativo en el volumen de orina de 24 h en comparación con los grupos de control. Ambos extractos aumentaron la natriuresis, la kaliuresis y la cloriuresis ( $p < 0,001$ ) en las dosis medias y altas. El resultado indicó que la planta está dotada de una actividad significativa, siendo el agua mejor que el extracto de metanol al 80 %. Los principales componentes como flavonoides, taninos, terpenoides y alcaloides que se encuentran en la planta podrían haber contribuido a la actividad diurética observada.

En Arequipa el año 2019 Huamán *et al*<sup>10</sup>, realizó un estudio titulado “Efecto del *Foeniculum vulgare* en el perfil lipídico de adultos jóvenes con sobrepeso y obesidad”. Realizó un estudio de tipo experimental puro prospectivo. Participaron 34 adultos jóvenes, formándose dos grupos de 17 participantes cada uno; un

grupo control (GC), a los que se les administró un té placebo de gelatina neutra y uno experimental (GE), a los que se les dio té de hinojo (250 mL), ambos durante 21 días. Aplicó la prueba t-Student ( $p < 0,05$ ) y la prueba Wilcoxon para muestras relacionados y la U de Mann-Whitney para muestras independientes al evaluar triglicéridos. Después de tres semanas de administración de *Foeniculum vulgare* en el GE el colesterol y triglicéridos bajó significativamente; 5,49 % y 26,36 %, respectivamente ( $p < 0,05$ ). El estudio concluye que el consumo del *Foeniculum vulgare* en adultos jóvenes con sobrepeso y obesidad reduce significativamente los niveles de triglicéridos y colesterol total.

En Arequipa el año 2018 Lucana<sup>11</sup>, realizó un estudio titulado “Efecto hipolipidémico del extracto hidroalcohólico del hinojo (*Foeniculum vulgare* M.) en ratas hipercolesterolemicas”, determinó cualitativamente la presencia de flavonoides en el extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill, por el método de cromatografía de capa fina y demostró el efecto hipolipémico en modelos de experimentación *in vivo*, obtuvo extractos hidroalcohólicos del espécimen mediante el método Soxhlet y concentró mediante rotavapor para ser reconstituidos en suero fisiológico y administrarlos oralmente con cánula en ratas *Rattus norvegicus* variedad Wistar previamente habiéndoles inducido hiperlipidemia mediante una dieta rica en grasa, conteniendo yemas de huevo de gallina y cerebro de cordero. Comparó la potencia de los extractos vegetales mediante un arreglo experimental de cinco grupos de cuatro ratas cada uno: tres grupos de tratamiento recibieron diferentes dosis de extracto de *Foeniculum vulgare* M. 0,8; 4 y 20 mg/kg/día, el grupo control positivo recibió atorvastatina a 0,06 mg/kg/día, y el grupo control negativo recibió 2 mL de suero fisiológico diariamente. Durante la experimentación animal, incluyendo la inducción de hiperlipidemia y la administración del tratamiento, se tomaron en total cuatro muestras de sangre a las 20 ratas mediante punción retro orbital en el ojo derecho para evaluárseles el perfil lipídico y realizar los análisis estadísticos respectivos. Concluyó que no hubo diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre el efecto producido por el extracto a dosis 20 mg/kg y el control de atorvastatina a 0,06 mg/kg considerando los niveles de colesterol y triglicéridos en modelos de experimentación *in vivo*.

En Cajamarca el año 2016 López *et al*<sup>12</sup>, realizó un estudio titulado: Comparación de la actividad antiulcerosa de los extractos de *Foeniculum vulgare* “hinojo” y *Solanum tuberosum* “papa” en *Rattus rattus* variedad *albinus*. Un

estudio cuasi experimental, con una muestra de 40 especímenes del género *Rattus* variedad *albinus* machos, distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos de 10 especímenes cada uno, grupo experimental se les administró vía oral los extractos de papa a dosis de 20 mL/kg de peso y de hinojo a dosis de 300 mg/kg de peso respectivamente, grupo control positivo con administración vía oral de ranitidina a dosis de 50 mg/kg de peso y un grupo control negativo con administración vía oral de suero fisiológico a dosis de 10 mL/kg de peso; el agente ulcerogénico empleado fue indometacina administrada vía oral a una dosis de 50 mg/kg de peso. Los resultados obtenidos demostraron que el extracto de *Solanum tuberosum* “papa” a dosis de 20 mL/kg presenta mayor actividad antiulcerosa a diferencia del extracto de *Foeniculum vulgare* “hinojo” a dosis de 300 mg/kg a nivel de porcentaje de protección donde se obtuvo como resultados 53,92 % en el grupo problema I “papa” en comparación a un 20,16 % en el grupo problema II “hinojo”; así como en el tamaño del área de las úlceras formadas donde se obtuvo como resultados 41,07 mm<sup>2</sup> de daño en el caso del grupo problema I “papa” a comparación de 71,11 mm<sup>2</sup> de daño en el caso del grupo problema II “hinojo”. Estos resultados fueron contrastados con los análisis no paramétricos ANOVA y t de Student en los cuales se obtuvo un valor de “p” menor a 0,05 donde se concluyó que existe una diferencia significativa entre los grupos estudiados en donde se demuestra que el grupo problema I “papa” tiene mejor efecto antiulceroso que el grupo problema II “hinojo”.

En Arequipa el año 2016 Fuentes y Zapana<sup>13</sup>, realizaron un estudio titulado “Efecto del *Foeniculum vulgare* (hinojo) en la foliculogénesis y maduración folicular en ratas *norvegicus* en comparación con citrato de clomifeno”. Este estudio de campo experimental, observacional y prospectivo demostró que el 100 % del grupo de ratas que recibieron citrato de clomifeno, presentaron folículos primarios. Además, el 90 % del grupo de ratas que recibieron dosis de hinojo de 800 mg/kg mostraron folículos secundarios y el 80 % tenían folículos maduros. También mostró que el 80 % del grupo de ratas que recibieron hinojo en dosis de 400 mg/kg mostraron folículos secundarios y el 70 % de este mismo grupo tenía folículos maduros, sin diferencias significativas. La prueba de Tukey indica que se encontró el mayor número de folículos primarios cuando se aplicó citrato de clomifeno y el mayor número de folículos secundarios y maduros cuando se aplicó la concentración de hinojo 800 mg/kg. Concluyendo que el

extracto etanólico de *Foeniculum vulgare* (hinojo) ha demostrado que tiene efecto en la foliculogénesis y maduración folicular en ratas.

En Trujillo el año 2016 Espinola y Francis<sup>14</sup>, realizaron un estudio titulado: Efecto del infuso de hojas de *Foeniculum vulgare* “hinojo” y *Ocimum basilicum* “albahaca” sobre íleon aislado de *Cavia porcellus*. Identificaron metabolitos secundarios cualitativamente según la prueba de gota de Olga Lock de Ugaz al 10 % p/v, en el infuso de *Foeniculum vulgare* “hinojo” identificaron compuestos fenólicos y flavonoides, y en el infuso de *Ocimum basilicum* “albahaca” identificó fenoles, flavonoides, saponinas y alcaloides. Demostraron que el infuso de *Foeniculum vulgare* “hinojo”, *Ocimum basilicum* “albahaca” y mezcla presentan efecto antiespasmódico sobre las contracciones inducidas por acetilcolina respecto a la frecuencia y amplitud en íleon aislado de *Cavia porcellus*. La dosis de 3 mL de *Ocimum basilicum* “albahaca” al 10 % p/v presenta un efecto antiespasmódico similar al control positivo (N-butil bromuro de hioscina).

En Trujillo el año 2016 Castañeda<sup>15</sup>, realizó un estudio titulado “Efecto antifúngico del extracto etanólico de las semillas de *Foeniculum vulgare* Mill sobre CEPA *Candida albicans* ATCC 10804 *in vitro*”. Estudio de tipo comparativo, longitudinal, prospectivo y experimental. La población estuvo conformada por el conjunto de placas inoculadas con las cepas de *Candida albicans*, aplicándoseles el extracto etanólico de la semilla de *Foeniculum vulgare* Mill (hinojo) observando su efecto antifúngico para dichas cepas. El resultado del extracto etanólico de la semilla de *Foeniculum vulgare* Mill (hinojo) tuvo efecto inhibitorio *in vitro* frente a *Candida albicans*, al utilizar las diferentes concentraciones (25 %, 50 %, 75 % y 100 %), y éste efecto se incrementó en relación directamente proporcional a las concentraciones utilizadas en el estudio, dando como CMI el 25 %. Con respecto a los halos de inhibición, al medirlos según escala de Durafford, se obtuvo una sensibilidad media (++) en las concentraciones de 75 % y 100 % y una sensibilidad límite en las concentraciones de 25 % y 50 %. El grupo control (fluconazol) no presentó efecto antifúngico. Concluyendo que el extracto etanólico de la semilla de *Foeniculum vulgare* Mill (hinojo) presenta efecto antifúngico *in vitro* frente a cepas de *Candida albicans* ATCC 10804, siendo la CMI del 25 %. Se apreció crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10804 ante el fluconazol formando un promedio de 1,318 x 10 unidades formadores de colonias (UFC), lo cual nos indica resistencia a dicho fármaco.

En Lima el año 2012 Camasca<sup>16</sup>, realizó una investigación titulada “Estudio de la demanda y estimación del valor cultural y económico de plantas medicinales comercializadas en la ciudad de Ayacucho”. Utilizó el método cualitativo y cuantitativo. Registró 66 especies medicinales, comprendidas en 30 familias y 60 géneros. Las familias con mayor riqueza específica fueron: Asteraceae, Lamiaceae y Fabaceae. Las especies con mayor demanda fueron ruda hembra (*Ruta chalepensis* L.), ruda macho (*Ruta graveolens* L.), orqo muña (*Satureja brevicalyx* E), manzanilla (*Chamomilla recutita*), huerta itana (*Urtica urens* L.) y qera (*Lupinus paniculatus* D.), con 3420, 3410, 3090, 3030, 3030 y 3000 “atados” por mes, respectivamente. El volumen de extracción total de materia verde de las 66 especies medicinales que se comercializan fue de 13 633,575 kg /mes y con una valorización de S/, 34132, 71. El Valor Cultural más alto que reportaron son las especies: ruda macho, ruda hembra, hinojo (*Foeniculum vulgare* Mill.), qera, malva morada (*Lavatera arborea* L.) y romero (*Rosmarinus officinalis* L.) con 0,48; 0,48; 0,33; 0,31; 0,29 y 0,24 respectivamente; mientras que el Valor Económico más alto reportan las especies: orqo muña, manayupa (*Desmodium molliculum*), ruda hembra, qera, qarwancho (*Argemone mexicana* L.) y ruda macho; con 1,77; 1,73; 1,64; 1,46; 1,39 y 1,31; respectivamente. Concluyendo que la comercialización de plantas medicinales en la ciudad de Ayacucho para su uso en la medicina tradicional tiene gran demanda, registrándose valores culturales y económicos importantes, con impacto extractivo preocupante a nivel de las poblaciones naturales y a nivel socio económico.

En Ayacucho el año 2017 Marca<sup>17</sup>, realizó un estudio titulado: Evaluación preliminar de la genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum* L. “ajo” frente a ADN de *Staphylococcus sp.* La estimación del daño genotóxico *in vitro* fue determinado con el “método Tomasevich”, mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1 % y visualizado en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra UVsolo TS. Los metabolitos secundarios identificados en el extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”, fueron fenoles y/o taninos en cantidad abundante; mientras que en el zumo, se detectó la presencia de fenoles y/o taninos y saponinas en cantidad abundante, y cardenólidos en escasa cantidad; el extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo” a concentraciones de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/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. Concluyendo, que el zumo del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”, presenta una potente actividad genotóxica frente al ADN genómico de *Staphylococcus sp.*

En Ayacucho el año 2017 Montes<sup>18</sup>, realizó un estudio titulado: Efecto genotóxico *in vitro* del látex de plantas medicinales de uso dérmico *Argemone mexicana* L. “cardo santo” y *Taraxacum officinale* “diente de león”. Realizó el tamizaje fitoquímico mediante el método de Lock y Miranda, la estimación del daño genotóxico “*in vitro*” fue determinado mediante electroforesis en gel de agarosa. El látex de las plantas medicinales de uso dérmico de *Argemone mexicana* L. “cardo santo” y *Taraxacum officinale* “diente de león” presentaron una importante actividad genotóxica frente al ADN genómico humano. Los metabolitos secundarios que indentificó en el látex *Argemone mexicana* L. “cardo santo” fueron: alcaloides, compuestos fenólicos y taninos (+++), mientras que en el látex de *Taraxacum officinale* “diente de león” fueron: compuestos fenólicos y taninos (+++), alcaloides (+), cardenólidos (+). El látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo” desde 10 % al 100 % de concentración, presentaron un potente efecto genotóxico frente al ADN genómico humano, fragmentándolo en 100 %; mientras que el látex de *Taraxacum officinale* “diente de león” muestran que las concentraciones de 50 % y 100 % de látex presentan fragmentación del ADN en 100 %, y las de 10 % y 25 %, fragmentan el ADN genómico humano entre 40 % a 95 %, siendo esta la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Concluyendo que el látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo” y *Taraxacum officinale* “diente de león” son genotóxicas.

En Ayacucho el año 2016 Martínez<sup>19</sup>, realizó un estudio titulado: Genotoxicidad *in vitro* de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”. Obtuvo el extracto hidroalcohólico etanol: agua (3:1) luego de la maceración durante 7 días, exponiéndose éstos frente al ADN genómico humano y la estimación del daño genotóxico *in vitro* fue determinado con el “Método Tomasevich”, mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1 % y visualizado en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra UV solo TS. Los metabolitos secundarios identificados en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. “chamico”, fueron alcaloides y taninos. Las concentraciones que produjeron mayor daño genotóxico fueron de

500 mg/mL, 400 mg/mL y 300 mg/mL, que mediante la prueba de Kruskal-Wallis el daño genotóxico es directamente proporcional a la concentración del extracto hidroalcohólico de *Datura stramonium* L. y al tiempo de incubación ( $p=1 \times 10^{-4}$ ). Concluyendo que el el extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico" presenta efecto genotóxico *in vitro* sobre el ADN genómico de linfocitos humano.

En Ayacucho el año 2014 Gutierrez<sup>20</sup>, en su estudio: Comparación de la genotoxicidad *in vitro* de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", *Ficus carica* L. "higo", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto". El látex fue obtenido directamente de las plantas, realizando un corte del tallo de la "leche leche", base del fruto verde del "higo" (sicono) y extractos hidroalcohólicos de "tara y eucalipto" fueron obtenidos con alcohol al 80°, realizándose el tamizaje fitoquímico y la genotoxicidad a diferentes concentraciones, expuestos sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania sp* y linfocitos humano; mediante el "Método Tomasevich" propuesto por Miranda, cuya estimación del daño genotóxico "*in vitro*" fue determinado mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio y visualizado en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra UV solo TS. Los metabolitos secundarios identificados fueron: alcaloides, flavonoides fenoles y/o taninos, lactonas y/o cumarinas, saponinas y quinonas. Hay similitudes y diferencias en la genotoxicidad según las concentraciones del látex de "leche leche" influyen en el efecto genotóxico sobre ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Leishmania sp* y linfocito humano, pero no influye sobre ADN genómico de *Candida albicans*; látex de "higo" influyen estadísticamente en el efecto genotóxico sobre ADN genómico de linfocito humano pero no influyen sobre ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Leishmania sp* y el extracto hidroalcohólico de "tara" y "eucalipto" influyen en el efecto genotóxico sobre ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania sp* y linfocito humano. En conclusión, se demuestra que existe diferencias en la genotoxicidad *in vitro* de las plantas medicinales frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania sp* y linfocito humano. El látex de *ficus carica* L. "higo" muestra diferencia estadística al tipo de ADN según el organismo; mientras que el látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucalyptos*

*globulus* Labill "eucalipto" no muestran diferencias estadísticas al tipo de ADN según el organismo.

En Ayacucho el año 2005 Infante<sup>21</sup>, realizó un estudio titulado “Efecto estimulante de la ingesta de infusión de *Foeniculum vulgare* "hinojo" en la secreción láctea de las puérperas”, realizó una investigación experimental y longitudinal (cohorte prospectiva). Las técnicas de acopio de información fueron: la observación, entrevista y la determinación del volumen de la secreción láctea. Utilizó la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA), regresión lineal simple y Chi Cuadrado de Pearson para evaluar la significación estadística. Contrastando la hipótesis se concluye que, la ingesta de infusión de *Foeniculum vulgare* "hinojo" es efectiva en el incremento del volumen de secreción láctea en las puérperas del grupo experimental respecto al grupo control.

## **2.2. Redacción del marco teórico**

### **2.2.1. *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”**

#### **2.2.1.1. Clasificación taxonómica**

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	APIALES
FAMILIA	:	APIACEAE
GÉNERO	:	<i>Foeniculum</i>
ESPECIE	:	<b><i>Foeniculum vulgare</i> Mill</b>
N.V	:	"hinojo"

Fuente: Certificado emitido por la Bióloga Laura Aucasime M. de la Facultad de Ciencias Biológicas (Anexo 1)

#### **2.2.1.2. Descripción botánica**

La planta es herbácea, de porte erecto y puede alcanzar los dos metros de altura. Posee hojas simples, largas y delgadas acabando en segmentos con forma de aguja, con limbo multisectado filiforme alterna y peciolo envainador, carente de estipulas. La inflorescencia es una umbela de pedúnculos y las flores están organizadas en umbelas terminales de color amarillo. Las flores que poseen son hermafroditas, heteroclamídeas y envainadoras. El androceo es de cinco estambres. Gineceo bicarpelar de ovario ínfero. El fruto es un esquizocarpo diaquenio formado por dos mericarpios claramente separados, de color pardos oscuro hasta negruzco, de unos 5 mm de largo<sup>22</sup>.



Figura 1: *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo” <sup>23</sup>.

#### **2.2.1.3. Hábitat y Distribución**

Se encuentra distribuida por las zonas templadas de todo el mundo como por ejemplo Arabia Saudita, India, Mexico, Italia, España, Portugal, Perú, Irán, etc. Aunque nativa de la zona mediterránea y el sur de Europa, donde crece en estado silvestre <sup>24</sup>.

En el departamento de Ayacucho se encuentra distribuida en Quispillacta, Huascaura, huamanga, Chaca y huanta a 2627 m.s.n.m.

#### **2.2.1.4. Composición química**

El *Foeniculum vulgare* M. “hinojo” contiene terpenos (aceites esenciales, monoterpenoides, sesquiterpenos, triterpenos), compuestos fenólicos (fenilpropanoides, cumarinas, taninos, flavonoides) y glicósidos (glucósidos cardíacos y saponinas). El hinojo también contiene ácidos grasos <sup>24</sup>.

##### **➤ Terpenos**

Los terpenos son compuestos orgánicos aromáticos y volátiles que están constituidos por la unión de unidades de un hidrocarburo de 5 átomos de carbono, llamado isopreno. Los compuestos más pequeños y más volátiles son los monoterpenos, que están biosintetizados por la unión de dos moléculas de isopreno, mientras los compuestos más grandes y menos volátiles están biosintetizados por la unión de tres, o más, moléculas de isopreno. Los sesquiterpenos son los siguientes en orden creciente y están formados por la unión de tres moléculas de isopreno. Los terpenos son los metabolitos secundarios que dan las características organolépticas (aroma y sabor) de las plantas y que constituyen la mayor parte del aceite esencial producido por las plantas aromáticas.

En las plantas los terpenos ejercen distintas funciones, las dos principales son la protección frente a los insectos y animales herbívoros, y la protección contra las temperaturas elevadas<sup>25</sup>.

#### ➤ **Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático. Dentro de la clasificación general se encuentran los fenoles, ácidos fenólicos y flavonoides. Existe un gran interés en estudiarlos debido a sus propiedades antioxidantes, su participación en procesos sensoriales de los alimentos naturales y procesados, además de sus posibles aplicaciones benéficas para la salud humana, tales como el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías de carácter inflamatorio<sup>21</sup>. Estos compuestos presentan efectos vasodilatadores, son capaces además de mejorar el perfil lipídico y atenúan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Presentan claros efectos antiinflamatorios y estos compuestos son a su vez capaces de modular los procesos de apoptosis en el endotelio vascular<sup>26</sup>.

A pesar de las características beneficiosas para la salud de los compuestos polifenólicos, la ingesta elevada y crónica de estas moléculas consumidas normalmente en la dieta diaria puede resultar en efectos adversos negativos para la salud. Por ejemplo, algunos taninos pueden ocasionar efectos antinutricionales debido a su capacidad como agentes quelantes. Los polifenoles pueden interferir en la absorción del hierro consumido en los alimentos de la dieta diaria y provocar anemia. Se ha reportado que los polifenoles pueden alcanzar concentraciones tóxicas si su ingesta se encuentra entre el 1 y 5 por ciento total de la dieta diaria, no obstante, en condiciones normales, lo habitual en una persona es ingerir, aproximadamente entre 25 mg y 1 g por día<sup>27</sup>.

#### ➤ **Glicósidos**

Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardíacos y glicósidos cianogénicos. Las acciones farmacológicas de los glicosidos pueden ser a nivel del sistema cardiovascular (cardiotónicas), a nivel del aparato digestivo y como purgantes<sup>28</sup>.

#### **2.2.1.5. Uso en medicina tradicional.**

Dioscórides<sup>29</sup> (s. I d.C.), en su obra “De materia médica”, hacía ya referencia al uso del hinojo de la siguiente manera: “Esta planta, comida, puede provocar la secreción de leche, también su semilla, bebida o cocida con infusión de harina de cebada. La decocción de su cabellera, bebida, es útil para los que sufren del riñón y vejiga por facilitar la orina. Conviene a los que han sufrido mordeduras venenosas con vino, provoca la menstruación, mitiga el mareo en las fiebres y la quemazón de estómago, si se bebe con agua fría. Sus raíces pulverizadas con miel aplicadas en unguento son tratamiento para los que han sufrido la mordedura de un perro. El jugo de majar, los tallos y las hojas, puesto a secar al sol, se aplica útilmente en las enfermedades oculares relacionadas con la agudeza visual. También se hace jugo, cuando todavía está verde, junto a las hojas, las ramitas y la raíz coincidiendo con la primera germinación, con la misma finalidad que la semilla. En la parte occidental de la península ibérica produce una resina semejante a la goma arábiga: la gente del lugar cosecha el medio del tallo en la floración y lo acerca al fuego para que con el calor la goma se destile como por sudoración. Esa goma es más eficaz que el jugo para las enfermedades oculares”.

En la actualidad, el hinojo brinda propiedades diversas entre las que podemos destacar las digestivas, antioxidantes, expectorantes, colestrolémicas, antitusivas y muchas otras<sup>30</sup>.

#### **2.2.2. Tóxico, Toxicidad y Genotoxicidad.**

##### **2.2.2.1. 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 él o 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<sup>31</sup>.

##### **2.2.2.2. Toxicidad.**

Se denomina toxicidad a la actividad tóxica, concreta y específica, vinculada a la estructura química de una sustancia exógena al organismo (xenobiótico) por su interacción con moléculas endógenas (receptor)<sup>32</sup>. El cual está en relación con la cantidad o dosis de sustancia administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo (dosis única o repetidas), tipo y gravedad del daño, tiempo necesario para producir éste, la naturaleza del organismo afectado y

otras condiciones intervinientes<sup>33</sup>. 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” (DL<sub>50</sub>) este es un indicador estadístico de toxicidad aguda, el cual señala la cantidad del tóxico que causa la muerte del 50 por ciento de los animales intoxicados<sup>34</sup>.

**a) 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 horas. Los efectos de una toxicidad aguda pueden ser tan ligeros como náuseas, dolores de cabeza o contracciones estomacales; o tan severos como convulsiones, coma o la muerte<sup>35</sup>.

**b) Toxicidad crónica.** La toxicidad crónica es la propiedad de una sustancia de causar daños a largo plazo. Estos efectos tienen un período de latencia y se manifiestan después de un largo tiempo. Los efectos tóxicos crónicos pueden resultar de una exposición simple severa o repetidas exposiciones a lo largo de un período. Los efectos crónicos pueden ser: neurológicos (daño al sistema nervioso), mutagénicos (daño al material genético que puede ser transmitido a futuras generaciones), cancerígenos (que pueden causar cáncer), sistema reproductor (daño al sistema reproductivo femenino/masculino) y teratogénicos (daño al embrión/feto)<sup>35</sup>.

**c) Toxicidad subcrónica.** Efectos adversos ocasionados por administración o exposición repetida de una sustancia durante un corto periodo de tiempo, usualmente el 10 por 100 de la vida (al menos 90 días en animales)<sup>35</sup>.

#### **2.2.2.3. Genotoxicidad.**

La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos no solo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentren relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula. El efecto genotóxico se expresa en sus diversas formas como, por ejemplo: teratogénesis, mutagénesis y por supuesto la cancerogénesis<sup>34</sup>.

## **Clases de daño genético**

### **a) Mutaciones genéticas**

Son aquellas que producen alteraciones en la secuencia de nucleótidos de un gen. Existen varios tipos:

- Sustituciones de pares de bases. Éstas pueden ser: transiciones (cambio en un nucleótido de una base púrica por otra púrica o de una pirimidínica por otra pirimidínica) y transversiones (cambio de una base púrica por una pirimidínica o viceversa).
- Perdida o inserción de nucleótidos, lo que induce a un corrimiento en el orden de lectura, pueden ser de dos tipos: adiciones genéticas (inserción de nucleótidos en la secuencia del gen) y deleciones génicas (pérdida de nucleótidos).

Las sustituciones provocan la alteración de un único triplete y, por tanto, salvo que indiquen un triplete de parada, o un aminoácido del centro activo de una enzima, pueden no ser perjudiciales. Sin embargo, las mutaciones que impliquen un corrimiento en el orden de lectura, adiciones o deleciones, salvo que se compensen entre sí, pueden alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada y sus consecuencias suelen ser graves<sup>36</sup>.

### **b) Mutaciones cromosómicas estructurales**

Son los cambios en la estructura interna de los cromosomas. Se pueden agrupar en dos tipos:

- Las que suponen pérdida o duplicación de segmentos: deleción cromosómica (pérdida de un segmento de un cromosoma) y duplicación cromosómica (repetición de un segmento del cromosoma).

Las que suponen variaciones en la distribución de los segmentos de los cromosomas: Inversiones (un segmento cromosómico de un cromosoma se encuentra situado en posición invertida) y translocaciones (un segmento cromosómico de un cromosoma se encuentra situado en otro cromosoma<sup>36</sup>).

### **c) Mutaciones cromosómicas numéricas**

Son alteraciones en el número de los cromosomas propios de la especie. Pueden ser:

- Euploidía: Cuando afecta al número de juegos completos de cromosomas con relación al número normal de cromosomas de la especie.
- Aneuploidias: Se dan cuando está afectada sólo una parte del juego cromosómico y el cigoto presenta cromosomas de más o de menos. Las

aneuploidías pueden darse tanto en los autosomas (por ejemplo: el Síndrome de Down), como en los heterocromosomas o cromosomas sexuales (por ejemplo: el síndrome de Turner o el síndrome de Klinefelter)<sup>36</sup>.

### **2.2.3 Método de dosis fija o dosis límite OECD 423.**

El Comité de Salud de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) alude que el método para evaluar la toxicidad aguda es el ensayo límite, realizado con una dosis de al menos 2000 mg/kg de peso corporal administrado en una sola vez. En el caso de estudios de mayor duración, la dosis límite será de 2000 mg/kg de peso corporal/día cuando el tratamiento dure hasta 14 días y de 1000 mg/kg de peso corporal/día cuando el tratamiento dure más de 14 días<sup>2</sup>.

El método de toxicidad a dosis límite está referido como el estudio cualitativo y cuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición en función del tiempo tras la administración de una dosis única de la sustancia o de varias dosis fraccionadas en el transcurso de 24 horas<sup>2</sup>. Brinda información acerca del potencial tóxico de sustancias que pueden tener interacción directa o indirecta con el hombre, por tanto, son exigidas por las agencias regulatorias como parte de las evaluaciones de seguridad y, de estimación de riesgo para la salud de las sustancias químicas, medicamentos, plaguicidas, aditivos alimentarios y comestibles obtenidos por vías no convencionales. Este ensayo tiene entre sus objetivos determinar los signos y síntomas tóxicos que se producen luego de la administración en dosis única a altas concentraciones del compuesto objeto de estudio, así como definir la concentración del mismo que provoca la muerte de los animales sometidos al estudio<sup>3</sup>.

### **2.2.4 Micronúcleos**

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que espontáneamente o por causa de agentes que rompen cromosomas, como las radiaciones (agentes que se denominan clastógenos) o que dañan el huso mitótico, como la vincristina (aneuploidógenos), quedan fuera del núcleo durante la mitosis. Los micronúcleos son conocidos en el campo de la hematología como cuerpos de Howell-Jolly y su forma es generalmente redonda o almendrada, con un diámetro que varía desde 0,4 a 1,6 micras. Su formación se basa en que en el anafase cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo por carecer del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático. Después de la telofase, los cromosomas normales, así como

los fragmentos que posean centrómeros, dan origen a los núcleos de las células hijas; sin embargo, los elementos rezagados que pueden ser fragmentos o cromosomas completos quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas, y una proporción de ellos se transforma en uno o varios núcleos secundarios. Tales núcleos son mucho más pequeños que el núcleo principal, y de ahí su nombre de “micronúcleos”. Entonces, si el compuesto estudiado es un clastógeno, se formarán micronúcleos pequeños, pero si es un aneuploidógeno, lo que observaremos será la formación de micronúcleos grandes<sup>37</sup>.

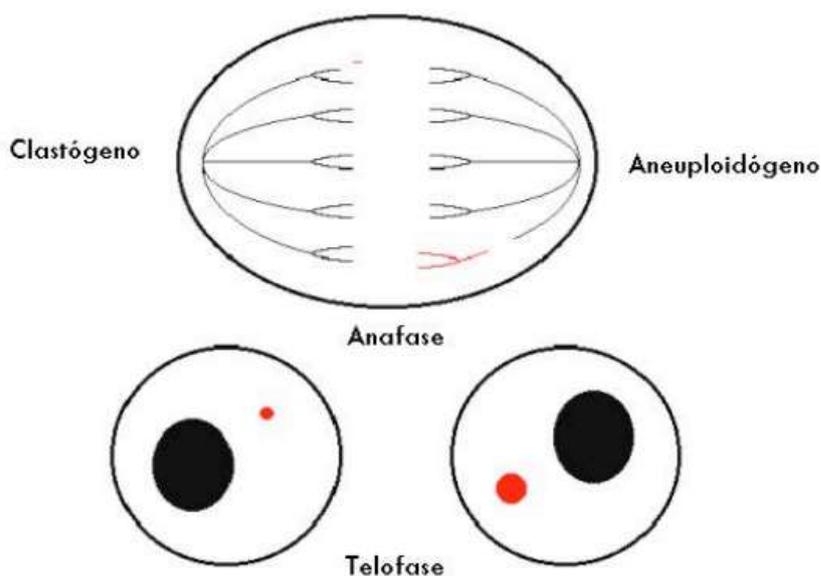


Figura 2: Formación de micronúcleos (MN)<sup>38</sup>.

### 2.2.5 Método para evaluar la genotoxicidad: Test de micronúcleos.

Una de las pruebas más empleadas en estudios de genotoxicidad por exposición ambiental u ocupacional, y para determinar el potencial genotóxico de diferentes compuestos, es la evaluación de micronúcleos (MNs). Esta prueba *in vitro* o *in vivo* combina facilidad en su realización, sencillez en la evaluación y una alta sensibilidad, características que han llevado a validar y recomendar su uso como prueba de genotoxicidad por instituciones como el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD)<sup>38</sup>.

El test 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 rezagados<sup>38</sup>. Es decir, este sistema permite determinar la mutagenicidad de las sustancias químicas o

de un factor al cual esta expuesto el organismo, capaz de inducir rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas. Entre los diversos criterios para distinguir los micronúcleos figura la determinación de la presencia o la ausencia de centrómero o de ADN centromérico en los mismos. El parámetro principal es la frecuencia de eritrocitos inmaduros (policromáticos) micronucleados<sup>39</sup>.

La prueba se realiza en diferentes tipos celulares: eritrocitos policromáticos de la médula ósea, cultivos de linfocitos de sangre periférica, eritrocitos jóvenes y maduros de la sangre periférica, queratinocitos, células de la mucosa bucal, hepatocitos de rata, células germinales y células de descamación de la vagina de la rata, células formadoras de polen, meristemos apicales de la raíz o el tallo, entre otros. Sin embargo, 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 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 son bioindicadores naturales. El ensayo que utiliza médula ósea evalúa un efecto agudo de los productos químicos, pero el método que usa eritrocitos de sangre periférica de ratón puede evaluar un efecto crónico de la sustancia problema analizando los eritrocitos maduros que albergan micronúcleos hasta su vida<sup>40</sup>.

#### **a) Metodología**

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 y las observaciones se hacen en un microscopio con objetivo de inmersión.

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)<sup>4</sup>.

#### **b) Criterios de selección para considerar una célula apta para el análisis.**

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 estadístico:

**Tabla 1:** Criterios definidos por el HUMN para la selección de células binucleadas y de micronúcleos en cultivos de células humanas<sup>38</sup>.

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



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Lugar de ejecución**

El presente trabajo se llevó a cabo entre los meses de mayo del 2019 a junio del 2019 en los laboratorios de la Escuela profesional Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.

#### **3.2 Población y muestra**

##### **3.2.1 Población**

Plantas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo” que que crecen en los diferentes pisos ecológicos de las provincias de Ayacucho, Perú.

##### **3.2.2 Muestra**

Cuatro kilogramos de hojas frescas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”.

##### **3.2.3 Tipo de muestreo**

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

#### **3.3 Unidad experimental**

60 *Mus musculus* “ratón” de ambos sexos de 20 a 40 g de peso, que se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Salud de Lima.

#### **3.4 Metodología y recolección de datos**

##### **3.4.1 Recolección de la muestra**

Las muestras de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo” fueron recolectadas en la provincia de Huamanga del departamento de Ayacucho, todas ellas en buen estado de conservación, recogidas en las primeras horas del día, e inmediatamente fueron transportadas al laboratorio de Toxicología.

La identificación taxonómica de la planta medicinal fue realizada por Bióloga Laura Aucasime Medina.

##### **3.4.2 Lavado y secado de la muestra**

El lavado de las hojas se realizó con abundante agua.

El secado de hojas se realizó solamente de las muestras integras durante diez días a temperatura ambiente, bajo sombra previamente acondicionada teniendo

como base el papel Kraft que se cambió constantemente y volteando las hojas para un secado uniforme y evitando el deterioro por la humedad.

### **3.4.3 Molienda**

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

### **3.4.4 Obtención del extracto hidroalcohólico**

Se pesó 500 gramos de muestra (*Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”) seca y pulverizada, luego se maceró en un frasco de vidrio color ámbar por siete días, para ello se utilizó etanol al 80 % hasta cubrir la muestra por 2 cm de diferencia. Durante el proceso se agitó el frasco durante 10 minutos dos veces al día durante los 7 días de la maceración para que el etanol se distribuya homogéneamente en la muestra. La muestra en maceración se conservó en un lugar fresco y oscuro. Luego se procedió a filtrar con ayuda de papel filtro.

### **3.4.5 Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”**

Se realizó una identificación fitoquímica cualitativa al extracto obtenido de la planta medicinal en estudio, para determinar la presencia de los metabolitos secundarios. Las reacciones de identificación se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Miranda y Cuellar en el año 2000<sup>41</sup>:

- Ensayo de Dragendorff: Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, se le añadió 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, se calentó suavemente y se dejó enfriar hasta acidez, posteriormente se añadió 4 gotas del reactivo Dragendorff.
- Ensayo de Mayer: Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, se le añadió 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, se calentó suavemente y se dejó enfriar hasta acidez, posteriormente se añadió 3 gotas del reactivo Mayer.
- Ensayo de Hager: Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, se le añadió 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, se calentó suavemente y se dejó enfriar hasta acidez, posteriormente se añadió 3 gotas del reactivo Hager.
- Ensayo de Wagner: Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, se le añadió 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, se calentó suavemente y se dejó enfriar hasta acidez, posteriormente se añadió 4 gotas del reactivo Wagner.

- Ensayo de Baljet: Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas. Para ello se adicionó 1 mL del reactivo de Baljet.
- Ensayo de catequinas: Permite reconocer catequinas, para ello con la ayuda de un capilar se tomó 1 gota de la solución alcohólica obtenida y se aplicó sobre papel de filtro. Sobre la mancha se aplicó solución de carbonato de sodio. Posteriormente se observó el papel filtro en luz UV.
- Ensayo de Lieberman - Burchard: Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides. Para ello la alícuota del extracto se evaporó en baño maría y el residuo se disolvió en 1 mL de cloroformo, se adicionó 1 mL de anhídrido acético, se homogenizó y finalmente por las paredes del tubo de ensayo se añadió 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado.
- Ensayo de Kedde: Permite reconocer la presencia de glicósidos cardiotónicos, a la alícuota del extracto hidroalcohólico se le añadió 1 mL de reactivo Kedde.
- Ensayo de cloruro férrico: Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. A la alícuota del extracto hidroalcohólico se le adicionó 3 gotas de solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica.
- Ensayo de espuma: Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, para ello la alícuota se diluyó 5 veces su volumen en agua y se agitó la mezcla fuertemente durante 8 minutos.
- Ensayo de Shinoda: Permite reconocer la presencia de flavonoides, para ello la alícuota se diluyó con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y se añadió un pedacito de cinta de magnesio metálico.

#### **3.4.6 Determinación de la toxicidad aguda**

Para evaluar la toxicidad aguda se utilizó el método de dosis fija a dosis límite descrito en la normativa N° 423 de la OECD y Rivadeneira A. con algunas modificaciones. Para la determinación de la toxicidad aguda del extracto:

- Se empleó 20 ratones (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.

- Luego los animales fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos (grupo control y grupo experimental) con igual número de hembras y machos en ambos grupos. Después se procedió a administrar al grupo experimental el extracto en una sola dosis de 2000 mg/kg de peso corporal por vía oral, usando una cánula intragástrica. Al grupo control se le administró 0,3 mL de agua destilada. Terminada la dosificación se volvió a colocar la comida 2 horas después.
- Después de la dosificación con atención especial durante las primeras 4 horas, se observó a los animales individualmente, periódicamente durante las primeras 24 horas y después diariamente, hasta un total de 14 días.
- Se determinó los pesos individuales de los animales, antes de administrar la sustancia experimental, a los 7 días y 14 días.

### 3.4.7 Determinación de la genotoxicidad

Para evaluar la genotoxicidad se usó la "Prueba de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos" Test N° 474 de la OCDE:

- Los animales fueron aclimatados 7 días antes de iniciado el experimento y durante los 14 días de ensayo, en las condiciones adecuadas del bioterio (temperatura controlada de  $22 \pm 2$  °C, ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, cama con viruta y cambio cada 48 horas).
- Se formó cinco grupos de ocho animales, cada uno las cuales fueron distribuidos de manera aleatoria, cada grupo estuvo conformado por cuatro machos y cuatro hembras.
- Posteriormente fueron pesados y marcados.
- Se calculó y administró las dosis de los extractos, a cada uno de los animales de los grupos a ensayar por vía oral, se empleó para ello una cánula intragástrica.

**Tabla 2:** Dosis y tratamiento por grupo para la determinación de genotoxicidad. Ayacucho 2019.

Grupos	Tratamiento	Dosis
I	Solución salina 0,9 %	10 mL/kg
II	Ciclofosfamida	40 mg/kg
III	Extracto hidroalcohólico	200 mg/kg
IV	Extracto hidroalcohólico	400 mg/kg
V	Extracto hidroalcohólico	800 mg/kg

- Los tratamientos fueron administrados dos veces al día durante 48 horas, luego los animales fueron sacrificados 24 horas después de la última administración con halatal 1mL/2,5 kg, este tiempo de estudio estuvo basado en la cinética de maduración de los eritrocitos en ratones.
- Los procedimientos empleados para la obtención de las preparaciones de sangre periférica fueron realizados de la siguiente manera: Se tomó una pequeña muestra de sangre periférica, luego se realizó el respectivo frotis de sangre, después se fijó con etanol 95 % (v/v) durante 5 min y se secó al aire durante 24 horas, posteriormente se realizó el teñido con colorante Giemsa al 5 % durante 15 minutos y finalmente se lavó las laminas portaobjetos con agua corriente durante 10 minutos.
- De igual manera la muestra de médula ósea se recogió en 0,5 mL de suero fisiológico y se fijaron con etanol al 95 % (v/v) durante 5 min y se secaron al aire libre por una hora. Posteriormente se realizó la tinción con colorante Giemsa al 5 % (v/v) en agua corriente durante aproximadamente 10 min.
- Para la observación de micronúcleos se utilizó el microscopio óptico Olympus (modelo CX31RBSFA) de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, con un contraste N° 5 y en campos oculares a 400. Se realizó el conteo por el método manual, se contó aproximadamente 1000 eritrocitos por animal, en campos oculares a 400 aumentos a fin de observar la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos maduros o inmaduros. Los datos fueron expresados en porcentaje de micronúcleos.

### **3.5 Tipo de investigación**

Experimental, porque esta investigación consistió en la manipulación intencional del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo” (variable experimental independiente), en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de probar y determinar si presenta toxicidad aguda y genotoxicidad (variable dependiente no comprobada) en *Mus musculus* “ratón” (grupo experimental)<sup>42</sup>.

#### **3.5.1 Diseño de investigación**

La investigación que se realizó fue un diseño experimental con post prueba (posterior al tratamiento).

**Tabla 3:** Diseño de investigación con post prueba y grupo control de la toxicidad aguda. Ayacucho 2019.

GRUPOS	TRATAMIENTO	OBSERVACIÓN
G <sub>1</sub>	-	O <sub>1</sub>
G <sub>2</sub>	X	O <sub>2</sub>

**Tabla 4:** Diseño de investigación con post prueba y grupo control del efecto genotóxico. Ayacucho 2019.

GRUPOS	TRATAMIENTO	OBSERVACIÓN
G <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	O <sub>1</sub>
G <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
G <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>
G <sub>4</sub>	-	O <sub>4</sub>
G <sub>5</sub>	-	O <sub>5</sub>

La simbología para el diseño experimental y grupo de control fue:

G = Grupo experimental de sujetos o casos (*Mus musculus* "ratones": Grupo I, II, III, IV y V).

X = Tratamiento, estímulo o condición experimental (solución salina, ciclofosfamida, extracto hidroalcohólico de dosis de 200 mg/kg, 400 mg/ kg y 800 mg/ kg).

O = Medición de los sujetos de un grupo (prueba, cuestionario, observación, etc.). Este diseño experimental, tiene como "O" al efecto tóxico.

### 3.6 Análisis de datos estadísticos

Los datos fueron agrupados y presentados en tablas, expresados en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. El daño genotóxico se evaluó mediante el paquete estadístico SPSS versión 23, utilizando la prueba estadística de T de student para ver la variabilidad de peso en el tiempo y la prueba de Dunnett para ver el porcentaje de micronúcleos en sangre periférica y en médula ósea. Se trabajó con un nivel de significancia de 95 % y un margen de error de 5 %, siendo  $\alpha = 0,05$  <sup>43,44</sup>.

#### **IV. RESULTADOS**



**Tabla 5:** Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.

Metabolitos secundarios	Reactivo	Observación	Resultado
Alcaloides	Dragendorff	Formación de	+
	Mayer	precipitado y	+
	Hager	opalescencia	+
	Wagner		+
Lactonas y cumarinas	Baljet	Formación de una coloración roja.	+++
Catequinas	Carbonato de sodio	Coloración verde carmelita a luz UV.	++
Triterpenos y esteroides	Liberman- Buchard	Formación de la coloración negro al final de la reacción.	++
Glicósidos cardiotónicos	Kedde	Formación de una coloración de naranja violácea	++
Taninos y fenoles	Cloruro ferrico	Formación de coloración azul negruzco.	+++
Saponinas	-	Formación de espuma en la superficie.	++
Flavonoides	Shinoda	Formación de una coloración rojo carmelita.	+++

Leyenda:

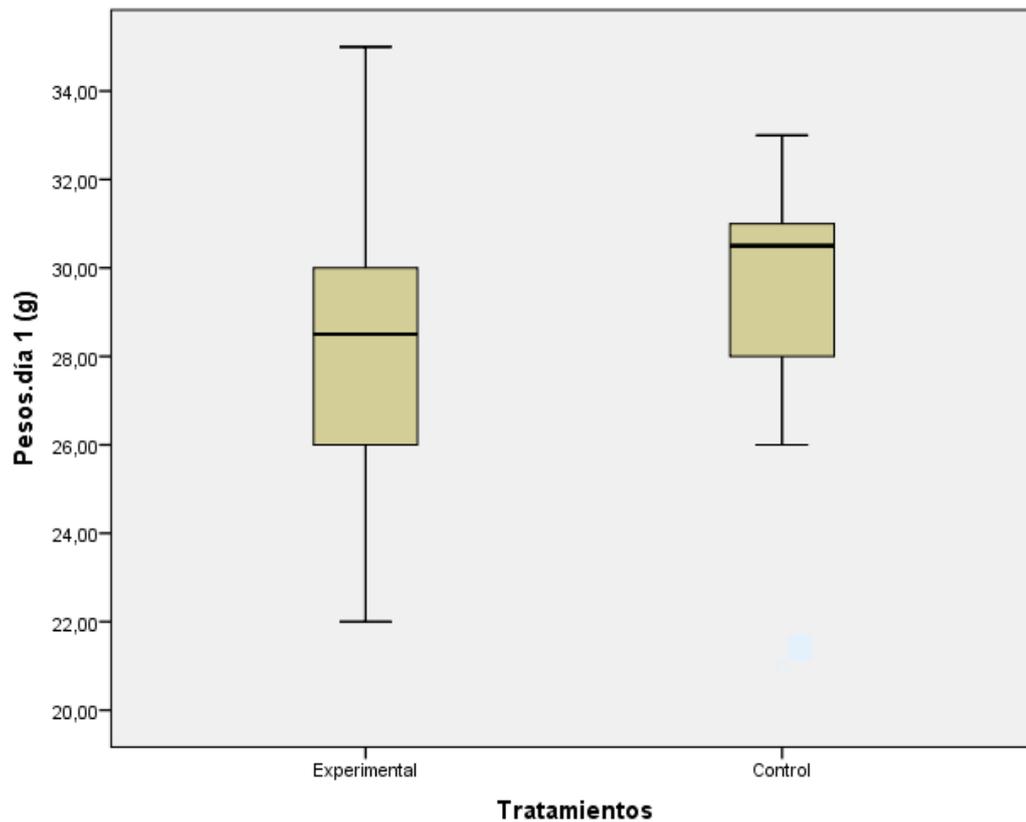
+++ : Abundante/ intenso

++ : Regular/moderado

+ : Escaso/ leve

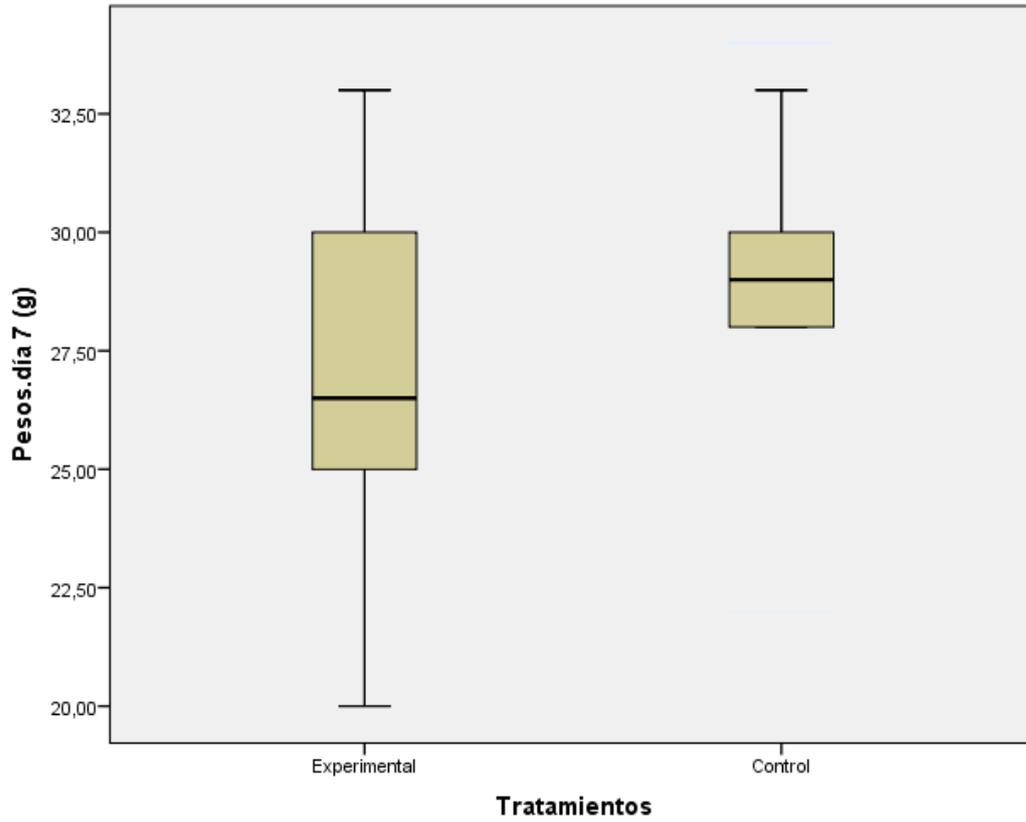
**Tabla 6:** Comportamiento general de los ratones en la evaluación de la toxicidad aguda a 2000 mg/kg con el extracto hidroalcohólico de hojas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.

<b>Dosis/ comportamiento</b>	<b>Grupo control</b>	<b>Extracto 2 000 mg/kg</b>
Disminución actividad motora	3/10	7/10
Aumento de actividad motora	1/10	1/10
Perdida de reflejos de enderezamiento	0/10	0/10
Lagrimación	0/10	0/10
Mucosas pálidas	0/10	0/10
Mucosas hiperémicas	0/10	0/10
Erección de la cola	0/10	0/10
Piloerección	0/10	0/10
Diarrea	0/10	0/10
Agresivo	1/10	1/10
Atemorizado	3/10	7/10



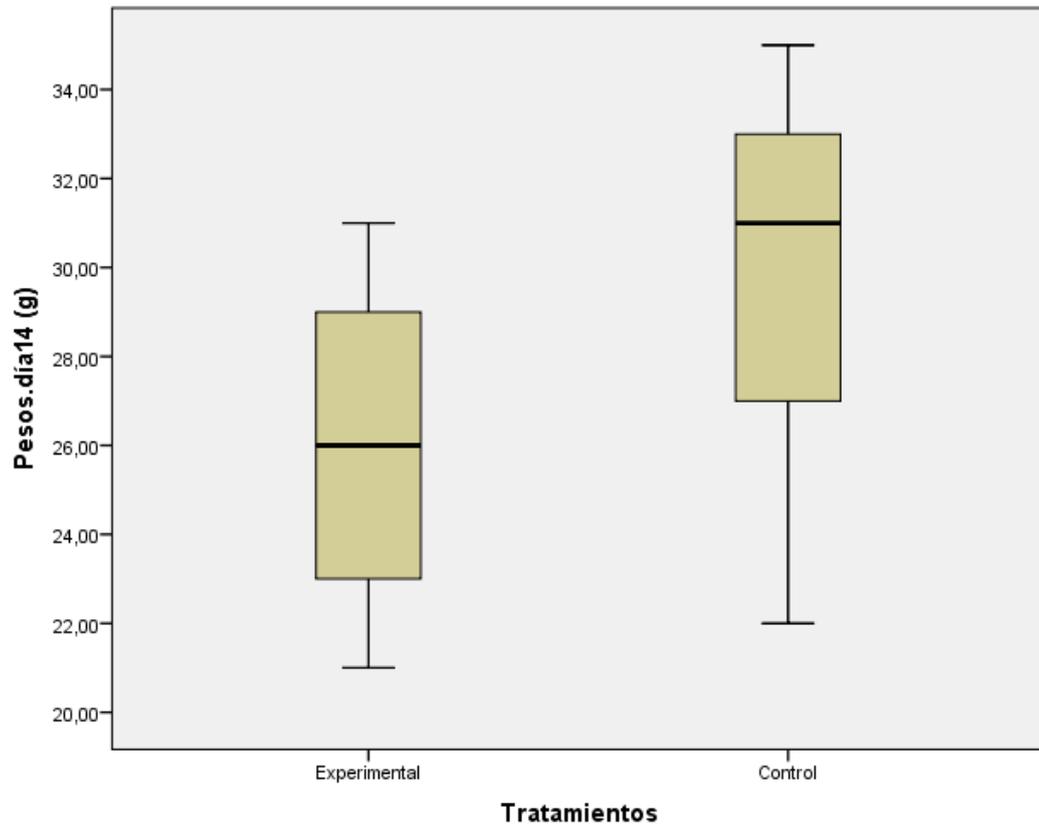
T de student:  $\alpha=0,05$  y  $p=0,541$

**Figura 3:** Variación de peso corporal de ratones en función al día 1 al evaluar la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”, Ayacucho 2019.



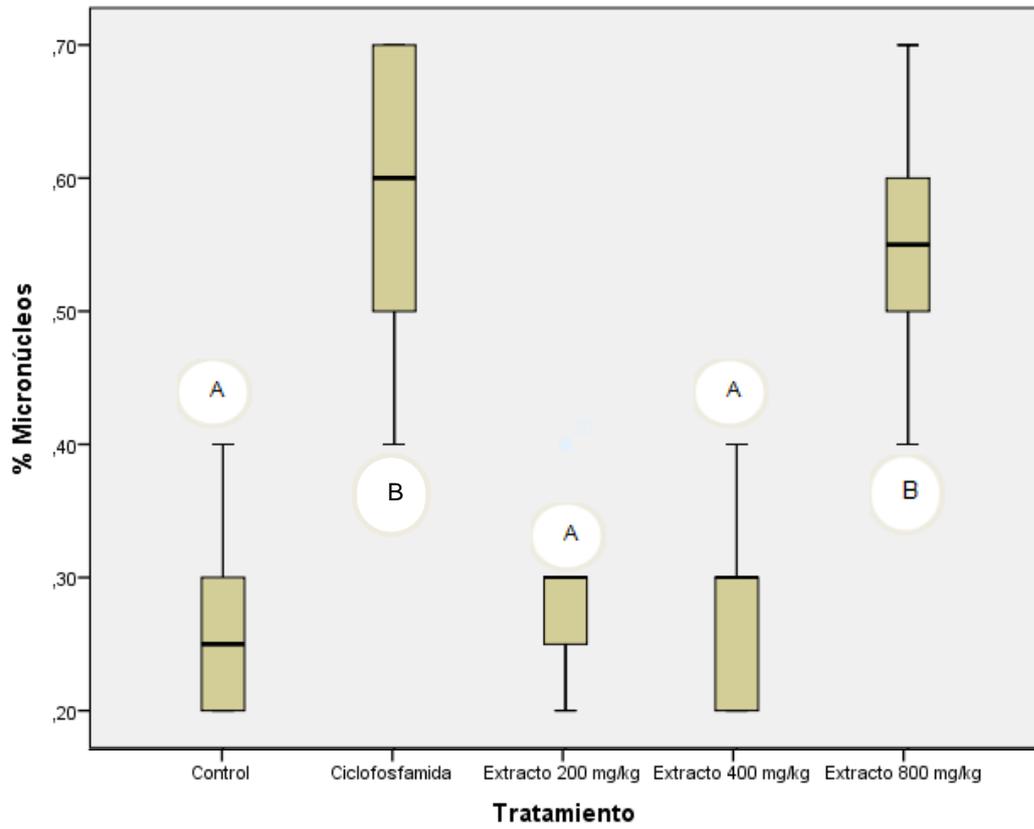
T de student:  $\alpha=0,05$  y  $p=0,225$

**Figura 4:** Variación de peso corporal de ratones en función al día 7 al evaluar la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”, Ayacucho 2019.



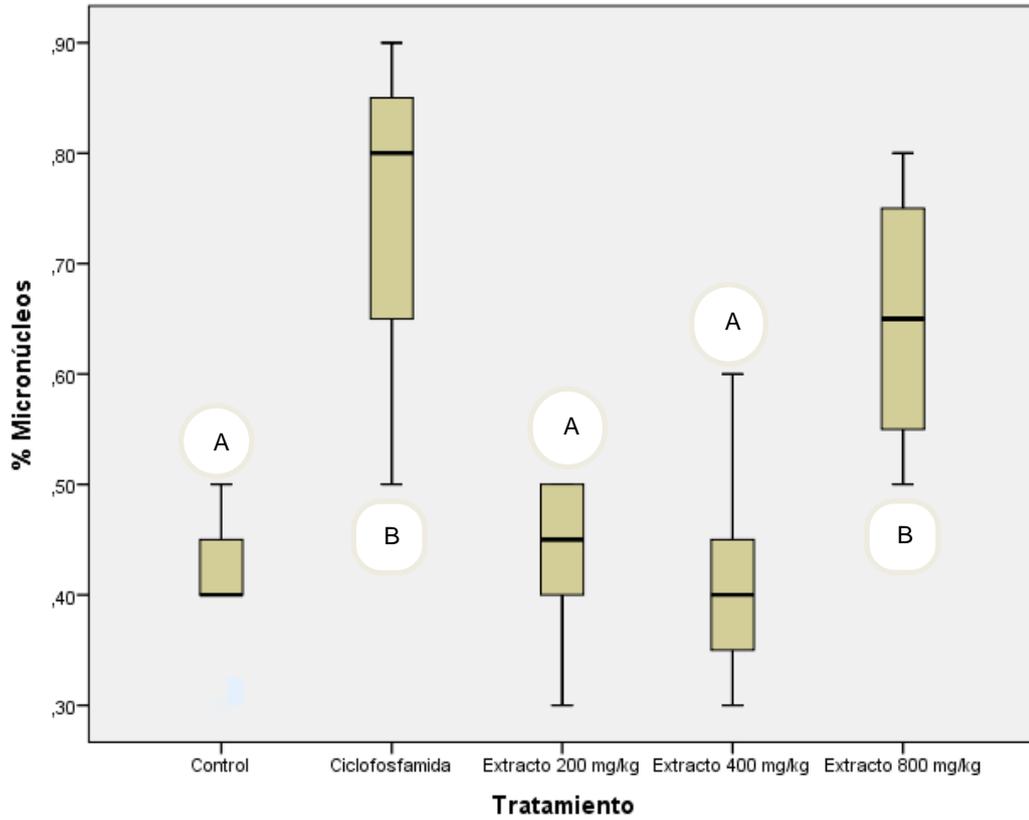
T de student:  $\alpha=0,05$  y  $p=0,038$

**Figura 5:** Variación de peso corporal de ratones en función al día 14 al evaluar la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”, Ayacucho 2019.



Dunnett:  $\alpha=0,05$

**Figura 6:** Variación del porcentaje de micronúcleos de la sangre periférica de *Mus musculus* ratones con el extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”, Ayacucho 2019.



Dunnett:  $\alpha=0,05$

**Figura 7:** Variación del porcentaje de micronúcleos de la médula ósea de *Mus musculos* ratones con el extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”, Ayacucho 2019.



## V. DISCUSIÓN

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

Nuestro país posee una flora rica en plantas medicinales, estos experimentan cada día un incremento en la preferencia del consumo nacional, como también en otros países. En los últimos años las plantas medicinales han adquirido gran importancia en terapias alternativas o complementarias, así mismo en la búsqueda de nuevas estructuras bioactivas para el tratamiento de las enfermedades. Por ello es importante realizar estudios de toxicidad aguda y genotoxicidad para asegurar que su uso sea seguro para la salud de la población que la consuma.

El presente trabajo de investigación permite interpretar los resultados, teniendo como propósito determinar los metabolitos secundarios, la toxicidad aguda y genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”.

Las reacciones de identificación se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Miranda y Cuellar<sup>41</sup>. En la tabla 5, se observa el resultado de la identificación fitoquímica de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”, reportando la presencia de alcaloides, cumarinas, catequinas, terpenos, esteroides, glicósidos cardiotónicos, taninos, fenoles, saponinas y flavonoides (anexo 5).

Al finalizar: la reacción de Dragendorff se observó opalescencia y un ligero precipitado color naranja que indicó la presencia leve de alcaloides (+), en la reacción de Mayer se observó un ligero precipitado de color blanco amarillento que indicó la presencia leve de alcaloides (+), la reacción de Hager se observó un ligero precipitado de color amarillo (+) y al finalizar la reacción de Wagner se observó un ligero precipitado color marrón (+). Estas reacciones de precipitación se basan en la combinación de los alcaloides con metales pesados en solución acuosa ácida. Los reactivos más utilizados para la precipitación de los alcaloides son ácidos de elevado peso molecular como el reactivo de Hager (solución saturada de ácido pícrico en agua que cristaliza los picratos y ello permite por medio de resinas intercambiadoras, separar los alcaloides) y reactivos yodados como Dragendorff (yodobismutato potásico, precipitado rojo-naranja), Mayer (mercurio tetrayoduro de potasio, precipitado blanco-amarillento) y Wagner (solución de yodo-yoduro de potasio, precipitado color marrón)<sup>45</sup>. Estos resultados evidencian que el extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* presenta una cantidad leve o escasa de alcaloides evidenciando el porqué esta planta presenta actividad analgésica. Esta información concuerda con la literatura reportada por Kaur y Arora<sup>46</sup>.

Al efectuar la reacción de Baljet, se observó la formación de una coloración roja (+++) porque el núcleo esteroideal del ciclo lactónico reaccionó con el ácido pícrico, evidenciando que el extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* presenta abundantes cumarinas. La presencia de cumarinas en el hinojo explica el porqué esta planta presenta actividad antitumoral, antiarrítmicos, antiinflamatorios, antisépticos, analgésicos y contra la hipertensión.

Al efectuar la reacción de Catequinas, el papel filtró se colocó en la cámara de luz UV y se observó una mancha verde carmelita (++) indicando un ensayo positivo. Esta información no se ha reportado por otros autores.

Al efectuar la reacción de Liberman - Buchard, inicialmente se observó una coloración rosa violáceo, después verde y finalmente se observó la formación de

la coloración azul negruzco (++)). El color es debido a que el grupo hidroxilo (-OH) del esteroide sufre una oxidación gradual al reaccionar con los ácidos fuertes, constituido por ácido sulfúrico y anhídrido acético. Lo que sugiere la presencia moderada de esteroides y terpenos, y concuerda con la literatura reportada donde confirma la presencia de limoneno (terpeno)<sup>6</sup>.

Al efectuar la reacción de Kedde, se observó la formación de una coloración de naranja violácea (++)), lo que sugiere la presencia moderada de glicósidos cardiotónicos que concuerda con la literatura reportada por Kaur y Arora<sup>46</sup>. Los glicósidos cardiotónicos incrementan la fuerza de contracción del corazón y se utilizan para tratar a pacientes con insuficiencia cardíaca, explicando así el porqué el hinojo es usado para este tipo de afecciones.

Al efectuar el ensayo de cloruro férrico, se observó la formación de una coloración azul negruzco (+++) ya que los fenoles forman un complejo con Fe (III) que es intensamente coloreado. En este ensayo la coloración verde oscuro indica la presencia de taninos catequínos, la coloración azul oscuro indica la presencia de taninos gálicos y la coloración negra indica la presencia de ambos taninos<sup>47</sup>. Lo que sugiere que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Foeniculum vulgare* M. "hinojo" presenta intensa o abundante evidencia de fenoles, y taninos catequínicos y gálicos. Esta información concuerda con la literatura reportada por Espinola y Francis<sup>14</sup>.

El ensayo de espuma presentó resultado positivo (++)), se observó la formación de espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm y persistente por más de 5 minutos. Según Brunenton<sup>48</sup> desde el punto de vista químico, las saponinas al ser hidrolizadas rinden de 2 a 6 residuos de monosacáridos y una porción carbonada policíclica que es la aglicona del glicósido, a la cual se le denomina sapogenina (contiene esteroides y otros triterpenos). Las saponinas presentan diversas actividades biológicas y farmacológicas: como la actividad hemolítica, antiinflamatoria, tensoactiva, antifúngica, antibacteriana, antitumoral, relajan el intestino e incrementan las secreciones de las mucosas bronquiales, fluidifican éstas y facilitan la expectoración, se emplean también como diuréticos y desinfectantes de las vías urinarias. Gracias a la presencia de saponinas en el hinojo se puede explicar su uso para afecciones como cáncer, infección urinaria, etc.

El ensayo de Shinoda presentó resultado positivo (+++), se observó la formación de una coloración rojo carmelita. El magnesio es oxidado por el ácido clorhídrico,

liberando hidrógeno en forma de gas quedando cloruro de magnesio formando así la coloración, que indica la abundante o intensa presencia de flavonoides en el hinojo, y concuerda con la literatura reportada por Espinola y Francis<sup>14</sup>.

Estos metabolitos secundarios identificados en el hinojo también fueron reportados por:

- Akhbari *et al*<sup>6</sup> que evaluó las propiedades biológicas del aceite esencial aislado de semillas de *Foeniculum vulgare* identificando trans - anetol (80,63 %), L - fenchona (11,57 %), estragol (3,67 %) y limoneno (2,68 %).
- Hussein *et al*<sup>8</sup> que realizó un análisis del extracto de semilla metanólica de *Foeniculum vulgare*, por el método de cromatograma GC - MS hallando la presencia de 56 picos. Los principales compuestos fitoquímicos identificados fueron L - fenchona, 2-propil-tetrahidropiran-3-ol, estragol, anetol, 2-metoxi-4-vinilfenol, d - manosa, corimbolona, fenretinida, ácido vaccénico y apiol.
- Abdurazak<sup>9</sup> en el extracto acuoso y metanólico al 80 % de las hojas de *Foeniculum vulgare* Mill identificó metabolitos secundarios como flavonoides, taninos, terpenoides y alcaloides.
- Espinola y Francis<sup>14</sup>, identificaron compuestos fenólicos y flavonoides, cualitativamente según la prueba de gota de Olga Lock de Ugaz al 10 % p/v, en el infuso de *Foeniculum vulgare* "hinojo".
- Kaur y Arora<sup>46</sup> que identificaron la presencia de 2,80 – 4,23 % de alcaloides; 8,58 – 15,06 % de flavonoides, 19,71 – 27,77 % de taninos, 0,55 – 0,70 % de saponinas y glucósidos cardíacos en el extracto de semilla de *Foeniculum vulgare*.

En el estudio de toxicidad aguda se realizó por el método de dosis fija (anexo 6) establecido por el OECD (Organization for Economic Cooperation and Development)<sup>34</sup>, donde se observa en el grupo control el 60 % de disminución de actividad motora y en el grupo experimental el 70 % de disminución de actividad motora, debido a que durante y finalizando la administración del extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill "hinojo" los ratones se mostraron atemorizados y no se observó muerte en los animales. Los resultados sobre el comportamiento general en ratones (tabla 6) muestran efectos no significativos respecto del grupo control.

Con relación a la determinación del peso corporal de los ratones machos y hembras hasta los 14 días de exposición (figura 3) se observó el día 1 (anexo 15) al realizar la prueba T de student de muestras independientes que la media

del grupo experimental no presenta diferencia significativa con respecto a la media del grupo control ( $p=0,541$ ). El día 7 (anexo 16) la media de los pesos del grupo experimental no presenta diferencia significativa a la media de los pesos del grupo control ( $p=0,225$ ) y el día 14 (anexo 17) la media de los pesos del grupo experimental si presenta diferencia significativa a la media de los pesos del grupo control ( $p=0,038$ ). A los 14 días de exposición se observó una evidencia dosis-respuesta del extracto de las hojas del hinojo, a más días más efecto respecto a la pérdida de peso del grupo experimental. Esta reacción se debe a que el hinojo disminuye el apetito y es diurético, facilitando la evacuación y purificación de las vías urinarias. Esta información concuerda con la literatura reportada por Abdurazak<sup>9</sup>, en el que realizó una investigación sobre la actividad diurética del extracto acuoso y metanol al 80 % de las hojas de *Foeniculum vulgare* Mill en ratas tratadas con dosis de 200 y 400 mg/kg de peso corporal, estas dosis también se administraron en la presente investigación y se observó que los ratones mostraron un aumento en el volumen de orina ya que la frecuencia de micción aumento, al eliminar fluidos por la orina también se eliminó vitaminas y minerales lo que generó la reducción de pesos. Es por ello que el 70 % de los ratones del grupo experimental perdieron peso (figura 3) Concluyendo la seguridad que el extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo” no genera una toxicidad aguda a una concentración de 2000 mg/kg de peso corporal.

Esta información concuerda con la literatura reportada por Huamán *et al*<sup>10</sup>, en su estudio concluyó que el consumo del *Foeniculum vulgare* en adultos jóvenes con sobrepeso y obesidad reduce significativamente los niveles de triglicéridos y colesterol total.

Los test de genotoxicidad son importantes para calcular la toxicidad celular e identificar potenciales agentes cancerígenos y mutagénicos. El estudio de genotoxicidad se realizó por el ensayo de micronúcleos. 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 rezagados<sup>38</sup>. Es decir, este sistema permite determinar la mutagenicidad de las sustancias químicas o de un factor al cual esta expuesto el organismo, capaz de inducir rupturas cromosómicas o

interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas<sup>39</sup>.

Los animales en general exhiben una gran variación en las frecuencias de micronúcleos espontáneos en la sangre periférica, que van de sumamente bajas a un buen número; eso depende de la capacidad del sistema reticuloendotelial, principalmente el bazo, que es el encargado de retirar a los micronúcleos de la circulación; por tanto, de la eficiencia de este órgano depende la cantidad de micronúcleos que se puedan observar en la circulación.

Los ratones presentan micronúcleos espontáneamente, ya que, tal como se mencionó antes, en esas especies 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 son bioindicadores naturales.

En el anexo 26 se observa el análisis de comparaciones múltiples del porcentaje de micronúcleos de la sangre periférica de los ratones. Al analizar el grupo control versus el grupo que se administró ciclofosfamida, el nivel de significancia fue 0,00 ( $\alpha=0,05$ ), el cual  $p<0,05$ , a través de este valor la comparación de medias del porcentaje de micronúcleos de las muestras del grupo control difiere estadísticamente al grupo de ciclofosdamida. La ciclofosfamida es agente genotóxico (sustancia clastógena) que tiene la capacidad de inducir la formación de micronúcleos y aberraciones cromosómicas, es por ello que se observa una media de 0,588 de porcentaje de micronúcleos a diferencia de los otros tratamientos (anexo 22). La formación de micronúcleos se debe al profarmaco de la ciclofosfamida, esta al ser activado por el sistema de enzimas microsomales hepáticas convierte la ciclofosfamida en primer lugar a aldofosfamida y 4 - hidroxiciclofosfamida, y luego a acroleína y fosforamida, dos potentes sustancias alquilantes del ADN. Al reaccionar con el ADN, los agentes alquilantes forman enlaces covalentes que bloquean la mitosis y síntesis de proteína, por ende, impiden la duplicación del ADN y la transcripción del ARN<sup>49</sup>. Es por ello que se ha observado mayor cantidad de micronúcleos en la sangre periférica de los ratones administrados con ciclofosfamida, ya que interrumpió la mitosis (en la etapa de anafase).

La media del porcentaje de micronúcleos de los extractos administrados de dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg no difiere estadísticamente al grupo control,

teniendo un nivel de significancia mayor a 0,05 ( $\alpha=0,05$ ); 0,937 y 0,995 respectivamente. Concluyendo que el grupo control y los extractos de 200 mg/kg y 400 mg/kg poseen un efecto igual o similar al grupo control. Por ende, a estas concentraciones el extracto hidroalcohólico *Foeniculum vulgare* M. "hinojo" no es genotóxico (anexo 26).

La media del porcentaje de micronúcleos administrado a dosis 800 mg/kg difiere estadísticamente a la media del grupo control ( $p<0,05$ ), el nivel de significancia fue 0,00. Concluyendo que el extracto a dicha concentración es genotóxico (anexo 26).

Los datos obtenidos de la médula ósea de los ratones fueron expresados en porcentaje de micronúcleos como se observa en el anexo 10. En el anexo 27 (análisis de comparaciones múltiples del porcentaje de micronúcleos de la médula ósea) se observa que el grupo control versus el grupo que se le administró la ciclofosfamida, el nivel de significancia fue 0,00 ( $\alpha=0,05$ ), concluyendo que los grupos mencionados presentan diferentes efectos con respecto a la formación de micronúcleos. Como ya se mencionó anteriormente la ciclofosfamida es una agente alquilante, por ende, un agente genotóxico (sustancia clastógena) que tiene la capacidad de inducir la formación de micronúcleos y aberraciones cromosómicas, es por ello que se observa una media de 0,75 % de micronúcleos a diferencia de los otros tratamientos (anexo 23).

La media del porcentaje de micronúcleos de la médula ósea (anexo 27), administrados a dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg no difiere estadísticamente al grupo control, teniendo un nivel de significancia mayor a 0,05 ( $\alpha=0,05$ ); 0,968 y 1,000 respectivamente. Concluyendo que el grupo control y los extractos de 200 mg/kg y 400 mg/kg poseen un comportamiento o efecto igual o similar con respecto a la formación de micronúcleos. Por ende, a estas concentraciones el extracto hidroalcohólico *Foeniculum vulgare* M. "hinojo" no es genotóxico.

La media del porcentaje de micronúcleos del extracto administrado a dosis 800 mg/kg difiere estadísticamente a la media del grupo control ( $\alpha=0,05$ ), el nivel de significancia fue 0,00. Concluyendo que el extracto a dicha concentración es genotóxico (anexo 11).

Los resultados encontrados sobre el porcentaje de micronúcleos en la sangre periférica y la médula ósea, concuerdan con los reportados hasta el momento, al

utilizar esta línea de ratones como biomodelo en este ensayo. Además, concuerdan al utilizar la ciclofosfamida como agente clastogénico eficiente. En el presente trabajo el “hinojo” reportó la presencia de alcaloides, cumarinas, catequinas, terpenos, esteroides, glicósidos cardiotónicos, taninos, fenoles, saponinas y flavonoides. Estos metabolitos secundarios son antioxidantes. El extracto de *Foeniculum vulgare* M. “hinojo” a dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg de peso actuaron como antioxidantes, capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones en nuestra sangre. Sin embargo, la toxicidad esta en relación con la dosis y la vía de administración, observándose que a partir de la dosis de 800 mg/kg el extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill es genotóxico. El efecto genotóxico se puede deber a los alcaloides y taninos, ya que en otras investigaciones la presencia de estos metabolitos secundarios reporta ser tóxico. Esto concuerda con la literatura reportada por Marca<sup>18</sup>, Montes<sup>19</sup> y Gutierrez<sup>21</sup>.

## VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo” no presentó toxicidad aguda a 2000 mg/kg de peso corporal, y presentó efecto genotóxico a dosis de 800 mg/kg de peso corporal en *Mus musculus* “ratón”
2. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo” presentó los siguientes metabolitos secundarios: alcaloides, cumarinas, catequinas, terpenos, esteroides, glicósidos cardiotónicos, taninos, fenoles, saponinas y flavonoides.
3. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo” no presentó toxicidad aguda y la DL<sub>50</sub> se encuentra por encima de 2000 mg/kg de peso corporal.
4. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo” presentó variación significativa del porcentaje de micronúcleos ( $p < 0,05$ ), en eritrocitos y médula osea de ratón a dosis de 800 mg/kg de peso corporal.



## VII. RECOMENDACIONES

- Impulsar trabajos de investigación sobre genotoxicidad en la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, ya que en los últimos años ha retornado el interés por las plantas medicinales en búsqueda de nuevas estructuras bioactivas para el tratamiento de las enfermedades.
- Ampliar estudios de genotoxicidad *in vivo* e *in vitro* con otras plantas medicinales de uso común en nuestra región, para así poder mejorar la calidad de vida de nuestra población.
- Continuar con los estudios de toxicidad crónica, toxicidad dérmica y toxicidad ocular.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Perez M, Jimenez E, M B, R M, B V. Toxicidad aguda por el procedimiento de dosis fijas de un extracto de *Boldoa purpurancens* cav. Revista Electrónica de veterinaria. 2008. Marzo; Volumen IX (3).
2. OECD/OCDE. OECD 423 Guideline for testing of chemicals, Acute Oral Toxicity – Acute toxic. [Online]; 2001 [citado enero del 2019]. Disponible en: <https://cutt.ly/DwngHs1>
3. Rivanedeira A, Cortés R, Marreno O, Pérez J, Olazábal E. Toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de la planta *Chuquiraga jussieui*, administrado vía oral en ratas. Revista la Tecnica. 2013 . Junio; (10).
4. OECD. Prueba de micronúcleos de eritrocitos de mamíferos. [Online]; 2016 [citado 07 de enero del 2019]. Disponible en: <https://cutt.ly/AwngH3o>
5. Mokaberinejad R, Rampisheh Z, Alias J, E A. The comparison of fennel infusion plus dry cupping versus metformin in management of oligomenorrhoea in patients with polycystic ovary syndrome:a randomised clinical trial. Tehran, Iran: Centro de Investigación de Medicina Preventiva y Salud Pública, Departamento de Medicina Tradicional, Escuela de Medicina Tradicional Shahid Beheshti; 2019.
6. Akhbari M, Kord R, Nodooshan SJ, Hamed S. Analysis and evaluation of the antimicrobial and anticancer activities of the essential oil isolated from *Foeniculum vulgare* from Hamedan,Iran. [Online]; 2018. Disponible en : <https://cutt.ly/5wngK04>
7. Bartool R, Salahuddin H, Mahmood T, Ismail M. Study of anticancer and antibacterial activities of *Foeniculum vulgare*, *Justicia adhatoda* and *Urtica dioica* as natural curatives,Pakistán. [Online]; 2017 [citado el 07 de enero del 2019]. Disponible en : <https://cutt.ly/BwngZ8E>
8. Hussein J ,Mohamemed Y , Hadi I. Study of chemical composition of *Foeniculum vulgare* using Fourier transform infrared spectrophotometer and gas chromatografy - mass spectromery ,Iraq. [Online]; 2015 [citado en agosto del 2019 ]. Disponible en : <https://cutt.ly/Kwntv5Y>
9. Abdurazak Jemal. Evaluation of the diuretic activity of aqueous and 80 % methanol extracts of *Foeniculum vulgare* Mill (Apiaceae) leaf in rats, Ethiopia. [Online].; 2015. Disponible en : <https://cutt.ly/GwntQ6W>

10. Huamán J, Campos L, Cancino J, Avalos A, Bracamonte J, Aguilar C. Efecto *Foeniculum vulgare* en el perfil lipídico de adultos jóvenes con sobrepeso y obesidad. Trujillo. [Online]; 2019 [citado agosto del 2019]. Disponible en : <https://cutt.ly/3wnabFT>
11. Lucana F. Efecto hipolipidémico del extracto hidroalcohólico del hinojo (*Foeniculum vulgare* M.) en ratas hipercolesterolemicas. Tesis de grado. Arequipa: Universidad Católica de Santa María. Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas; 2018.
12. López M, Quijada A, Sánchez A, Chávarri P. Comparación de la actividad antiulcerosa de los extractos de *Foeniculum vulgare* “hinojo” y *Solanum tuberosum* “papa” en *Rattus rattus* variedad albinus. Tesis de grado. Cajamarca: Universidad Privada Guillermo Urruelo. Facultad de ciencias de la Salud; 2016.
13. Fuentes M, Zapana M. Efecto del *Foeniculum vulgare* (hinojo) en la foliculogénesis y maduración folicular en ratas *Norvegicus* en comparación con citrato de clomifeno. Enero - febrero. Arequipa. Tesis de grado. Arequipa: Universidad Católica de Santa María. Facultad de Obstetricia y Puericultura, Departamento de ciencias de la Salud; 2016.
14. Espinola Q y Francis A. Efecto del infuso de hojas de *Foeniculum vulgare* “hinojo” y *Ocimum basilicum* “albahaca” sobre íleon aislado de *Cavia porcellus*. Bachiller en Farmacia. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2016.
15. Castañeda J. Efecto antifungico del extracto etanólico de las semillas de *Foeniculum vulgare* Mill sobre CEPA *Candida albicans* ATCC 10804 *in vitro*. Tesis de grado. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego. Escuela profesional de medicina humana., Departamento de Ciencias de la Salud; 2016.
16. Alejandro C. Estudio de la demanda y estimación del valor cultural y económico de plantas medicinales comercializadas en la ciudad de Ayacucho. Tesis para optar el Grado académico de magister. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas; 2012.

17. Marca M. 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 obtener el título profesional de Químico farmacéutico. Ayacucho, Perú: Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Departamento de Ciencias de la Salud, Escuela de Farmacia y Bioquímica; 2018.
18. Montes Enciso M. Efecto genotóxico *in vitro* del látex de plantas medicinales de uso dérmico *Argemone mexicana* L. "cardo santo" y *Taraxacum officinale* "diente de león". Tesis para obtener el título profesional de químico farmacéutico. Ayacucho: Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Departamento de Ciencias de la Salud; 2017.
19. Martínez Fernández JC. Genotoxicidad *in vitro* de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico". Tesis para obtener el título profesional de Químico Farmacéutico. Ayacucho: Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Departamento de Ciencias de la Salud; 2016.
20. Gutierrez M. Comparación de la genotoxicidad *in vitro* de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", *Ficus carica* L. "higo", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto". Tesis para obtener el título profesional de Químico farmacéutica. Ayacucho, Perú: Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Departamento de Ciencias de la Salud, Escuela de formación profesional de Farmacia y Bioquímica; 2014.
21. Infante Beingolea M. Efecto estimulante de la ingesta de infusión de *Foeniculum Vulgare* "hinojo" en la secreción láctea de las púerperas. Tesis para obtener el Título de Maestro en Salud Pública. Ayacucho: Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Escuela de Postgrado; 2005.
22. Kuklinski C. Farmacognosia Barcelona: Editorial Omega S.A; 2000.
23. Salvador Galla. El hinojo, una herbácea de triple acción. [Online]. [citado en agosto del 2019]. Disponible en: <https://cutt.ly/0wnheZe>
24. Alonso J. El hinojo (*Foeniculum vulgare* Mill.) en las Ciencias Farmacéuticas. Tesis de grado. España: Universidad Complutense. Facultad de Farmacia; 2015.
25. Fundación CANNA: Investigación y análisis de Cannabis. Los Terpenos. [Online]. [citado 2019]. Disponible en: <https://cutt.ly/kwnhrJk>

26. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables. Madrid, España.: Universidad Complutense, Departamento de Farmacología; 2012. Report No.: ISSN.
27. Eréndira V, Figueroa I, Martínez E, Bartolomé M, Martínez H, García M. Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. Revista de la Facultad de Ciencias Químicas. 2017 Enero; (16): p. 23.
28. Reduca (Biología). Fisiología vegetal. Metabolismo secundario de las plantas. [Online]; 2009. Disponible en: <https://cutt.ly/vwnhux6>
29. Lopez A, Cortez F. Estudios y traducción Dioscores. [Online]. [citado el 2019]. Disponible en: <https://cutt.ly/qwnhiKC>
30. Tecnology EG. Hinojo, remedio tradicional para la salud. [Online].; 2016 [citado el 2019]. Disponible en: <https://cutt.ly/0wnhoDQ>
31. Fernandez J. Fundamentos de Toxicología. [Online].; 2015. [citado el 2019]. Disponible en : <https://cutt.ly/Gwnha2u>
32. Cordero M. Introducción a la Toxicología. [Online].; 2018. [citado el 2019]. Disponible en: <https://cutt.ly/KwnhdYf>
33. Klaassen C, Watkins III J. Fundamentos de la Toxicología de Casarett y Doull. Quinta ed. Lopez R, editor. Madrid, España: Editorial McGraw - Hill Interamericana; 2005.
34. Cursi O. Toxicología S.R.L Le, editor. Buenos Aires, Argentina: López; 1994.
35. Reppetto M, Reppetto G. Toxicología fundamental. Cuarta ed. Sevilla, España: Diaz de Santos; 2013.
36. Sanchez M, Rodriguez S, Armendáriz J. Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. [Online]; 2013. Disponible en : <https://n9.cl/46ep6>
37. Nuñez L, Ramos M, Zalapa S, Guerrero S, Zavala M, Torres O. Los murcielagos como posibles indicadores de genotóxicos medioambientales mediante la prueba de micronúcleos. [Online]. [citado el 2019]. Disponible en: <https://n9.cl/46ep6>
38. Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. Revista Scielo. 2005 Agosto; 28 (2).

39. Cedano A, Martínez S, Escalera F, Salgado M, Carrillo F, Humberto M, et al. Prueba de micronúcleos en sangre como bioindicador de genotóxicos. Nayarit, México.: Universidad Autónoma de Nayarit; 2012. Report No.: ISSN.
40. Zuñiga G, Gómez B. La prueba de micronúcleos. Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana. 2006 Abril; XIX (1).
41. Miranda M, Cuellar A. Manual de prácticas de laboratorio: farmacognosia y productos naturales. Ciudad de la Habana: Editorial Félix Varela; 2000.
42. Hernandez R, Fernandez C, Baptista P. Metodología de la Investigación. 6th ed. México: McGRAW-HILL / Interamericana editores; 2014.
43. ¿Qué es el método de Dunnett para comparaciones múltiples? [Online]; 2018 [citado el 2019]. Disponible en : <https://n9.cl/cggq>
44. Fallas J. Análisis de varianza, comparando dos o más medias Salamanca. España : Editorial La Muralla S.A; 2012.
45. Palacios Palacios. Alcaloides. [Online]; [citado el 2019]. Disponible en : <https://n9.cl/3824>
46. kaur J y Arora S. Detección antibacteriana y fitoquímica de *Anethum graveolens* , *Foeniculum vulgare* y *Trachyspermum ammi*. 2009. India. [Online]; [citado el 2019]. Disponible en : <https://bit.ly/2X4c1G6>
47. Muñoz Pinto. Identificación de grupos funcionales y taninos naturales. Venezuela.2016. [Online]; [citado en agosto del 2019]. Disponible en: <https://bit.ly/2lx8MtX>
48. Bruneton J. Farmacognosia, fitoquímica de plantas medicinales. Segunda edición. Madrid. España. Editorial Acribia S.A. 2017
49. Ciclofosfamida. Vademecum. Argentina.2009. [Online]; [citado en agosto del 2019]. Disponible en: <https://bit.ly/2kqlwkD>



## **IX. ANEXOS**



**Anexo 1.** Certificado de identificación botánica de *Foeniculum vulgare* Mill. "hinojo". 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:**

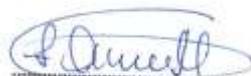
Que: la Bachiller en Farmacia y Bioquímica Srta. Fairus, **CERVANTES AMAO**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

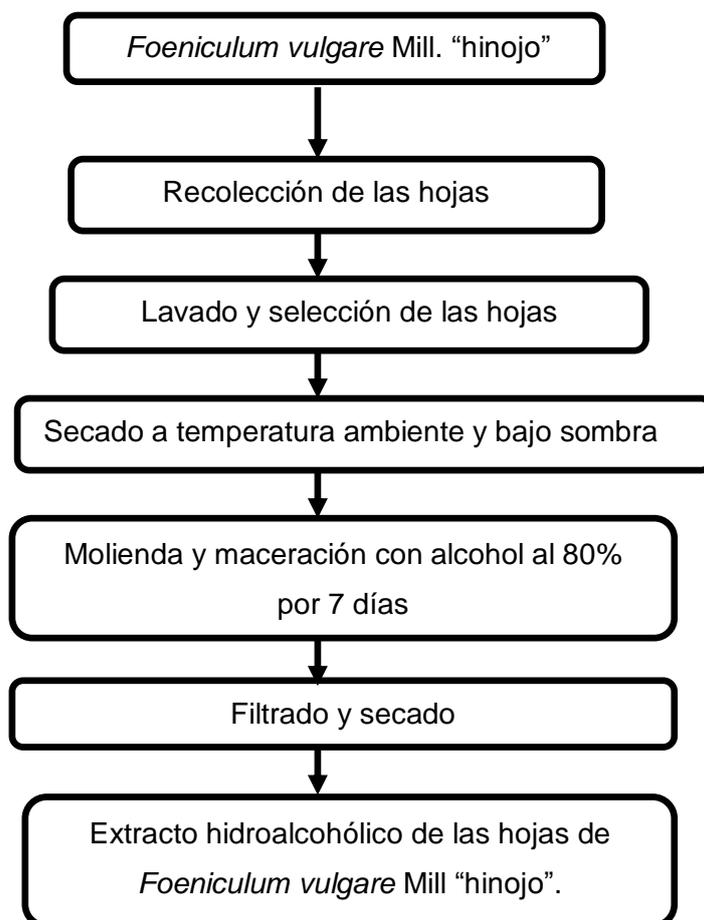
DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	APIALES
FAMILIA	:	APIACEAE
GENERO	:	Foeniculum
ESPECIE	:	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.
N.V.	:	"hinojo"

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

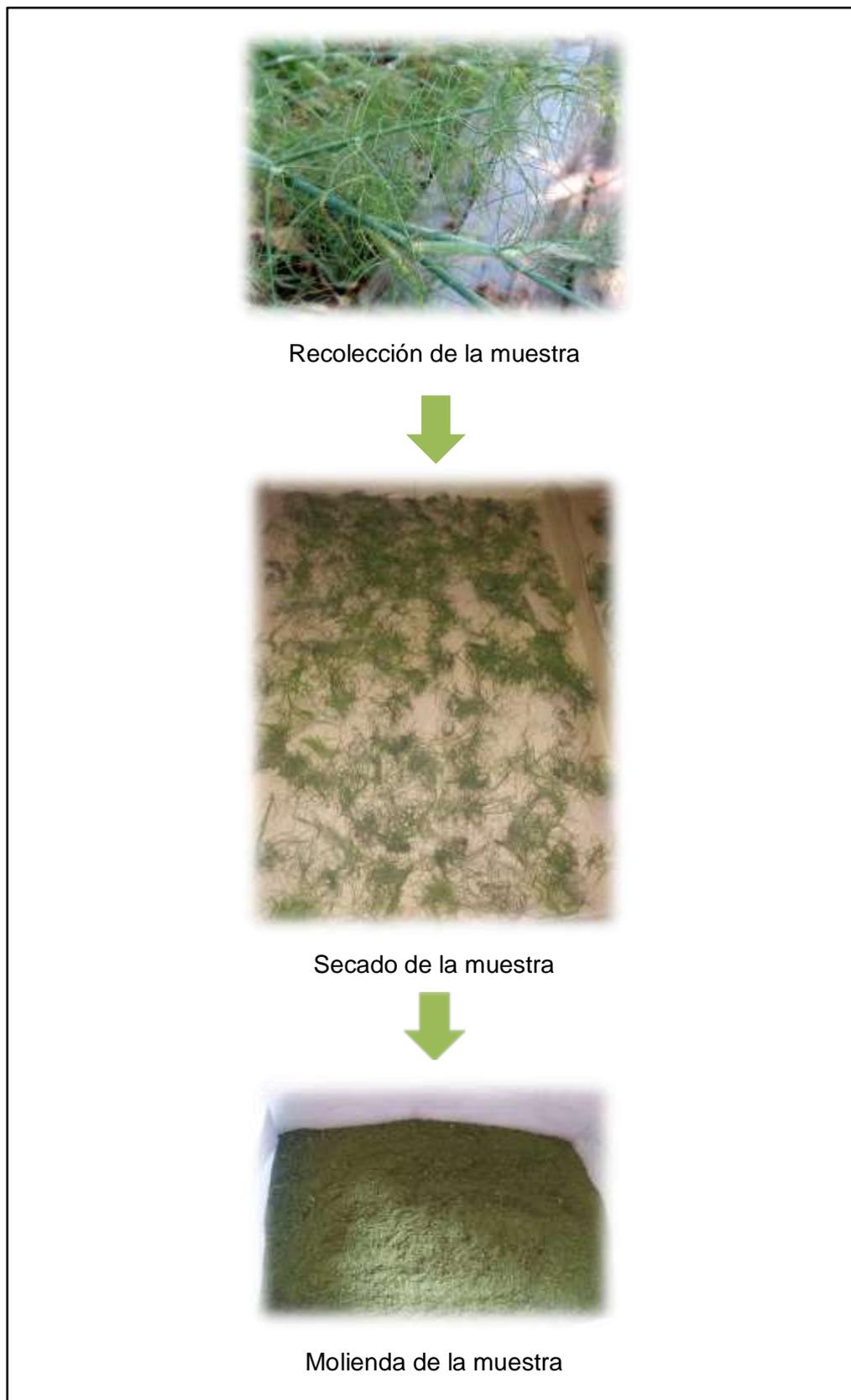
Ayacucho, 10 de Enero del 2019

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

**Anexo 2.** Procedimiento para la obtención del extracto hidroalcohólico *Foeniculum vulgare* Mill. “hinojo”. Ayacucho 2019.



**Anexo 3.** Recolección, secado y molienda de las hojas de *Foeniculum vulgare* Mill. "hinojo". Ayacucho 2019.



**Anexo 4.** Obtención y concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Foeniculum vulgare* Mill. “hinojo”. Ayacucho 2019.



1

Maceración de las hojas en alcohol al 80 % por 7 días.



2

Filtrar y concentrar el extracto hidroalcohólico en baño maría a 37° C.



3

Secar y concentrar el extracto hidroalcohólico en la estufa a una temperatura de 37°C.



4

Extracto hidroalcohólico concentrado de las hojas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”.

**Anexo 5.** Ensayo de identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de hojas de *Foeniculum vulgare* Mill. "hinojo". Ayacucho 2019.



1

A partir del extracto etanólico obtenido se realizará las pruebas pertinentes para la identificación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios.



Rx. Dragendorff
Rx. Mayer
RX. Hager
RX. Wagner
Rx. Baljet
Rx. Lieberman-Buchard
Rx. Kedde
Rx. Cloruro férrico
Ensayo de saponinas
Rx. Shinoda

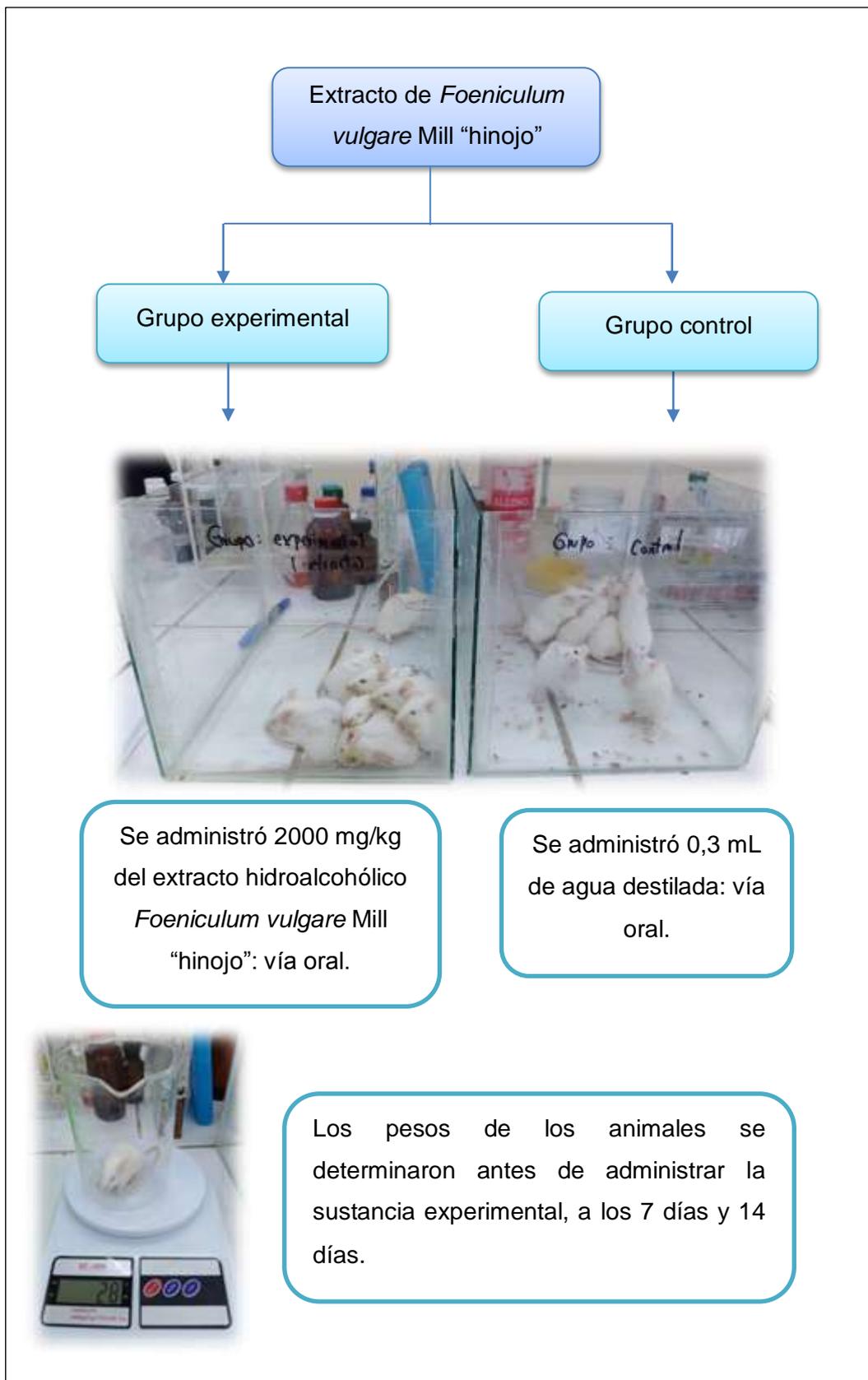


2

En un papel de filtro se colocó una gota del extracto, al cual se le adicionó una gota de ácido clorhídrico más una gota de bicarbonato de sodio, luego se dejó secar por varios minutos para luego observar en luz ultravioleta, el ensayo fue positivo ya que se observa una coloración verde fluorescente.



**Anexo 6.** Ensayo de toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de hojas de *Foeniculum vulgare* Mill. “hinojo”. Ayacucho 2019.



**Anexo 7.** Micronúcleos presentes en el ensayo de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de hojas de *Foeniculum vulgare* Mill. "hinojo". Ayacucho 2019



**Anexo 8.** Pesos individuales de los *Mus musculos* “ratones”, antes de administrar el extracto hidroalcohólico de hojas de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”, a los 7 días y 14 días. Para la evaluación de la toxicidad aguda a dosis de 2000 mg/kg. Ayacucho 2019.

Pesos del grupo experimental (g)			Pesos del grupo control (g)		
Antes de administrar el extracto(día 1)	A los 7 días	A los 14 días	Antes de administrar el extracto (día1)	A los 7 días	A los 14 días
35	33	31	30	28	33
31	27	23	31	29	32
29	25	27	32	34	35
28	30	27	21	22	24
28	26	30	28	30	28
26	25	22	31	28	27
22	25	23	33	29	30
24	20	21	31	33	34
29	28	25	26	28	22
30	32	29	29	30	33

**Anexo 9.** Cantidad de micronúcleos en sangre periférica de *Mus musculos* “ratones” con el extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.

<b>Muestra</b>	<b>Unidad experimental</b>	<b>Cantidad de micronúcleos (MIN)</b>	<b>% MIN</b>
<b>Control (suero fisiológico)</b>	ratón 1	2	0,2
	ratón 2	3	0,3
	ratón 3	2	0,2
	ratón 4	3	0,3
	ratón 5	2	0,2
	ratón 6	4	0,4
	ratón 7	2	0,2
	ratón 8	3	0,3
<b>Ciclofosfamida</b>	ratón 9	5	0,5
	ratón 10	7	0,7
	ratón 11	5	0,5
	ratón 12	4	0,4
	ratón 13	6	0,6
	ratón 14	7	0,7
	ratón 15	7	0,7
	ratón 16	6	0,6
<b>Dosis 200 mg/kg</b>	ratón 17	3	0,3
	ratón 18	3	0,3
	ratón 19	3	0,3
	ratón 20	4	0,4
	ratón 21	2	0,2
	ratón 22	3	0,3
	ratón 23	3	0,3
	ratón 24	2	0,2
<b>Dosis 400 mg/kg</b>	ratón 25	2	0,2
	ratón 26	3	0,3
	ratón 27	3	0,3
	ratón 28	2	0,2
	ratón 29	4	0,4
	ratón 30	3	0,3
	ratón 31	3	0,3
	ratón 32	2	0,2

<b>Dosis 800 mg/kg</b>	ratón 33	5	0,5
	ratón 34	4	0,4
	ratón 35	7	0,7
	ratón 36	6	0,6
	ratón 37	5	0,5
	ratón 38	6	0,6
	ratón 39	5	0,5
	ratón 40	6	0,6

**Anexo 10.** Cantidad de micronúcleos en médula ósea de *Mus musculos* “ratones” con el extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.

<b>Muestra</b>	<b>Unidad experimental</b>	<b>Cantidad de micronúcleos (MIN)</b>	<b>% MIN</b>
<b>Control (suero fisiológico)</b>	ratón 1	4	0,4
	ratón 2	5	0,5
	ratón 3	3	0,3
	ratón 4	4	0,4
	ratón 5	4	0,4
	ratón 6	5	0,5
	ratón 7	4	0,4
	ratón 8	4	0,4
<b>Ciclofosfamida</b>	ratón 9	9	0,9
	ratón 10	8	0,8
	ratón 11	6	0,6
	ratón 12	5	0,5
	ratón 13	9	0,9
	ratón 14	8	0,8
	ratón 15	8	0,8
	ratón 16	7	0,7
<b>Dosis 200 mg/kg</b>	ratón 17	5	0,5
	ratón 18	5	0,5
	ratón 19	4	0,4
	ratón 20	5	0,5
	ratón 21	3	0,3
	ratón 22	4	0,4
	ratón 23	4	0,4
	ratón 24	5	0,5
<b>Dosis 400 mg/kg</b>	ratón 25	3	0,3
	ratón 26	4	0,4
	ratón 27	4	0,4
	ratón 28	5	0,5
	ratón 29	6	0,6
	ratón 30	4	0,4
	ratón 31	4	0,4
	ratón 32	3	0,3

<b>Dosis 800 mg/kg</b>	ratón 33	6	0,6
	ratón 34	5	0,5
	ratón 35	8	0,8
	ratón 36	7	0,7
	ratón 37	8	0,8
	ratón 38	6	0,6
	ratón 39	5	0,5
	ratón 40	7	0,7

**Anexo 11.** Prueba de normalidad del peso corporal de ratones al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.

Pruebas de normalidad							
	Tratamientos	Kolmogorov - Smirnov			Shapiro Will		
		Estadístico	gl	sig.	Estadístico	gl	sig.
Pesos.día 1	Experimental	,178	10	,200*	,972	10	,908
	Control	,195	10	,200*	,858	10	,073
Pesos.día 7	Experimental	,192	10	,200*	,951	10	,678
	Control	,267	10	,041	,893	10	,181
Pesos.día 14	Experimental	,187	10	,200*	,937	10	,521
	Control	,191	10	,200*	,923	10	,379

**Anexo 12.** Datos descriptivos del peso corporal de ratones del día 1, al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.

Tratamientos			Estadístico	Error estándar	
Pesos.día 1	Experimental	Media	28,20	1,152774	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	25,59	
			Límite superior	30,81	
		Media recortada al 5%	28,17		
		Mediana	28,50		
		Varianza	13,29		
		Desviación estándar	3,65		
		Mínimo	22		
		Máximo	35		
		Rango	13		
		Rango intercuartil	4,75		
		Asimetría	0,06	0,687043	
		Curtosis	0,63	1,334249	
		Control	Media	29,20	1,113553
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	26,68	
			Límite superior	31,72	
	Media recortada al 5%		29,44		
	Mediana		30,50		
	Varianza		12,40		
	Desviación estándar		3,52		
Mínimo	21				
Máximo	33				
Rango	12				
Rango intercuartil	3,75				
Asimetría	-1,56	0,687043			
Curtosis	2,66	1,334249			

**Anexo 13.** Datos descriptivos del peso corporal de ratones del día 7, al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.

Tratamientos			Estadístico	Error estándar	
Pesos.día7	Experimental	Media	27,10	1,215182	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	24,35	
			Límite superior	29,85	
		Media recortada al 5%	27,17		
		Mediana	26,50		
		Varianza	14,77		
		Desviación estándar	3,84		
		Mínimo	20		
		Máximo	33		
		Rango	13		
		Rango intercuartil	5,50		
		Asimetría	-0,095	0,687043	
		Curtosis	0,13	1,334249	
		Control	Media	29,10	1,026861
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	26,78	
			Límite superior	31,42	
	Media recortada al 5%		29,22		
	Mediana		29		
	Varianza		10,54		
	Desviación estándar		3,25		
Mínimo	22				
Máximo	34				
Rango	12				
Rango intercuartil	2,75				
Asimetría	-0,74	0,687043			
Curtosis	2,25	1,334248			

**Anexo 14.** Datos descriptivos del peso corporal de ratones del día 14, al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.

Tratamientos			Estadístico	Error estándar	
Pesos.día 14	Experimental	Media	25,8	1,113553	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	23,28	
			Límite superior	28,32	
		Media recortada al 5%	25,78		
		Mediana	26		
		Varianza	12,4		
		Desviación estándar	3,52		
		Mínimo	21		
		Máximo	31		
		Rango	10		
		Rango intercuartil	6,5		
		Asimetría	0,13	0,687043	
		Curtosis	-1,48	1,334249	
		Control	Media	29,8	1,396822
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	26,64	
			Límite superior	32,96	
	Media recortada al 5%		29,94		
	Mediana		31		
	Varianza		19,51		
	Desviación estándar		4,42		
Mínimo	22				
Máximo	35				
Rango	13				
Rango intercuartil	7				
Asimetría	-0,66	0,687043			
Curtosis	-0,80	1,334249			

**Anexo 15.** Análisis de varianza del peso corporal de ratones del día 1, al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.

		Prueba de muestras independientes								
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
Pesos.día 1	Se asumen varianzas iguales	0,001	0,970	-0,624	18	0,541	-1	1.60278	-4,367	2,367
	No se asumen varianzas iguales			-0,624	17,978	0,541	-1	1.60278	-4,368	2,367

**Anexo 16.** Análisis de varianza del peso corporal de ratones del día 7, al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.

Prueba de muestras independientes											
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias							
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
										Inferior	Superior
Pesos.día 7	Se asumen varianzas iguales	0,590	0,453	-1,257	18	0,225	-2	1.59095	-5,342	1,342	
	No se asumen varianzas iguales			-1,257	17,513	0,225	-2	1.59095	-5,349	1,349	

**Anexo 17.** Análisis de varianza del peso corporal de ratones del día 14, al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.

Prueba de muestras independientes											
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias							
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
										Inferior	Superior
<b>Pesos.día 14</b>	Se asumen varianzas iguales	0,570	0,460	-2,239	18	0,038	-4	1,78637	-7,753	-0,247	
	No se asumen varianzas iguales			-2,239	17,148	0,039	-4	1,78637	-7,766	-0,233	

**Anexo 18.** Prueba T student del peso corporal de ratones del grupo experimental, al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.

Prueba T de muestras emparejadas									
		Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	Peso.día1.E - Peso.día7.E	1,1	2,643	0,83600	-0,791	2,991	1,316	9	0,221
Par 2	Peso.día1.E - Peso.día14.E	2,4	2,875	0,90921	0,343	4,457	2,640	9	0,027

**Anexo 19.** Prueba T student del peso corporal de ratones del grupo control, al evaluar la toxicidad agua a 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de *Foeniculum vulgare* Mill “hinojo”. Ayacucho 2019.

Prueba T de muestras emparejadas									
		Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	Peso.día1.C - Peso.día7.C	0,1	2,378	0,75203	-1,601	1,801	0,133	9	0,897
Par 2	Peso.día1.C - Peso.día14.C	-0,6	3,169	1,00222	-2,867	1,667	-0,599	9	0,564

**Anexo 20.** Prueba de normalidad del porcentaje de micronúcleos de la sangre periférica, en la prueba de genotoxicidad, tratados con el extracto hidroalcohólico de hojas de *Foeniculum vulgare* Mill. “hinojo”. Ayacucho 2019.

Pruebas de normalidad							
Tratamiento		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
% Micronúcleos	Control	,300	8	,033	,798	8	,027
	Ciclofosfamida	,216	8	,200 <sup>*</sup>	,882	8	,197
	Extracto 200	,327	8	,012	,810	8	,037
	Extracto 400	,263	8	,109	,827	8	,056
	Extracto 800	,205	8	,200 <sup>*</sup>	,931	8	,522

**Anexo 21.** Prueba de normalidad del porcentaje de micronúcleos de la médula ósea, en la prueba de genotoxicidad, tratados con el extracto hidroalcohólico de hojas de *Foeniculum vulgare* Mill. "hinojo". Ayacucho 2019.

Pruebas de normalidad							
Tratamiento		Kolmogorov-Smirnov <sup>2</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
% Micronúcleos	Control	0,327	8	0,012	0,810	8	0,037
	Ciclofosfamida	0,263	8	0,109	0,897	8	0,273
	Extracto 200	0,300	8	0,033	0,798	8	0,027
	Extracto 400	0,300	8	0,032	0,872	8	0,156
	Extracto 800	0,162	8	0,200	0,897	8	0,274

**Anexo 22.** Datos descriptivos del porcentaje de micronúcleos de la sangre periférica, en la prueba de genotoxicidad. Ayacucho 2019.

Tratamiento			Estadístico	Error estándar	
% Micronúcleos	Control	Media	,2625	,02631	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,2003	
			Límite superior	,3247	
		Mediana	,2500		
		Varianza	,006		
		Desviación estándar	,07440		
		Mínimo	,20		
		Máximo	,40		
		Rango	,20		
	Ciclofosfamida	Media	,5875	,03981	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,4934	
			Límite superior	,6816	
		Mediana	,6000		
		Varianza	,013		
		Desviación estándar	,11260		
		Mínimo	,40		
		Máximo	,70		
		Rango	,30		
	Extracto 200	Media	,2875	,02266	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,2339	
			Límite superior	,3411	
		Mediana	,3000		
		Varianza	,004		
		Desviación estándar	,06409		
		Mínimo	,20		
		Máximo	,40		
		Rango	,20		
	Extracto 400	Media	,2750	,02500	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,2159	
			Límite superior	,3341	
		Mediana	,3000		
		Varianza	,005		
		Desviación estándar	,07071		
Mínimo		,20			
Máximo		,40			
Rango		,20			
Extracto 800	Media	,5500	,03273		
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,4726		
		Límite superior	,6274		
	Mediana	,5500			
	Varianza	,009			
	Desviación estándar	,09258			
	Mínimo	,40			
	Máximo	,70			
	Rango	,30			

**Anexo 23.** Datos descriptivos del porcentaje de micronúcleos de la médula ósea, en la prueba de genotoxicidad. Ayacucho 2019.

Tratamiento		Estadístico	Error estándar		
% Micronúcleos	Control	Media	0,413	0,02	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	0,359	
			Límite superior	0,466	
		Mediana	0,400		
		Varianza	0,004		
		Desviación estándar	0,064		
		Mínimo	0,300		
		Máximo	0,500		
		Rango	0,200		
	Ciclofosfamida	Media	0,750	0,05	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	0,632	
			Límite superior	0,868	
		Mediana	0,800		
		Varianza	0,020		
		Desviación estándar	0,141		
		Mínimo	0,500		
		Máximo	0,900		
		Rango	0,400		
	Extracto 200	Media	0,438	0,03	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	0,375	
			Límite superior	0,500	
		Mediana	0,450		
		Varianza	0,006		
		Desviación estándar	0,074		
		Mínimo	0,300		
		Máximo	0,500		
		Rango	0,200		
	Extracto 400	Media	0,413	0,04	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	0,330	
			Límite superior	0,495	
		Mediana	0,400		
		Varianza	0,010		
		Desviación estándar	0,099		
Mínimo		0,300			
Máximo		0,600			
Rango		0,300			
Extracto 800	Media	0,650	0,04		
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	0,550		
		Límite superior	0,750		
	Media recortada al 5%	0,650			
	Mediana	0,650			
	Varianza	0,014			
	Desviación estándar	0,120			
	Mínimo	0,500			
	Máximo	0,800			

**Anexo 24.** Prueba de Kruskal - Wallis del porcentaje de micronúcleos de la sangre periférica, en la prueba de genotoxicidad, tratados con el extracto hidroalcohólico de hojas de *Foeniculum vulgare* Mill "hinojo". Ayacucho 2019.

Estadísticos de prueba<sup>a,b</sup>

	% Micronúcleos
Chi-cuadrado	28,804
gl	4
Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Tratamiento

**Anexo 25.** Prueba de Kruskal - Wallis del porcentaje de micronúcleos de la médula ósea, en la prueba de genotoxicidad, tratados con el extracto hidroalcohólico de hojas de *Foeniculum vulgare* Mill "hinojo". Ayacucho 2019.

**Estadísticos de prueba<sup>a,b</sup>**

	% Micronúcleos
Chi-cuadrado	25,891
gl	4
Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b.Variable de agrupación: Tratamiento

**Anexo 26.** Análisis de comparaciones múltiples del porcentaje de micronúcleos de la sangre periférica, en la prueba de genotoxicidad, tratados con el extracto hidroalcohólico de hojas de *Foeniculum vulgare* Mill. “hinojo”. Ayacucho 2019.

### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Micronúcleos

T de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup>

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Ciclofosfami da	Control	,32500 <sup>*</sup>	,04236	,000	,2166	,4334
Extracto 200	Control	,02500	,04236	,937	-,0834	,1334
Extracto 400	Control	,01250	,04236	,995	-,0959	,1209
Extracto 800	Control	,28750 <sup>*</sup>	,04236	,000	,1791	,3959

\*. 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 27.** Análisis de comparaciones múltiples del porcentaje de micronúcleos de la médula ósea, en la prueba de genotoxicidad, tratados con el extracto hidroalcohólico de hojas de *Foeniculum vulgare* Mill. “hinojo”. Ayacucho 2019.

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: % Micronúcleos

T de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup>

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Ciclofosfamida	Control	,33750*	,05184	,000	,2049	,4701
Extracto 200	Control	,02500	,05184	,968	-,1076	,1576
Extracto 400	Control	,00000	,05184	1,000	-,1326	,1326
Extracto 800	Control	,23750*	,05184	,000	,1049	,3701

\*. 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 28. Matriz de consistencia. Ayacucho 2019.

Título	Problema	Objetivos	Marco teórico	Hipótesis	Variables	Metodología
<p>Toxicidad aguda y genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill "hinojo" en <i>Mus musculus</i> "ratón". Ayacucho 2019.</p>	<p>¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill "hinojo" presentara toxicidad aguda y genotoxicidad en <i>Mus musculus</i> "ratón"?</p>	<p><b>Objetivo general</b> Determinar la toxicidad aguda y genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill "hinojo" en <i>Mus musculus</i> "ratón".</p> <p><b>Objetivos específicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill "hinojo".</li> <li>Determinar la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill "hinojo" en <i>Mus musculus</i> "ratón".</li> <li>Determinar la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill "hinojo" en <i>Mus musculus</i> "ratón".</li> </ul>	<p><b>Antecedentes del estudio de <i>Foeniculum vulgare</i></b> Tóxico</p> <p><b>Toxicidad</b> Toxicidad aguda Toxicidad subcrónica Toxicidad crónica</p> <p><b>Método para evaluar la toxicidad aguda:</b> método de dosis fija a dosis límite OECD 423.</p> <p><b>Genotoxicidad</b> Definición Clases de daño genotóxico Micronúcleos</p> <p><b>Método para evaluar la genotoxicidad:</b> Test de micronúcleos.</p>	<p><b>Hi:</b> El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill "hinojo" presenta toxicidad aguda y genotoxicidad en <i>Mus musculus</i> "ratón".</p> <p><b>Ho:</b> El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill "hinojo" no presenta toxicidad aguda y genotoxicidad en <i>Mus musculus</i> "ratón".</p>	<p><b>Variable independiente.</b> Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill "hinojo"</p> <p><b>Indicador para toxicidad aguda:</b> Extracto a 2000 mg/kg</p> <p><b>Indicador para genotoxicidad:</b> Extracto a 200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kg.</p> <p><b>Variable dependiente.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Toxicidad aguda</li> </ul> <p><b>Indicador:</b> comportamiento general, pérdida de peso y muerte inducidos.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Efecto genotóxico</li> </ul> <p><b>Indicador:</b> % de micronúcleos.</p>	<p><b>Tipo de investigación:</b> Básico-experimental<sup>42</sup>.</p> <p><b>Población:</b> Plantas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill "hinojo" que crecen en los diferentes pisos ecológicos de Ayacucho, Perú.</p> <p><b>Muestra:</b> cuatro kilogramos de hojas de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill "hinojo"</p> <p><b>Tipo de muestreo:</b> por conveniencia</p> <p><b>Unidad experimental:</b> <i>Mus musculus</i> "ratón"</p> <p><b>Determinación de la toxicidad aguda.</b> Se usará el método de la clase tóxica aguda descrito en la normativa N° 423 de la OECD<sup>2</sup>.</p> <p><b>Determinación de la genotoxicidad</b> Se usará la "Prueba de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos" Test N° 474 de la OCDE 2016<sup>38</sup>.</p> <p><b>Análisis de datos</b> Los datos serán analizados utilizando el software SPSS versión 23, y expresados en forma de medias y desviación estándar<sup>43, 44</sup>.</p>