

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**Actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico  
de las hojas y de las flores de *Ligaria cuneifolia*  
(R. & P.) Tiegh. "Tullma" Ayacucho - 2019.**

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

Presentado por la:  
Bach. ALBÚJAR JANAMPA, Rocío del Pilar

AYACUCHO – PERÚ  
2019

A Dios por darme la fuerza de voluntad, la fe incesante y a mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, por su amor, paciencia y su motivación constante para alcanzar mis anhelos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi reconocimiento y gratitud a la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga; por brindarme la oportunidad de formación profesional.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, a toda la plana de docentes, por sus sabias enseñanzas compartidas durante mi formación profesional que con generosidad y orgullo aproveché para mi vida futura.

Al Mg. Q.F. Hugo Luna Molero, gracias por sus conocimientos impartidos durante mi formación profesional y por su valioso asesoramiento, cuyo esfuerzo se materializa en el presente trabajo de investigación, lo cual será de mucha utilidad en la búsqueda de la verdad.

Al Mg. Q.F. Marco Arones Jara, por su amistad y apoyo incondicional, que me ayudó a culminar el presente trabajo de investigación.

A todos mis amigos y personas que de alguna manera me acompañaron en la culminación del presente trabajo de investigación.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Actividad antimitótica	6
2.3. La célula	6
2.4. Ciclo celular	6
2.5. Control del ciclo celular	8
2.6. Mitosis	9
2.7. Cálculo de los índices	12
2.8. Citocinesis	12
2.9. Características del material biológico	14
2.10. Metabolitos de las plantas	15
2.11. Clasificación taxonómica	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Lugar de ejecución	21
3.2. Definición de la población y muestra	21
3.3. Diseño experimental	21
3.4. Análisis de datos	28
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSIÓN	33
VI. CONCLUSIONES	39
VII. RECOMENDACIONES	41
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS	47

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación científica de la tullma ( <i>Ligaria cuneifolia</i> )	19
Tabla 2. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y de las flores de <i>Ligaria cuneifolia</i> "Tullma" Ayacucho -2019	31
Tabla 3. Índice mitótico, según concentración y tiempo de tratamiento en el meristemo radicular de <i>Allium cepa</i> L. "Cebolla", con el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de <i>Ligaria cuneifolia</i> "Tullma" Ayacucho -2019.	32

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Fotografía de las muestras de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma” en hospederos de níspero de la localidad de Huamanguilla, Ayacucho 2019	49
Anexo 2. Constancia de identificación botánica de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma”. Ayacucho - 2019	50
Anexo 3. Flujograma del procedimiento experimental. Ayacucho 2019	51
Anexo 4. Extracción hidroalcohólico y extracto blando de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma”. Ayacucho 2019.	52
Anexo 5. Reconocimiento de los principales metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas y de las flores de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma”. Ayacucho 2019	53
Anexo 6. Reconocimiento de los principales metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas y de las flores de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma”. Ayacucho 2019	54
Anexo 7. Enraizamiento de los bulbos de <i>Allium cepa</i> L. “cebolla” y administración del extracto blando de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma”. Ayacucho – 2019	55
Anexo 8. Preparación citológica según la técnica de Deysson modificado. Ayacucho – 2019	56
Anexo 9. Fases de la mitosis celular. Ayacucho – 2019	57
Anexo 10. Comparaciones múltiples según el test de DUNCAN de los promedios del índice mitótico de las hojas. Ayacucho – 2019	58
Anexo 11. Comparaciones múltiples según el test de DUNCAN de los promedios del índice mitótico de las flores. Ayacucho – 2019	59
Anexo 12. Índice mitótico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> “Tullma”, en el meristemo radicular de <i>Allium cepa</i> L. “Cebolla”, según concentración y tiempo de tratamiento frente al blanco. Ayacucho -2019	60
Anexo 13. Índice mitótico del extracto hidroalcohólico de las flores de <i>Ligaria cuneifolia</i> “Tullma”, en el meristemo radicular de <i>Allium cepa</i> L. “Cebolla”, según concentración y tiempo de tratamiento frente al blanco. Ayacucho -2019	61

Anexo 14.	Variación del índice mitótico del efecto antimitótico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "Tullma", en el meristemo radicular de <i>Allium cepa</i> L. "Cebolla", según tiempo de tratamiento y concentración. Ayacucho -2019.	62
Anexo 15.	Variación del índice mitótico del efecto antimitótico del extracto hidroalcohólico de las flores de <i>Ligaria cuneifolia</i> "Tullma", en el meristemo radicular de <i>Allium cepa</i> L. "Cebolla", según tiempo de tratamiento y concentración. Ayacucho -2019	63
Anexo 16.	Índice mitótico a las 4 horas del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> según concentración frente al blanco. Ayacucho – 2019	64
Anexo 17.	Índice mitótico a las 8 horas del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> según concentración frente al blanco. Ayacucho – 2019	65
Anexo 18.	Índice mitótico a las 12 horas del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> según concentración frente al blanco. Ayacucho – 2019	66
Anexo 19.	Índice mitótico a las 24 horas del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> según concentración frente al blanco. Ayacucho – 2019	67
Anexo 20.	Índice mitótico a las 4 horas del extracto hidroalcohólico de las flores de <i>Ligaria cuneifolia</i> según concentración frente al blanco. Ayacucho – 2019	68
Anexo 21.	Índice mitótico a las 8 horas del extracto hidroalcohólico de las flores de <i>Ligaria cuneifolia</i> según concentración frente al blanco. Ayacucho – 2019.	69
Anexo 22.	Índice mitótico a las 12 horas del extracto hidroalcohólico de las flores de <i>Ligaria cuneifolia</i> según concentración frente al blanco. Ayacucho – 2019	70
Anexo 23.	Índice mitótico a las 24 horas del extracto hidroalcohólico de las flores de <i>Ligaria cuneifolia</i> según concentración frente al blanco. Ayacucho – 2019	71
Anexo 24.	Matriz de consistencia	72

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación aborda el estudio de la propiedad antimitótica del extracto de *Ligaria cuneifolia* (R. &P) Tiegh. "Tullma", evaluando la disminución del índice mitótico aplicado al crecimiento celular. El objetivo fue determinar la actividad antimitótica del extracto hidroalcohólico de las hojas y de las flores de *Ligaria cuneifolia* "Tullma". La investigación presentada se ejecutó en el Centro de Investigación en Bioquímica Clínica y Molecular de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, el tipo de investigación fue básica experimental, en su nivel descriptivo. La especie vegetal fue recolectada en el distrito de Huamanguilla, departamento de Ayacucho; las hojas y flores fueron sometidas a un proceso de extracción hidroalcohólica y luego se evaluó la actividad antimitótica, utilizando el método de Deysson modificado. En el análisis fitoquímico preliminar se determinaron flavonoides, taninos, fenoles, alcaloides, saponinas, lactonas, cumarinas, esteroides, triterpenos, azúcares reductores y aminas; el extracto tuvo un pH 5,27 en hojas y pH 4,80 en flores. Se ensayaron diferentes concentraciones sobre meristemos radiculares de los bulbos de *Allium cepa* L. "cebolla", siendo sometidos a tratamientos con el extracto de hojas y flores en concentraciones de 0.5%, 1%, 2%, 4% y 6%, a las 4, 8, 12 y 24 horas. Se observaron las tinciones celulares de cada muestra para determinar el índice mitótico, resultando que las flores presentan un IM=5,50% al 1% dentro de las 24 horas y las hojas un IM=6,70% al 4 % dentro de las 24 horas. Concluyendo finalmente que el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Ligaria cuneifolia* "Tullma" posee actividad antimitótica.

**Palabras clave:** actividad antimitótica, índice mitótico, índice de fases, *Ligaria cuneifolia*

## I. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional se ha propuesto, desde sus inicios, un abordaje integral a la problemática de la salud al estudiar al hombre como un todo, y en particular al hombre enfermo. De esta manera no solo se interesa por los síntomas físicos del trastorno sino también por el estilo de vida del sujeto, su forma de pensar, sus emociones o intereses, así como por sus reacciones ante el proceso morboso, lo cual es de importancia diagnóstica y terapéutica para la medicina tradicional<sup>1, 2</sup>. El hombre siempre ha buscado en la flora de su hábitat la manera de curarse de las enfermedades, por lo que el uso de las plantas medicinales se remonta a orígenes de la humanidad<sup>3</sup>. A pesar de que durante siglos las diferentes culturas del mundo han hecho uso de los productos herbarios y naturales como parte del acervo de la Medicina Natural y Tradicional, no ha sido sino hasta la actualidad que los científicos y profesionales de las ciencias médicas han aumentado su interés en este campo debido al reconocimiento de los beneficios reales que aportan a la salud<sup>4</sup>.

Desde 1976 la Organización Mundial de Salud (OMS), fomenta y financia planes de desarrollo, como parte de los programas de Atención Primaria de Salud (APS), una de ellas es la utilización de formas apropiadas de los sistemas tradicionales de medicina con el objetivo de fundamentar, mediante el debido rigor científico, la utilización de plantas medicinales<sup>5</sup>.

El presente trabajo de investigación busca dar un valor y una base científica, así como nuevas alternativas terapéuticas, de menos costo y más asequibles en el tratamiento de estas afecciones, disminuyendo el tiempo de evolución de la enfermedad y que proporcione alivio y tranquilidad. Un punto de interés de esta investigación de productos naturales es la búsqueda de bioensayos capaces de guiar al investigador en la purificación y fraccionamiento del extracto vegetal en estudio, por lo que se prefiere usar sistemas *in vitro* para analizar la actividad biológica de los extractos vegetales ya que los resultados de las pruebas se

obtienen mucho más rápido y económicamente son mucho más baratos en comparación a la pruebas *in vivo*<sup>6</sup>.

Se sabe que la parte aérea de la especie *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. "Tullma", es usada en la Amazonia para tratamiento no convencional de las neoplasias y procesos inflamatorios.<sup>3</sup> Actualmente son consideradas responsables de la actividad inmuno estimulante y antitumoral de fitomedicamentos preparados para tratar el cáncer.<sup>8</sup>

Existen técnicas para la determinación del efecto citostático, dentro de las cuales el uso del test de *Allium cepa* L. "cebolla", constituye un sistema *in vitro* ideal para ensayar las actividad biológica de los extractos vegetales que actúan en la proliferación celular así como también en diagnósticos de toxicidad de diferentes compuestos tanto farmacéuticos, alimenticios y contaminantes. Se sabe que el test de *Allium cepa* L. "cebolla", aprovecha la consecuencia de la disminución del índice mitótico, expresada en el menor desarrollo radicular, observando así diferencias significativas entre compuestos a distintas concentraciones, y tiempo de exposición.<sup>6,7</sup>

En vista de la información obtenida de investigaciones anteriores donde las especies de familia Loranthaceae se utilizan en todo el mundo para tratar diversas enfermedades incluido el cáncer por contener sustancias y propiedades farmacológicas, se consideró necesaria la realización de esta investigación para determinar la actividad antimitótica de *Ligaria cuneifolia* por ser una Loranthaceae y de esta manera poder coadyuvar en el desarrollo de nuevos tratamientos contra enfermedades. Planteamos los siguientes objetivos:

#### **Objetivo general**

Evaluar la actividad antimitótica del extracto hidroalcohólico de las hojas y de las flores de la planta *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. "Tullma". Ayacucho-2019.

#### **Objetivos específicos**

1. Determinar los parámetros fisicoquímicos del extracto hidroalcohólico de *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. "Tullma".
2. Realizar la identificación fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. "Tullma".
3. Evaluar la actividad citostática a las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. "Tullma".
4. Obtener el índice mitótico e interfásico dentro de la población meristemática total de la raíz de *Allium cepa* L. "cebolla".

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Planas <sup>9</sup> en el 2008 desarrolló la investigación sobre la caracterización antitumoral de plantas medicinales peruanas, con el objetivo de realizar estudios sobre la actividad celular de extractos vegetales en sistemas *in vitro*. El método empleado fue la recolección de datos a base de revistas científicas e internet donde encontró información que en países como Egipto, España, Venezuela, Argentina y Chile se viene realizando estos estudios. Lo que significa que nuestro país también viene ejecutando este tipo de investigaciones en las universidades San Marcos, Cayetano Heredia y Ricardo Palma que posteriormente serán útiles y exitosas en la medicina humana.

Varela et al<sup>10</sup>, en el 2010 realizó un estudio de “Muérdago criollo” *Ligaria cuneifolia* (R. Et P.) Tiegh. Loranthaceae desde el uso popular hacia el estudio de los efectos farmacológicos, con el objetivo de demostrar que la *Ligaria cuneifolia* (R. Et P.) Tiegh. (Loranthaceae), “muérdago criollo”, posee propiedades medicinales similares al *Viscum álbum* L. (Viscaceae) “muérdago”. Los ensayos realizados fueron los análisis de polifenoles donde mostraron que el único flavonol detectado fue la quercetina libre y glicosilada. La dihidroquercetina puede seguir dos vías metabólicas: una que por la acción de la flavonol sintasa lleva a la producción de la quercetina, o la otra, que produce leucoantocianidinas por la acción de una 3-hidroxiflavonona-4-reductasa. En la mayoría de los ejemplares analizados también se comprobó que estas dos familias presentan epítopes comunes en cuanto a las proteínas encontradas, por otro lado también se hicieron estudios en animales que han permitido establecer los efectos biológicos sobre el sistema cardiovascular y la acción citostática e inmunomoduladora, ya que en las últimas décadas se ha incrementado el interés por la presencia de constituyentes macromoleculares con acción citotóxica sobre las células tumorales; uno de los constituyentes más estudiado es una

glucoproteína, la lectina, que tiene un efecto inhibitorio sobre la síntesis ribosomal de proteínas en las células eucarióticas, lo que se concluye que el extractos acuosos de *Ligaria cuneifolia* tiene semejanza a las propiedades medicinales de *Viscum álbum* L. (Viscaceae) “muérdago” y además fue capaz de producir inhibición del crecimiento de células linfoides activadas a través de un mecanismo apoptótico lo que significa que esta revisión realizada sobre la *Ligaria cuneifolia* contribuye a profundizar más el conocimiento de esta especie en la flora peruana, empleada por sus efectos beneficiosos en la medicina natural.

Hostanska et al<sup>11, 12</sup> en el 2009 desarrollo la investigación sobre la Lectina vegetal derivada del *Viscum álbum* induce la expresión génica de citoquinas y la producción de proteínas en cultivos de células no nucleares de sangre periferal humana, con el objetivo de demostrar que la lectina induce la producción de citoquinas que ayuda en la actividad citostática de células cancerígenas siendo esta especie similar al “Muérdago criollo” *Ligaria cuneifolia* (Loranthaceae), donde se ha demostrado que una lectina vegetal del *Viscum álbum* (ML-I) aumenta el número y la actividad citotóxica de las células asesinas naturales e induce actividad antitumoral en modelos animales. En las pruebas realizadas en sangre completa, los monocitos y los granulocitos unen las moléculas ML-I conjugadas con fluorescencia a un grado mayor que los linfocitos. La expresión de los genes IL-1 beta e IFN-gamma también se pudo observar tras la estimulación con ML-I de células no adherentes. Lo que está comprobado que la actividad anticancerígena no es debida solamente a la inhibición de la proliferación celular sino también a la inducción de citoquinas y a los efectos inmunoadyuvantes. Estos resultados sugieren que las interacciones lectina-azúcar en la superficie celular de las células inmuno competentes pueden inducir la expresión génica de citoquinas y la síntesis de proteínas.

Esta capacidad puede atribuirse a una lectina galactósido específica, que induce secreción de citoquinas por parte de las células mononucleares *in vitro* y una acción antitumoral y antimetastática en linfosarcomas murinos.<sup>12</sup>

Carlos et al<sup>13,14</sup> en el 2012 desarrolló la investigación sobre Identificación de polifenoles individuales y Evaluación de la actividad anticancerígena de la *Ligaria cuneifolia* (Liga-liga), donde el objetivo fue averiguar más información sobre esta especie, ya que en nuestro país esta planta es empleada en la medicina tradicional para el tratamiento de múltiples desordenes en la salud, pero hay una

limitada información sobre sus propiedades farmacológicas. Para el estudio de esta especie vegetal se preparó un extracto metanólico y se llevó a cabo la identificación por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a un espectrómetro de masa (HPLC/MS) en una columna phenomenex luna C18 con detección ultravioleta a 280 y 320 nm usando una ionización de electrospray (ESI). La fase móvil fue A: agua/ ácido acético 98/2 (v/v) y B: agua/ acetonitrilo/ ácido acético 49.5/50/0.5 con una velocidad de flujo de 1mL/min en un programa de gradiente. Los extractos de las plantas (0-100 mg/mL) fueron incubados en líneas celulares correspondientes a cáncer de colon (HCT-116), cáncer de mama (MDA-MB-231), cáncer de próstata (PC-3), cáncer de hígado (Hep- G2), cáncer de piel (A-375) y cáncer de ovario (OVCAR-3). El contenido total de polifenoles demostró una significativa cantidad de compuestos bioactivos. La *Ligaria* presentó una actividad dependiente de la concentración en todas las líneas celulares cancerosas. El extracto presento mayor actividad anticancerígena contra: las líneas celulares de cáncer de colon (HCT-116) y cáncer de ovario (OVCAR-3), obteniéndose un valor de IC50 de 28.14 y 28.32 mg/mL respectivamente. Fueron identificados polifenoles como, quercetina, ácido clorogénico, ácido elágico y ácido clorogénico glicosido.

Significa que el estudio la *Ligaria cuneifolia* demuestra su potencial aplicación futura para el tratamiento de diversos malestares y enfermedades. Esta publicación abre las puertas para un estudio más detallado sobre esta planta y otras plantas Peruanas para poder corroborar con base científica sus aplicaciones en medicina tradicional y correlacionarlo con posibles aplicaciones farmacológicas.

María et al<sup>15</sup> en el 2018 desarrolló el análisis de polifenoles e iniciación de cultivos in vitro de *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh (Loranthaceae) de ejemplares provenientes de la localidad La Población, provincia de Córdoba, Argentina, donde el objetivo fue determinar el perfil de polifenoles de ejemplares silvestres en distintos órganos y extractos, así como las condiciones más adecuadas para iniciar sus cultivos in vitro. Para el estudio fitoquímico se realizaron cromatografías en capa delgada de tipo monodimensional observándose la presencia de flavonoides, derivados hidroxicinámicos y proantocianidinas en los extractos de hojas, tallos primarios, tallos secundarios y flores. En cuanto al análisis cuantitativo se observaron altos valores de flavonoides en hojas (2,14 mg eq. de rutina por gramo de material seco) y de

proantocianidinas en flores (7,52 mg eq. de catequina por gramo de material seco), compuestos responsables de las actividades biológicas mencionadas. Para la iniciación de cultivos in vitro se estudiaron diferentes aspectos: protocolo de desinfección, explanto de iniciación (hojas, pedicelos, frutos, tallos, meristemas y haustorios) y medios de cultivo base (reguladores de crecimiento y agentes antioxidantes). Los tratamientos más efectivos fueron  $HgCl_2$  al 0,05 - 0,2 % en una proporción de 25 explantos cada 100 ml de solución desinfectante y ácido cítrico 2,6 mm o L-cisteína 100  $\mu$ m como antioxidantes. Solamente fue posible iniciar callos a partir de haustorios cultivados en medio Gamborg B5 con el agregado de ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético 2,25  $\mu$ m como regulador de crecimiento. En base a los resultados obtenidos, las hojas y las flores de *L. cuneifolia* serían los órganos a considerar en la elaboración de especialidades medicinales para su futuro empleo farmacológico debido a su contenido en polifenoles.

Se concluye que en condiciones experimentales el extracto hidroalcohólico de las hojas y de las flores de *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. "Tullma" ha evidenciado tener actividad antimitótica.

## **2.2. Actividad antimitótica**

Es la capacidad de ciertos fármacos u otras moléculas de inhibir el crecimiento celular al impedir la mitosis, alterando la división celular y destruyendo las células que se multiplican más rápidamente. Son usados en tratamientos farmacológicos de enfermedades neoplásicas. También se llama inhibidor mitótico.<sup>16, 44</sup>

## **2.3. La célula**

La célula es la unidad morfológica y funcional de todo ser vivo. De hecho, la célula es el elemento de menor tamaño que puede considerarse vivo. De este modo, puede clasificarse a los organismos vivos según el número de células que posean: si solo tienen una, se les denomina unicelulares (como los protozoos o las bacterias, organismos microscópicos); si poseen más, se les llama pluricelulares. En estos últimos el número de células es variable: de unos pocos cientos, como en algunos nematodos, a cientos de billones, como el caso del ser humano.<sup>17</sup>

## **2.4. Ciclo celular**

El estudio del ciclo celular no sólo es importante para la biología celular, también tiene enormes implicaciones prácticas para combatir el cáncer, una enfermedad

ocasionada por la pérdida de la capacidad de una célula para regular su propia división.

El ciclo celular consiste en tres fases: Interfase, mitosis y citocinesis. Normalmente, los procesos fácilmente visibles de división nuclear (mitosis) y fisión celular (citocinesis), que juntos forman la llamada fase M, ocupan una fracción pequeña del ciclo celular total. La otra parte del ciclo, mucho más larga, se conoce con el nombre de interfase. En la fase M durante la transición de la metafase a la anafase tiene lugar un cambio brusco en el estado bioquímico de la célula; una célula puede detenerse en la metafase antes del punto de transición, pero una vez ha sobrepasado este punto, la célula continuará sin detenerse hasta el fin de la mitosis y a través de la citocinesis a la interfase.<sup>21</sup>

Las células se reproducen duplicando su contenido y luego dividiéndose en dos. El ciclo de división celular es el medio fundamental a través del cual todos los seres vivos se propagan. En especies unicelulares como las bacterias y levaduras, cada división de la celular produce un nuevo organismo. En especies pluricelulares se requieren muchas secuencias de divisiones celulares para crear un nuevo individuo; la división celular también es necesaria en el cuerpo adulto para reemplazar las células perdidas por desgaste, deterioro o por muerte celular programada. Así, un humano adulto debe producir muchos millones de nuevas células cada segundo simplemente para mantener el **status quo** y si la división celular se detiene, a causa por ejemplo de una dosis elevada de radiación ionizante, el individuo morirá en pocos días.<sup>18</sup>

Lo primero y principal para que se produzca un par de células hijas genéticamente idénticas es que el ADN se replique exactamente y que los cromosomas replicados se segreguen en dos celular distintas. La gran mayoría de las células también doblan su masa y duplican todos sus orgánulos citoplasmáticos en cada ciclo celular. De este modo, durante el ciclo celular, un conjunto complejo de procesos citoplasmáticos y nucleares tiene que coordinarse unos con otros.<sup>18</sup>

En el pasado se estudiaba el ciclo celular observando los pasos de la segregación cromosómica con un microscopio óptico y siguiendo la replicación del ADN. Experimentos recientes han aportado perspectivas nuevas y más sencillas, revelando un sistema de control del ciclo celular que coordina el ciclo en su totalidad. Las proteínas de este sistema de control aparecieron por primera vez hace más de mil millones de años y se han conservado tan bien durante su

evolución que muchas de ellas funcionan perfectamente cuando se transfieren de una célula humana a una célula de levadura. Por lo tanto podemos estudiar el sistema de control en una gran variedad de organismos eucariotas y utilizar los descubrimientos de todos ellos para dar una visión unificada de cómo las células crecen y se dividen.<sup>18</sup>

## **2.5. Control del ciclo celular**

El control del ciclo celular actúa como un reloj que asignará un tiempo fijo a cada proceso en el ciclo celular, regulado por retroalimentación. Sin esta retroalimentación el retraso o la interrupción en cualquiera de estos procesos podrían provocar un desastre.<sup>19</sup>

El sistema de control del ciclo celular es un dispositivo bioquímico que actúa cíclicamente, compuesto por un conjunto de proteínas interactivas que inducen y coordinan los procesos subordinados básicos que duplican y dividen el contenido de la célula (subordinados en este contexto simplemente significa que dichos procesos ocupan una posición inferior en la jerarquía del control del ciclo celular). Durante el ciclo celular típico, el sistema de control está regulado por unos factores de retraso que pueden parar el ciclo en unos puntos de control determinados. Los factores de retraso son importantes y sirven para que el sistema de control celular este regulado por señales de su entorno. Normalmente estas señales de control ambiental actúan en uno o dos de los puntos de control cruciales del sistema de control del ciclo, uno en  $G_1$ , justo antes de entrar en fase S; y el otro en  $G_2$ , al comenzar la mitosis. Si las circunstancias impiden la división celular, será en este punto del ciclo donde muchas células se detendrán.<sup>19</sup>

### **2.5.1. La fase S: Replicación del ADN nuclear**

Es el periodo durante el cual la célula crece, replica su ADN y se prepara para la siguiente división. Este periodo está comprendido entre divisiones celulares y es la fase más larga del ciclo celular, ocupando casi 95% del ciclo. Consta de tres fases (G1, S y G2) dentro del ciclo celular y una fase (G0) en estado de reposo.

La **fase G1** (G= "gap", intervalo, lapso) Es la primera fase del ciclo celular en la que existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN. La fase G1 es el periodo que transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN. Tiene una duración de entre 6 y 12h, y durante este tiempo la célula dobla su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular. Es el periodo que más variación de tiempo presenta,

pudiendo durar días, meses o años. En esta fase, la célula es diploide. Las células que no se dividen nuevamente (como las neuronas o las del músculo esquelético) pasan toda su vida en este periodo, que en estos casos se denomina G<sub>0</sub>.<sup>20</sup>

La **fase S** es la fase de síntesis o replicación del ADN, y corresponde a la segunda fase del ciclo celular. Comienza cuando la célula adquiere el tamaño suficiente y el ATP necesario. Con la duplicación del ADN, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de ADN que al principio de la división celular tenía. Tiene una duración promedio de seis a ocho horas.<sup>20</sup>

La **fase G<sub>2</sub>** es el tiempo que transcurre entre la duplicación del ADN y el inicio de la mitosis. Dado que el proceso de síntesis consume una gran cantidad de energía, la célula entra nuevamente en un proceso de crecimiento y adquisición de ATP que proporcionará energía durante el proceso de mitosis. En esta fase continúa la duplicación de proteínas y ARN, y el contenido de ADN es tetraploide o 4n. Si se observa al microscopio, se perciben cambios en la estructura celular que indican el principio de la división celular. Tiene una duración de entre 3 y 4 horas.<sup>20</sup>

### **2.5.2. Proteínas que actúan en el ciclo celular**

El sistema de control del ciclo celular se basa en dos familias clave de proteínas. La primera es la familia de las **proteína quinasas dependientes de ciclina (Cdk**, de Cyclin-Dependent protein Kinases), las cuales inducen los procesos subordinados fosforilando proteínas seleccionadas sobre serinas y treoninas. La segunda es una familia de proteínas activadoras especializadas, las ciclinas, que se unen a las moléculas Cdk y controlan su capacidad para fosforilar proteínas diana adecuadas. El ensamblaje cíclico de compuestos de ciclina y Cdk, su activación, y desensamblaje, son los procesos centrales que dirigen el ciclo celular. Las ciclinas se llaman así porque sufren un ciclo de síntesis y degradación en cada ciclo de división de la célula. Hay dos clases principales de ciclinas: las ciclinas mitóticas, las cuales se unen a las moléculas de Cdk durante G<sub>2</sub> y son necesarias para entrar en la mitosis, y las ciclinas G<sub>1</sub>, las cuales se unen a moléculas Cdk durante G<sub>1</sub>: y son necesarias para entrar en la fase S.<sup>19</sup>

### **2.6. Mitosis**

La mitosis es el proceso de segregación de cromosomas y división de las células somáticas eucariotas (células no germinales), que conllevan a la copia y reproducción del material genético. Este proceso asegura que cada célula que nace de otra tenga los mismos datos genéticos de la célula madre. La mitosis

cumple la función de distribuirlos cromosomas duplicados de tal modo que cada nueva célula obtenga una dotación completa, y similar de cromosomas a la célula progenitora y a su célula hermana. La capacidad de la célula para llevar a cabo esta distribución depende del estado condensado de los cromosomas durante la mitosis y del ensamble de microtúbulos, denominado huso mitótico. En los estadios tempranos de la mitosis, cada uno de los cromosomas consiste en dos copias idénticas, llamadas cromátides, que se mantienen juntas por sus centrómeros.<sup>20</sup>

Al mismo tiempo se organiza el huso, cuya formación se inicia a partir de los centrosomas. Tanto en las células animales como en las vegetales, el esqueleto del huso está formado por fibras que se extienden desde los polos al ecuador de la célula.<sup>20</sup>

Entonces la célula se divide por el centro en dos mediante un proceso llamado **citocinesis**, que tradicionalmente se considera el fin de la fase mitótica, o **fase M**, del ciclo celular. En la mayoría de las células, toda la fase M solo dura una hora aproximadamente, lo cual es solo una pequeña fracción de la duración total del ciclo.<sup>18</sup>

### **2.6.1. Etapas de la mitosis**

La fase M se divide en cinco estadios. Los cuatro primeros estadios de la fase M constituyen la mitosis (profase, metafase, anafase y telofase) que tienen lugar en un orden secuencial estricto; mientras el quinto estadio, que es citocinesis empieza durante la anafase y continúa hasta el fin de la fase M.<sup>18</sup>

- a) Interfase:** Durante este periodo la cromatina ya está duplicada, pero todavía no se ha condensado. Dos pares de centriolos se encuentran justo al lado de la envoltura nuclear, la célula duplica su material genético, crece y prepara las estructuras y proteínas para llevar a cabo mitosis.
- b) Profase:** Primera fase de la mitosis, los centriolos empiezan a moverse en dirección a los polos opuestos de la célula, los cromosomas condensados son ya visibles, la envoltura nuclear se rompe y comienza la formación del huso mitótico. La profase finaliza con la desintegración de la envoltura nuclear y la desaparición de los nucléolos.
- c) Metafase:** Segunda fase de la mitosis, las fibras polares y cinetocóricas del huso tiran de cada par de cromátides hacia un lado y otro, luego se desplazan hasta situarse en el ecuador de la célula, formando la placa metafásica o ecuatorial.

- d) **Anafase:** Tercera fase de la mitosis, el centrómero se divide y cada cromosoma se separa en sus dos cromátidas. Los centrómeros emigran a lo largo de las fibras del huso en direcciones opuestas, arrastrando cada uno en su desplazamiento a una cromátida. En ella se realiza la distribución de las copias de la información genética original.
- e) **Telofase:** Se forma una envoltura nuclear el rededor de cada dotación cromosómica y los cromosomas se descondensan y adquieren, nuevamente, un aspecto difuso. Los nucléolos reaparecen. El huso mitótico se desorganiza y la membrana plasmática se invagina en un proceso que hace separar las dos células hijas.

## 2.6.2. Características de la fase M

### a) La condensación cromosómica

Es la primera manifestación apreciable de la fase M, hay una progresiva compactación de la cromatina interfásica dispersa, formando unos cromosomas en forma de hilo. Esta condensación es necesaria para la segregación organizada de cromosomas en dos células hijas que tendrán lugar a continuación, y se ve acompañada por la extensa fosforilación de moléculas de histona H1 (hasta seis fosfatos por molécula). Se cree que la fosforilación de la histona H1, es el comienzo de la fase M, contribuye a la condensación cromosómica, ya que su concentración es de aproximadamente una molécula por nucleosoma y se sabe que participa en la condensación de los cromosomas. La condensación cromosómica es de prelude de dos procesos mecánicos distintos (1) **mitosis:** la segregación de cromosomas y la formación de dos núcleos en lugar de uno. (2) **citocinesis:** la división de la totalidad de las células en dos. Estos procesos se efectúan por dos estructuras citoesqueléticas diferentes que aparecen fugazmente durante la fase M.<sup>18</sup>

### b) El huso mitótico

La primera en formarse es un huso mitótico bipolar, compuesto por microtúbulos y por sus proteínas asociadas. El huso mitótico alinea los cromosomas replicados en un plano que secciona la célula en dos; entonces cada cromosoma se separa en dos cromosomas hijos, que son desplazados hacia los polos opuestos del mismo huso. Existen tres tipos de microtúbulos del huso: **Los microtúbulos polares**, que se solapan en la línea media del huso y son los responsables de empujar a los polos del huso causando su separación; **microtúbulos cinetocóricos**, que se adhieren al cinetocoro especializado que

forma el centrómero de cada cromosoma duplicado y conduce los cromosomas en el huso; y los **microtúbulos astrales**, que parten en todas direcciones desde los centrosomas y cree que contribuyen a generar las fuerzas que separan los polos y los sitúan en relación del resto de la célula.<sup>18</sup>

### **c) Anillo contráctil**

La segunda estructura citoesquelética necesaria en la fase M de las células animales es el anillo contráctil de filamentos de actina y de miosina II, que se forman ligeramente más tarde debajo de la membrana plasmática, en un plano perpendicular al eje del huso; al mismo tiempo que se contrae el anillo se contrae la membrana hacia dentro dividiendo la célula en dos, asegurando así que cada célula hija reciba no tan solo una serie completa de cromosomas sino también la mitad de los constituyentes citoplasmáticos de la célula madre. Las dos estructuras citoesqueléticas contienen diferentes series de proteínas. En las células vegetales ocurre la misma secuencia, aunque sus paredes rígidas requieren un mecanismo diferente para la citocinesis.<sup>18</sup>

## **2.7. Cálculo de los índices**

### **2.7.1. Índices del ciclo celular**

- a. Índice mitótico:** Está dado por el porcentaje de células proliferativas que se encuentran en mitosis.
- b. Índice interfásico:** Es el porcentaje de células proliferativas en interfase, se calcula restando de 100, el índice mitótico.
- c. Índice de Fases:** Es el porcentaje de las células mitóticas en cada una de sus fases.<sup>21</sup>

### **2.7.2. Determinación del Índice Mitótico (IM)**

Las muestras procesadas de cada hora son observadas al microscopio con el propósito de determinar el índice de fases (IF) mediante el conteo de las diferentes fases del ciclo celular (interfase, profase, metafase, anafase y telofase). Se observará aproximadamente 200 a 800 células, donde serán registradas y expresadas en porcentaje y el índice mitótico se determinará por la sumatoria de los índices de fases (profase, metafase, anafase y telofase).<sup>22</sup>

## **2.8. Citocinesis**

Tras la división nuclear se produce la división celular o citocinesis, formándose dos células hijas con la misma dotación cromosómica que la célula madre. La citocinesis es el proceso de separación de las células formadas; reaparecen los organelos y se restablece el citoesqueleto. La división del citoplasma se produce

junto con la telofase, se produce un surco en la membrana plasmática, producido por un anillo de microfilamentos adosados a ella. Las dos células hijas se separan, distribuyéndose el citoplasma y los organelos de un modo equitativo. En las células animales, la membrana comienza a constreñirse alrededor de la circunferencia de la célula, formando un anillo contráctil de actina y miosina. En las células vegetales, las vesículas producidas dividen al citoplasma en la línea media formando una placa celular que crece en forma centrífuga y se fusiona a la membrana de la célula madre, dividiendo la célula en dos. Cuando la citocinesis no se presenta, los dos núcleos quedan en el mismo citoplasma, y resulta una sola célula binucleada. Cuando se completa la división celular, se han producido dos células hijas, más pequeñas que la célula progenitora, pero indistinguibles morfológicamente de ésta.<sup>19</sup>

### **2.8.1. Proteínas que actúan en la citocinesis**

La segmentación se consigue mediante la contracción de un fino anillo compuesto principalmente por una formación superpuesta de filamentos de actina y de filamentos bipolares de miosina II. Este anillo contráctil define el surco de segmentación. Consiste en filamentos orientados en circunferencia, unidos a la cara citoplasmática de la membrana plasmática mediante proteínas de anclaje no caracterizadas. El anillo contráctil se ensambla en el anafase temprano. Una vez ensamblado, desarrolla una fuerza suficientemente grande como para doblar una delgada aguja de vidrio insertada en la célula. El anillo contráctil se elimina por completo al terminar la segmentación, cuando la membrana plasmática del surco de la segmentación se estrecha formando el cuerpo medio, que permanece como puente entre las dos células hijas. El cuerpo medio contiene los restos de los dos conjuntos de microtúbulos polares, que se hallan fuertemente empaquetadas por material denso de la matriz.<sup>18</sup>

### **2.8.2. La citocinesis en las células de las plantas superiores**

Las células vegetales, que están encerradas en una pared celular relativamente rígida, pasan por la citocinesis mediante un mecanismo muy distinto. A diferencia de las células animales que se constriñen por un surco que avanza desde la superficie celular hacia adentro, las células vegetales deben construir una pared celular dentro de una célula viva. La formación de la pared comienza en el centro de la célula y crece hacia afuera para encontrarse con las paredes laterales existentes. La formación de una nueva pared celular inicia con la construcción de un precursor más sencillo que se conoce como placa celular. El plano en el que la placa celular se forma es perpendicular al eje del huso mitótico pero, a

diferencia de las células animales, no depende de la posición del huso. Más bien, la orientación del huso mitótico y la placa celular dependen de un cinturón de microtúbulos corticales, la banda precursora, que se forma al final de G2. Aunque la banda de la pre profase ya se desarmó para la profase, deja una huella invisible que establece el futuro sitio de división. El primer signo de la formación de la placa celular se observa en la etapa final del anafase con la aparición del fragmoplasto en el centro de la célula en división. El fragmoplasto consiste en cúmulos de microtúbulos que se intercalan con orientación perpendicular a la futura placa, junto con vesículas membranosas y material electrodenso. Los microtúbulos del fragmoplasto, que surgen de remanentes del huso mitótico, sirven como pistas para el movimiento de pequeñas vesículas secretoras derivadas del aparato de Golgi en la región. Las vesículas se alinean en un plano entre los núcleos hijos. Las membranas de la red tubular se convierten en la membrana plasmática de las dos células hijas adyacentes, en tanto que los productos secretores que se transportaron dentro de las vesículas contribuyen al plano celular intermedio. Una vez que la placa celular se completa, se agregan celulosa y otros materiales para producir una pared celular madura.<sup>23</sup>

## **2.9. Características del material biológico**

### **2.9.1. La raíz**

Órgano de absorción de la planta, tiene condiciones óptimas de permeabilidad a sustancias exógenas de forma que la penetración y eliminación de solutos es sencilla, con la consiguiente facilidad para el uso de tratamientos con drogas, además de que la simplicidad del medio de cultivo (agua) elimina las complejas interacciones posibles entre drogas y su solvente.<sup>24,26</sup>

### **2.9.2. Meristemos radiculares**

Los meristemos de raíces vegetales, son tejidos formados mayoritariamente por una población de células que se mantienen en continua proliferación. Con el simple hecho de mantenerlos en condiciones ambientales constantes entre (18 – 20 °C) y con un tamaño promedio de 2-3 mm de longitud de meristemos radiculares, se obtiene una cinética proliferativa en equilibrio fluido, muy adecuada para el análisis de cuestiones básicas como la regulación de los procesos que controlan esa actividad celular.

En este tipo de modelos se puede cuantificar los efectos producidos por sustancias antimitóticas, citotóxicas y genotóxicas que alteran el ciclo celular e

inducen la aparición de figuras mitóticas e incluso ocasionan daños a nivel cromosómico.<sup>25,26</sup>

## **2.10. Metabolitos de las plantas**

Contiene dos clases de componentes químicos complejos denominados:<sup>27</sup>

### **2.10.1. Metabolitos primarios**

Proteínas, ácidos grasos y polisacáridos. Están universalmente distribuidos y participan en la actividad celular de todo ser viviente.<sup>27</sup>

Son sustancias que no ejercen una actividad farmacológica directa sobre las funciones fisiológicas del organismo animal pero son imprescindibles para mantener su vida.<sup>28</sup>

### **2.10.2. Metabolitos secundarios con actividad antimitótica**

Alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, etc., son compuestos químicos de estructuras relativamente compleja y de distribución más restringida y más característica de las plantas, estos no son indispensables ni se ha descubierto aún una función metabólica en la cual ellos intervienen; son considerados como “artículos de lujo” en la planta.<sup>29</sup>

#### **a) Flavonoides**

Según Wagner y Col, el estudio de flavonoides en *Ligaria cuneifolia*, independientemente del hospedante y lugar geográfico, revelan la presencia de quercetina como el único flavonol. La quercetina se presenta libre y monoglicosidada con xilosa, ramnosa y arabinosa, además, se detectaron leucoantocianidinas, catequina-4- $\beta$ -ol y proantocianidinas en distinto grado de polimerización: polímeros, oligómeros y dímeros que, que por tratamiento ácido, producen cianidina.<sup>29</sup>

Los flavonoides muestran interesantes actividades ya que son pigmentos vegetales no nitrogenados. Su función dentro del mundo de las plantas parece ser la de atraer a los polinizadores hacia las flores o los animales que comen los frutos con la intención de que puedan dispersar mejor las semillas. Una de sus interesantes actividades es sobre la pared de los capilares disminuyendo su permeabilidad y fragilidad aumentando su resistencia, por eso detienen el flujo de proteínas y células de sangre, pero permiten el flujo de oxígeno, dióxido de carbono y otros nutrientes, esto puede ayudar a proteger los vasos sanguíneos contra las infecciones y las enfermedades.<sup>39</sup> Los flavonoides también pueden relajar el músculo liso del sistema cardiovascular, disminuyendo así la presión de la sangre. Los flavonoides son antioxidantes y también pueden prevenir la

oxidación del colesterol lipoproteínas de baja densidad (LDL), previniendo el aumento de placa arterioesclerótica, tienen la propiedad de barrer radicales libres superóxido.<sup>30</sup>

Entre sus propiedades medicinales podemos mencionar:

- Propiedades antioxidantes: catequinas del té verde, tienen una alta capacidad para neutralizar los radicales libres e impedir los perniciosos efectos que estos ejercen en la salud de nuestro organismo.
- Propiedades anticancerosas: se sabe que muchos inhiben el crecimiento de las células cancerosas.
- Propiedades cardiotónicas: (quercetina, genisteína y la luteolina). Tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación.
- Fragilidad capilar: Mejoran la resistencia de los capilares y favorecen el que estos no se rompan.
- Propiedades antitrombóticas: Impide la formación de trombos en los vasos sanguíneos y posibilita una mejor circulación.
- Disminución del colesterol: capacidad para rebajar el colesterol y los triglicéridos, supone una ventaja en la salud del aparato circulatorio.
- Antiinflamatorias y analgésicas: (hesperidina y otros flavonoides), utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades como la artritis.
- Protección del estómago: (quercetina, la rutina y el kamferol), protegen la mucosa gástrica.
- Protección de hígado: (apigenina y la quercetina), tiene un gran poder protector contra las enfermedades del hígado.
- Antimicrobianas: La mayoría de estos principios han demostrado tener propiedades antivirales, antifúngicas y antibacterianas.<sup>30,31</sup>

En *Ligaria cuneifolia* la biosíntesis de estos compuestos puede seguir dos caminos: en un camino, la dihidroquercetina es oxidada por la enzima flavonol sintasa y genera quercetina; parte de este compuesto se acumula, pero gran parte sufre glicosidaciones en el OH del carbono 3 por enzima UDP azúcar: flavonoide 3-O-glicosil transferasa. En el otro camino, el grupo ceto de la dihidroquercetina es reducido por la acción de la enzima 3-hidroxiflavanona-4-reductasa NADPH dependiente y origina leucocianidina. Este compuesto puede ser transformado en flavan-3 oles, por la 3,4-cis-diol-reductasa. Ambos, la leucocianidina y los flavan-3 oles pueden ser condensados y originar dímeros,

oligómeros y polímeros por la actividad del complejo enzimático proantocianidinas sintasa. La vía biosintética de los flavonoides en *L. cuneifolia* es menos compleja si se compara con la de *V. álbum*, porque este presenta una diversificación en la biosíntesis, debido a la acción de la S-adenosil-L-metionina-X-O-metilasa (SAM) que genera flavonoides metilados, compuestos no detectados en la "tullma" o *Ligaria cuneifolia*.<sup>32</sup>

#### **b) Alcaloides**

Los Alcaloides fueron los compuestos básicos de origen natural que presentan nitrógeno. Tienen una estructura generalmente compleja y ejercen acciones fisiológicas diversas incluso a dosis muy bajas. Son tóxicos y capaces de precipitar con ciertos reactivos característicos. Dentro de su estructura tenemos a la reserpina que actúa como neuroléptico, sedante mayor, interacciona con los receptores de la dopamina y serotonina, es antihipertensiva, disminuye la presión arterial y la frecuencia cardíaca, actúa a nivel del sistema nervioso central sobre el centro motor a nivel del hipotálamo, tiene además acción simpaticomimética aumenta la liberación de noradrenalina, inhibe la receptación, aumenta el metabolismo por parte de las monoaminooxidasas (MAO). Otro alcaloide es la rescinamina que tiene acción similar a la reserpina pero es menos depresora del sistema nervioso central, la ajmalicina es un bloqueador  $\beta$  adrenérgico produce vasodilatación y es simpaticolítico, se usa en el tratamiento de alteraciones vasculares y cerebrales en geriatría junto con los alcaloides del cornezuelo del centeno.<sup>30, 31</sup>

#### **c) Taninos**

Son compuestos fenólicos hidrosolubles, que presentan junto a las reacciones clásicas de los fenoles, la propiedad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas. Los taninos son compuestos poliméricos más complejos que se clasifican en hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables están constituidos por unidades de ácido elágico, y pueden estar unidos a una molécula de glucosa. Los taninos hidrolizables están constituidos por unidades de ácido elágico, y pueden estar unidos a una molécula de glucosa. En cambio, los taninos condensados resultan de la condensación de unidades de flavan-3-oles, tales como la catequina que tienden a polimerizarse. 24 Los taninos condensados han sido más estudiados respecto a su actividad antioxidante, además de que se ha reportado que poseen beneficios a la salud por su actividad antibacteriana o bacteriostática.<sup>30,31</sup>

Dotadas de la propiedad para transformar las pieles (que con el tiempo llegar a pudrirse) en cueros. Son sustancias que se encuentran ampliamente repartidas en todo el reino vegetal (excepto en algas, hongos y líquenes) y que son especialmente abundantes en órganos subterráneos y plantas leñosas.<sup>30</sup>

#### **d) Furanocumarinas**

La característica principal de esta sustancia es la acción fotosensibilizante sobre las células. Se entiende como foto sensibilización un proceso en el cual la acción combinada de la radiación y un agente sensibilizante produce efectos físicos, químicos y biológicos, no observados sin la presencia de este último.

El mecanismo por el cual ocurre la acción fotosensibilizante soporta el hecho de que esta se manifiesta en una foto toxicidad, que implica fundamentalmente una alteración o desorganización de numerosos procesos biológicos en células bacteriales o fúngicas, en virus de DNA, en células de mamíferos in vitro, en tejidos vegetales, y en células epidérmicas en aves y mamíferos.<sup>30,31</sup>

#### **e) Saponinas**

Se trata de O-heterósidos (azúcar y aglicón unidos a través de un oxígeno). Se caracterizan por su capacidad para producir espuma cuando se agita una solución acuosa que las contiene. Se forma espuma debido a que las saponinas disminuyen la tensión superficial del agua. Son por lo tanto tensioactivos naturales. Tiene acción mucolítico y expectorante, pues aclara el mucus denso facilitando su expulsión y consigue que el nuevo mucus que se forme fluya fácilmente. Poseen propiedades diuréticas y depurativas, muy útiles en caso de edemas.<sup>30,31</sup>

#### **f) Diterpenos**

Posee una estructura básica con 20 carbonos y proceden biosintéticamente del ácido mevalónico aunque existan un gran número de estructuras distintas. Un ejemplo típico es el caso del taxol, también conocido como el paclitaxel, compuesto obtenido a partir de las cortezas de tejo americano (*Taxus brevifolia* Nutt.) que ha mostrado una elevada eficacia en el tratamiento de algunos tipos de cánceres Este compuesto es un diterpeno tricíclico con una función amida por lo que en ocasiones se considera como un pseudoalcaloide.<sup>30,33</sup>

#### **g) Triterpenos y esteroides**

Derivados mayoritariamente del epoxiescualeno o en menor número del propio escualeno. Todos aquellos poseen un hidroxilo en el C<sub>3</sub> que le permite la unión con una o varias moléculas glucídicas, dando lugar a estructuras heterosídicas.

Pueden establecerse dos grande grupos dependiendo de su estructura química: triterpenos (tetra y pentacíclicos) y esteroides. Se encuentran grupos de gran interés farmacéutico como son los saponósidos y los heterósidos cardiotónicos<sup>31</sup>

## 2.11. Clasificación taxonómica

### 2.11.1. *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. “tullma”

La determinación botánica fue realizada según el sistema de clasificación Engler y Pranti, modificado por Melchior en 1904, en el herbarium Huamangensis a cargo de la Blga. Laura Aucasime Medina de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH, y es lo siguiente:

**Tabla.1.** Clasificación científica de la tullma (*Ligaria cuneifolia*)

Reino	: Vegetal
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Sub clase	: Risidae
Orden	: Santalales
Familia	: Loranthaceae
Género	: Ligaria
Especie	: <i>Ligaria cuneifolia</i> (R. & P.) Tiegh.
Sinonimia	: <i>Psittacanthus cuneifolius</i> (R. & P) G. Don
Nombre común	: “Tullma”, “sueda con suedas”

Fuente: certificado emitido por la bióloga Aucasime Medina Laura 2019 (Anexo2)

### 2.11.2. Hábitat

*Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. (Loranthaceae) es una especie vegetal hemiparásita semileñosa con una amplia distribución en Sudamérica (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Perú y Uruguay). En el Perú se encuentra a lo largo de los niveles medios del territorio andino, en el piso ecológico yunga entre los 2200 a 2500 msnm. Se denomina vulgarmente “liga”, “liguilla”, “sueda con suedas” o “muérdago criollo”.<sup>36</sup>refiriéndose su uso en medicina tradicional como hipotensor, antimicrobiano, hipolipemiente, antioxidante, citostática e inmunosupresora. Al igual que otras especies de la familia Loranthaceae, *Ligaria cuneifolia* se caracteriza por la producción de altos niveles de polifenoles, especialmente flavonoides del grupo de los flavonoles, quienes podrían ser responsables de sus actividades farmacológicas.<sup>34</sup>

### 2.11.3. Descripción botánica

Es una planta hemiparásita que se desarrollan sobre vástago leñosos, es decir que dependen del hospedante para vivir, de donde obtienen el agua y los nutrientes minerales; son organismos fotosintetizadores ya que producen sus

propios carbohidratos.<sup>10</sup> Por su condición de hemiparásitas, en general están desprovistas de raíces; al germinar la semilla da lugar a un disco de adhesión en el hipocótilo que le permite aferrarse a la superficie de las ramas y de los tallos del hospedante. Luego generan un cono de penetración que crece entre los tejidos hasta llegar al xilema por donde circulan el agua y las sales.<sup>35, 36</sup>

Planta hemiparásita de aproximadamente 1 m. de altura, ramosa, las ramas ascendentes-divergentes; hojas oblongo-cuneadas o angostamente aovadas, subsésiles, 1.5 – 2 cm. de largo por cerca de 5 mm. de ancho, obtuso en el ápice; inflorescencia en racimos; flores pedunculadas, cáliz cuculiforme de 2.5 mm. de largo; corola tubular de 2.5 – 3 cm. de largo, amarillento; frutos drupáceo, de 8 – 10 mm. de largo.

#### **2.11.4. Distribución geográfica**

Es una especie sudamericana que se encuentra en Perú, Bolivia, Argentina, Chile, Brasil y Uruguay. En Argentina presenta una gran dispersión; se extiende desde Salta y Jujuy en el norte hasta la pampa en el sur, y desde Ríos y al noreste de Buenos Aires hasta la pre cordillera andina. En el Perú se encuentra a lo largo de los niveles medios del territorio andino, en el piso ecológico yunga entre los 2200 a 2500 msnm.<sup>35</sup>

#### **2.11.5. Hospedantes**

La especie *Ligaria cuneifolia* se desarrolla con preferencia en leguminosas arborescentes (*Geoffroea*, *Anadenanthera*, *Acacia*); además, parasita especies de *Celtis*, *Shinus*, *Bulnesia*, *Schinopsis* y *Ephedra*. Crece sobre las plantas cultivadas como *Malus doméstica* (manzano), *P.communis* (peral) y *Prunus spp.*<sup>35</sup>

#### **2.11.6. Propiedades medicinales**

Tiene propiedades vasopresora (antihipertensiva) induce principalmente un incremento de la presión arterial, echo que restaría justificación para su uso como antihipertensivo. Actividad antiinflamatoria gracias a sus metabolitos secundarios que contiene y además posee una acción citostática e inmunomoduladora, ya que según estudios los componentes activos contra el tumor han sido identificados como lectinas, viscotoxinas, proteínas, péptidos, oligosacáridos, alcaloides, compuestos polifenólicos y flavonoides.<sup>11</sup>

Está comprobado que la actividad anticancerígena no es debida solamente a la inhibición de la proliferación celular sino también a la inducción de citoquinas y a los efectos inmunodyacentes.<sup>12</sup>

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de ejecución**

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios del Centro de Investigación en Bioquímica Clínica y Molecular de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de Febrero a Julio del 2019.

#### **3.2. Definición de la población y muestra**

##### **3.2.1. Población**

Plantas de la especie *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. "Tullma" del distrito de Huamanguilla, en la provincia de Huanta del departamento de Ayacucho.

##### **3.2.2. Muestra**

3 Kg de hojas y de flores secas de la especie *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. "Tullma" recolectadas al azar en el distrito de Huamanguilla en el mes de febrero del 2019, provincia de Huanta, departamento de Ayacucho.

#### **3.3. Diseño experimental**

##### **3.3.1. Tipo de estudio**

La tipología de la investigación corresponde a un estudio según el propósito de estudio básico experimental porque se realizará comparaciones de la variable dependiente entre los grupos experimentales y de control, según la cronología de las observaciones es prospectivo, porque en el registro de información se tomarán en cuenta los hechos a partir de la fecha de estudio y según el número de mediciones es longitudinal porque se estudiarán las variables a lo largo del tiempo durante el periodo de investigación.

##### **3.3.2. Obtención y características del extracto**

###### **3.3.2.1. Recolección de la muestra**

El procedimiento para la recolección, clasificación y secado de las muestras se realizaran de acuerdo a los procedimientos de recolección conservación dadas por Villar del Fresno.<sup>37</sup>

Se recolectará aproximadamente 1 Kg de las hojas y flores de *Ligaria cuneifolia* “tullma”, se lavará con abundante agua y se llevara a secar bajo la sombra, en una habitación ventilada, sobre papel periódico, deberá estar aproximadamente por una semana, una muestra herborizada se llevará a la Bióloga Laura Aucasime Medina de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para su clasificación taxonómica.

### **3.3.2.2. Obtención de extracto hidroalcohólico**

1 Kg de hojas y de flores desecadas serán molidas en un mortero, luego se macerará en frascos grandes por una semana aproximadamente en alcohol al 96°, ya que a esta concentración en alcohol puede actuar como insecticida, fungicida, etc.; dependiendo de la planta que uno utiliza, por lo tanto la función del alcohol es extraer las sustancias, o las propiedades de las plantas. Este cubrirá la muestra por 1 cm de diferencia. Durante el proceso se agitará el frasco periódicamente para que el alcohol se distribuya homogéneamente en la muestra. Luego se procederá a filtrar y se concentrará en baño maría, hasta obtener un extracto fluido. Conservar refrigerado el extracto blando de “Tullma”.

37,39

### **3.3.2.3. Análisis fitoquímico**

Se determinará los componentes presentes en las hojas y flores de *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. “Tullma”.

Las reacciones para identificar los diferentes metabolitos secundarios de extracto hidroalcohólico se realizará siguiendo los procedimientos de Miranda, M. y Cuellar, A.<sup>38</sup>

#### **a) Prueba de identificación de alcaloides**

- **Ensayo de Dragendorff**

A una alícuota del extracto blando, se le añadió una gota de ácido clorhídrico concentrado (calentando suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Luego se agregó 3 gotas del reactivo de Dragendorff. Si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++).

- **Ensayo de Mayer**

Se procedió de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución acida. Se añadió una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agito y filtro. Se añadió 3 gotas de la solución reactiva de Mayer clasificando los resultados de la forma anterior (ensayo de Dragendorff).

- **Ensayo de Wagner**

Se partió al igual que en los casos anteriores de la solución acida, se añadió 2 o 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma.

**b) Prueba de identificación de azúcares reductores**

- **Ensayo de Benedict**

Se adicionó 2 mL del reactivo y se calentó en baño maria de 5 a 10 minutos. Es positiva si se observa un precipitado de color rojo.

**c) Prueba de identificación de flavonoides**

- **Ensayo de Shinoda**

Se diluyo con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se esperó 3 minutos, se añadió 1 mL de alcohol amílico, se mezcló las dos fases y se dejó reposar hasta que se separen. El ensayo se consideró positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos.

**d) Prueba de identificación de saponinas**

- **Ensayo de Espuma**

Una alícuota del extracto blando se diluyo con 1mL con agua destilada y se agitó fuertemente la mezcla durante 5 a 10 minutos. Es positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2mm y persiste por más de 2 minutos.

**e) Prueba de identificación de taninos**

- **Ensayo de Cloruro Férrico**

A una alícuota del extracto blando se añade acetato de sodio para neutralizar y 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9% en agua). Un ensayo positivo puede dar una información como el desarrollo de una coloración verde intenso, taninos del tipo pirocatecólicos o el desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirlgalotánicos.

**f) Prueba de identificación de triterpenos y esteroides**

- **Ensayo de Lieberman - Burchard**

Se disolvió en 1 mL de cloroformo, se adiciono 1mL del ácido acético y s mezclo bien, por la pared del tubo de ensayo se dejó resbalar 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene un cambio rápido de coloración. Se desarrolla de color rosado – azul muy rápido, de color verde intenso visible aunque rápido y verde oscuro – negro, final de la reacción.

#### **3.3.2.4. Evaluación de parámetros fisicoquímicos**

Una vez obtenido el extracto, se evaluará los parámetros fisicoquímicos que determina la calidad de los mismos, que a continuación se señala:

##### **a) Determinación de las características organolépticas**

Color: Se utilizará una cantidad suficiente de muestra en una luna de reloj, se coloca en un fondo blanco, para observar y determinar el color. Olor: se toma una cantidad suficiente de muestra para colocar en una luna de reloj, para percibir y determinar el tipo de olor. Aspecto: se tomará una cantidad suficiente de muestra y colocar en una luna de reloj, observándose y determinando el aspecto de la muestra.<sup>38</sup>

##### **b) Determinación de la solubilidad**

Solubilidad en agua: en un tubo de ensayo se tomará 1 mL de agua destilada, luego añadir 0,5 g de muestra, agitándose fuertemente, observar si es soluble en agua. La solubilidad en alcohol: en un tubo de ensayo se colocará 1 mL de alcohol etílico de 70°C, luego añadir 0,5 g de muestra agitándose fuertemente y observar.<sup>37, 38</sup>

##### **c) Determinación de pH**

Para determinar el pH de la muestra se utilizó el equipo de potenciómetro, colocándose una determinada cantidad de muestra en un vaso precipitado, el cual previamente es diluido para introducir el equipo, se deja reposar por unos minutos, al cabo de un minuto cual se retira el equipo y se observa en la pantalla el resultado para determinar su acidez o basicidad.<sup>37, 38</sup>

#### **3.3.3. Evaluación del efecto citostático**

##### **3.3.3.1. Enraizamiento de los bulbos de *Allium cepa* L. “cebolla”**

Se utilizaron bulbos de *Allium cepa* L. “Cebolla” de 20 a 50 gramos con características similares, adquiridas en el mercado Nery García Zárate de la ciudad de Ayacucho del departamento de Ayacucho.

Se le hizo un rasurado de las raíces secas de los bulbos de *Allium cepa* L. “cebolla”, colocando así en la parte superior en vasos de vidrio con capacidad para 100 mL con agua destilada por 24 horas; siempre y cuando manteniendo todo el sistema en oscuridad, hasta que las raíces alcancen un tamaño de 2 a 4 cm, tamaño necesario para que exista un equilibrio celular dinámico con relación al ciclo de proliferación celular, de tal manera que los diferentes periodos en que se divida el ciclo celular permanezca constante en su duración y que el número de células existentes en cada fase sea también constante.<sup>41,42</sup>

### **3.3.3.2. Dilución del extracto Fluido**

#### **a) Al 0.5 %**

En un vaso de vidrio con capacidad de 100 mL. Se agrega 99.5 mL de agua destilada con 0.5 mL de extracto blando de la muestra en estudio, obteniéndose un volumen de 100 mL.

#### **b) Al 1.0 %**

En un vaso de vidrio con capacidad de 100 mL. Se agrega 99 mL de agua destilada con 1 mL de extracto blando de la muestra en estudio, obteniéndose un volumen de 100 mL.

#### **c) Al 2.0 %**

En un vaso de vidrio con capacidad de 100 mL. Se agrega 98 mL de agua destilada con 2 mL de extracto blando de la muestra en estudio, obteniéndose un volumen de 100 mL.

#### **d) Al 4.0 %**

En un vaso de vidrio con capacidad de 100 mL. Se agrega 96 mL de agua destilada con 4 mL de extracto blando de la muestra en estudio, obteniéndose un volumen de 100 mL.

#### **e) Al 6.0 %**

En un vaso de vidrio con capacidad de 100 mL. Se agrega 94 mL de agua destilada con 6 mL de extracto blando de la muestra en estudio, obteniéndose un volumen de 100 mL.

### **3.3.3.3. Fundamento de la técnica de *Deysson modificada***

La Selección de esta técnica es debida a que los bulbos de *Allium cepa L.* “cebolla”, producen gran cantidad de raíces, cuyos meristemas apicales presentan un número elevado de células en división y es de bajo costo. Y mediante la aplicación del extracto blando de hojas y flores de *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. “Tullma” a diferentes tiempos y concentraciones se evalúa la inhibición de la división celular, como un ensayo preliminar para proponer su posible uso como antitumoral o inhibidor de la división celular.<sup>6,41,42</sup>

### **3.3.3.4. Tratamiento de las células radiculares**

Al alcanzar las raíces de los bulbos de *Allium cepa L.* “cebolla”, una longitud de 2 a 4 cm se colocaron en diferentes concentraciones a ensayar (0.5 %, 1.0 %, 2.0 %, 4.0 %, 6.0 %):

Se tomó muestra de cada concentración del extracto fluido de hojas y flores de *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. “Tullma” (por separado), para 4, 8, 12 y 24

horas, tiempo en que duro cada tratamiento, seguidamente se realizaron cortes de 1 a 2 cm de longitud de la parte apical de las diferentes raíces del bulbo de cebolla para las preparaciones citológicas, cada tratamiento con 3 repeticiones como mínimo.

Se continuó con el mismo procedimiento para las diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento.<sup>6</sup>

Uno de estas muestras de bulbo de cebolla no fue sometido a ninguna concentración del extracto blando de hojas y flores de *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. "Tullma", solo fue tratada con agua destilada, este mismo sirvió como testigo o control.<sup>6</sup>

### 3.3.3.5. Preparaciones citológicas

Una vez que notemos que las raíces obtienen un cierto tamaño en la cámara de enraizamiento se precedió a realizar cortes de 1 a 2 mm del ápice de la raíz y fueron llevadas al siguiente proceso:

- **Prefijación:** Acumula el mayor número posible de cromosomas en la mitosis del meristemo radicular de *Allium cepa* L. "cebolla", y evita la dispersión de cromosomas.<sup>6</sup>
  - Con 8-hidroxiquinoleína al 0.3 % por 60 min y luego lavar con agua destilada por tres veces.
  - Preparación: 8 - hidroxiquinoleína .....0.15 g  
Agua destilada .....500 mL.  
Calentar lentamente sin hervir.  
Tiempo de tratamiento de 1 a 4 horas a temperatura ambiente.
- **Fijación:** Mantiene la integridad estructural del citoplasma.
  - Con la solución Farmer por 30 minutos y luego lavar con agua destilada por tres veces.<sup>6</sup>
  - Preparación: Ácido acético glacial.....1 parte  
Etanol absoluto 96 %.....3 partes
- **Maceración:** Se utiliza para el ablandamiento de la cubierta de celulosa de los tejidos vegetales.
  - Con Ácido clorhídrico 1N por 15 minutos y luego lavar con agua destilada por tres veces.<sup>6</sup>
  - Preparación: Ácido clorhídrico comercial al 37 %.....9.6 mL.  
Agua destilada .....90.4 mL.

- **Ablandación:** Se utiliza para degradar la cubierta de celulosa de los tejidos vegetales.
  - Con solución Targa por 30 minutos y luego lavar con agua destilada por tres veces.<sup>6</sup>
  - Preparación:
    - Ácido acético.....45 mL.
    - Ácido láctico.....25 mL.
    - Agua destilada.....30 mL.
 Mezclar todos los ingredientes uno a uno.
  
- **Coloración:** (Técnica de Tijo y Levan), son sustancias químicas de origen natural o artificial, sirve para teñir los cromosomas y facilitar su observación.
  - Con solución de Orceína acética al 2 % por 60 minutos y luego lavar con agua destilada por tres veces.<sup>6</sup>
  - Preparación:
    - Orceína.....2 g.
    - Ácido acético.....55 mL.
    - Agua destilada.....45 mL.
 Calentar el ácido
  
- **Squash:** Una vez que los ápices de las raíces han sido teñidas se la ubica sobre un porta objeto, luego se coloca el cubre objeto; para posteriormente darle pequeños golpes mecánicos con la punta de un lápiz o borrador, con la finalidad de disgregar el ápice radical. Seguidamente se llega a ejercer presión con el pulgar sobre el cubre objeto para que los cromosomas se dispersen y al hacerse visibles se encuentren en un solo plano. Finalmente esta será sellada con un esmalte por los costados para poder tener evidenciada el trabajo.
  
- **Observación:** Realizando todo el procedimiento, la muestra preparada debe ser observado bajo un microscopio óptico donde se observaron de 200 a 800 células por muestra. Inicialmente las muestras son observadas a menor aumento 100X (10X x 10X) para verificar la presencia de metafases; luego; a mayor aumento 400X (10X x 40X) con el objeto de seleccionar las metafases mejor logradas y finalmente con el objetivo de inmersión 1000X (10X x100X) utilizando el aceite de inmersión para realizar un examen detallado de los cromosomas y para la obtención de microfotografías. Finalmente se determinó el índice mitótico e índice de fases.<sup>6</sup>

### 3.3.3.6. Determinación del índice mitótico e índice de fases

A partir del conteo de 200 células de *Allium cepa* L. “cebolla” se determinó el Índice de Fases (IF) que, llega a representar el porcentaje de células que se encuentra en cada fase, y la sumatoria de estos porcentajes sin considerar las interfaces, viene a ser lo que se denomina Índice Mitótico (IM).

- Índice de fases: se determinara dividiendo el número de las células de cada fase entre el número total de células mitóticas, multiplicado por 100.
- Índice mitótico: Se obtiene por la sumatoria de los índices de fases en división.<sup>22</sup>

Cálculo:

$$IF(\%) = \frac{N^{\circ} \text{ de células de cada fase}}{N^{\circ} \text{ total de células contadas}} \times 100$$

$$IM(\%) = IF_p + IF_m + IF_a + IF_t$$

Dónde:

IF : Índice de fases

IM : Índice mitótico

p : Profase

m : Metafase

a : Anafase

t : Telofase

### 3.4. Análisis de datos

Para el análisis de la información se elaboró una hoja de cálculo en un Software informático utilizando Microsoft office – Excel 2016, para realizar los respectivos gráficos. Los resultados se harán con tres repeticiones que posteriormente, se determinará la media y desviación estándar; la diferencia significativa existente entre los tratamientos se evaluó mediante análisis de varianza (ANOVA) con 95% de nivel de confianza y la prueba de Duncan al 0.05.<sup>43</sup> Finalmente, los resultados se presentarán como documento de Microsoft Office – Word 2016

#### **IV. RESULTADOS**

**Tabla 2.** Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y de las flores de *Ligaria cuneifolia* "Tullma" Ayacucho -2019.

Metabolitos secundarios	Ensayos con reactivos	Extrac. hojas	Extrac. flores	Característica
<b>Alcaloides</b>	Dragendorf	+++	+++	<b>Formación de precipitado</b>
	Wagner	+++	+++	
	Mayer	+++	+++	
<b>Lactonas y Cumarinas</b>	Baljet	++	+++	<b>Coloración roja</b>
<b>Flavonoides</b>	Shinoda	+	+++	<b>Coloración roja</b>
<b>Saponinas</b>	Espuma	+++	+++	<b>Espuma</b>
<b>Azúcares reductores</b>	Benedict	-	+	<b>Rojo ladrillo</b>
<b>Taninos y fenoles</b>	Cloruro férrico	+++	+++	<b>Azul intenso</b>
<b>Aminas (aminoácidos)</b>	Ninhidrina	+	++	<b>Azul violáceo</b>
<b>Cardenólidos</b>	Kedde	-	-	<b>Violeta</b>
<b>Triterpenos y esteroides</b>	Lieberman	++	+	<b>Verde oscuro - negro</b>

Leyenda:

Reacción	: Rx	Leve	: (+)
Positivo	: (+)	Moderada	: (++)
Negativo	: (-)	Fuerte	: (+++)

**Tabla 3.** Índice mitótico, según concentración y tiempo de tratamiento en el meristemo radicular de *Allium cepa* L."Cebolla", con el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Ligaria cuneifolia* "Tullma" Ayacucho -2019.

[%]	Índice mitótico							
	4 hr-H	4 hr-F	8 hr-H	8 hr-F	12 hr-H	12 hr-F	24 hr-H	24 hr-F
<b>0,5%</b>	59,2 ± 1,9*	23,8 ± 4,4*	31,8 ± 11,9*	11,7 ± 1,9*	31,5 ± 6,9*	8,5 ± 1,2*	8,5 ± 1,2*	6,0 ± 1,2*
<b>1%</b>	49,0 ± 13,1*	17,5 ± 1,2*	19,7 ± 3,8*	10,5 ± 3,7*	18,5 ± 1,2 *	7,5 ± 1,2*	7,5 ± 1,2*	5,5 ± 1,2*
<b>2%</b>	43,7 ± 5,2*	15,5 ± 3,3*	13,0 ± 2,5*	9,7 ± 1,4*	11,0 ± 2,5*	6,8 ± 1,9*	6,1 ± 0,2*	3,5 ± 1,2*
<b>4%</b>	19,7 ± 6,3*	14,7 ± 1,9*	11,0 ± 1,2	7,7 ± 1,9	7,0 ± 2,5	6,3 ± 2,6	6,7 ± 1,9*	2,4 ± 1,0*
<b>6%</b>	18,8 ± 3,1*	12,4 ± 1,0*	10,5 ± 1,2	8,3 ± 3,8	8,2 ± 1,9	6,2 ± 2,6	5,8 ± 1,9*	1,4 ± 1,0*

Leyenda:

H : Hojas  
F : Flores

## V. DISCUSIÓN

A continuación se detallan los resultados obtenidos en la presente investigación, que tuvo el objetivo de determinar la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Ligaria cuneifolia* "tullma". La extracción hidroalcohólica y extracto fluido de las hojas y flores de *Ligaria cuneifolia* se realizó, según Villar del Fresno<sup>37</sup>, donde se partió de una muestra de 201g de hojas y 56,65g de flores, obteniéndose 242 mL de extracto fluido en hojas y 64 mL en flores, a partir del cual, se realizaron las preparaciones de las diversas concentraciones para ser ensayadas, pero antes de realizar los estudios, se realizaron algunos ensayos fisicoquímicos a este extracto, siendo estos: en hojas pH 5,27, aspecto homogéneo, coloración verde oscuro, olor sui generis, sabor amargo, soluble en agua y etanol; mientras que en flores fue a un pH 4,80; de coloración naranja rojizo, aspecto homogéneo, olor sui generis, sabor amargo, soluble en agua y etanol; estos resultados podrían explicarse por las diferentes condiciones de crecimiento de la planta, los factores ambientales, el estado de maduración y técnicas de procesamiento en la extracción de los metabolitos secundarios. Al respecto, mencionamos que no existen datos similares para ser comparados con nuestros resultados obtenidos.

La identificación fitoquímica se realizó siguiendo la metodología de Miranda<sup>38</sup>, los resultados de los ensayos realizados se presentan en la tabla 2, donde se aprecia la presencia de alcaloides, lactonas, cumarinas, flavonoides, saponina, azúcares reductores, tanino, fenoles, aminoácidos, triterpenos y esteroides en hojas y flores, pero cabe resaltar que la presencia de estos metabolitos fueron más notorios en flores a diferencia de las hojas como se muestra en el anexo 5 y 6.

Al respecto, en el trabajo presentado por Pillaca<sup>47</sup> quien realizó la identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Ligaria cuneifolia* "Tullma", evidenció la presencia de flavonoides, alcaloides, aminoácidos,

lactonas, cumarinas, taninos y fenoles. Así mismo, Varela et al<sup>10</sup> realizó estudios sobre *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. “muérdago criollo”, reportando que la especie vegetal contiene abundante cantidad de flavonoides independientemente del hospedante y del lugar geográfico, el cual revela la presencia de quercetina como el único flavonol, además de otros metabolitos como antocianinas, catequinas, lectinas, alcaloides y proteínas.

Por otra parte, Kolling et al<sup>48</sup>, reporta en sus estudios fitoquímicos de *Ligaria cuneifolia* y *Jodina rhombifolia*, determinando que la *Ligaria cuneifolia* es una planta rica en saponinas, taninos, resinas, cera, ácidos orgánicos, oxidasas en su contenido fitoquímico.

De la misma manera, Ricco et al<sup>15</sup>, en su estudio presentado, cuantifica los polifenoles extraídos de la *Ligaria cuneifolia*; para ello, determinó con ensayos cromatográficos monodimensional y bidimensional, determinando la presencia de flavonoides, hidroxicinámicos y proantocianidinas en los extractos de hojas, tallos primarios, tallos secundarios y flores; en cuanto al análisis cuantitativo se observaron altos valores de flavonoides en hojas 2,14 mg.eq de rutina por gramo de material seco y de proantocianidinas en flores 7,52 mg.eq de catequina por gramo de material seco.

Al respecto, señalamos que los resultados alcanzados en nuestro trabajo de investigación, coinciden perfectamente con lo reportado por los otros investigadores antes señalados, pues se confirma la presencia de los metabolitos como esteroides, flavonoides, catequinas, cumarinas, alcaloides, además de quercetina, resinas, hidroxicinámicos, proantocianidinas reportados por Varela, Kolling y Ricco respectivamente.

La evaluación citostática y el índice mitótico del extracto de *Ligaria cuneifolia* “tullma” se realizó siguiendo la metodología de Rengifo<sup>6</sup>, utilizando meristemas radiculares de *Allium cepa* L.”Cebolla” a diferentes concentraciones ( 0.5%, 1%, 2%, 4% y 6%) y tiempo de tratamiento ( 4, 8, 12 y 24 horas), los resultados ensayados se muestran en la tabla 3, donde se aprecia que el índice mitótico de las hojas al 0.5% dentro de las 4 horas, tienden a presentar un IM de 59,2% y en flores 23,8 %, y respecto al tiempo, en cuanto a los resultados que revelan las hojas, tenemos que a las 4 horas al 6% obtiene un IM de 18,8% y a las 24 horas un IM de 5,8%; de igual manera sucede con los datos que brindan las flores, siendo estos resultados estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ). Para ello se procedió a realizar las comparaciones múltiples (prueba de Duncan), para

determinar con precisión cómo es cada media del índice mitótico respecto a los demás. La prueba de Duncan en el caso de hojas y flores de *Ligaria cuneifolia* “tullma” como se muestra en el anexo 10 y 11, demuestra diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), por lo tanto interpretamos de la siguiente manera, cuando el p-valor es menor a 0,05 se rechaza la  $H_0$  (cuando las dos medias son estadísticamente similares) y se acepta la  $H_a$  (cuando las dos medias es estadísticamente diferente), por lo tanto según nuestros datos se rechaza la  $H_0$  y se acepta  $H_a$ . Así mismo, se determinó mediante los ensayos que las flores muestran una mejor actividad antimitótica frente al extracto de hojas de *Ligaria cuneifolia*, pero que ambos fueron capaces de producir inhibición en el crecimiento de las células. Respecto a este trabajo de investigación, los resultado se contrastan con los estudios realizados por Rengifo<sup>6</sup> quien evaluó el efecto citostático del latex de *Euphorbia peplus* L.f “leche leche” y *Ficus carica* L. “higo” en el meristemo radicular de *Allium cepa* L. “cebolla” el cual también reportó que a mayor concentración menor índice mitótico y a mayor tiempo de tratamiento menor índice mitótico, por lo tanto mis resultados son similares a los resultados reportados por este autor, lo quiere decir que a mayores concentraciones y tiempo de tratamiento del extracto, tiende a disminuir la división celular, debido a que el extracto contiene metabolitos que causan o generan apoptosis celular.

Por otro lado, en el trabajo presentado por Sosa<sup>25</sup>, quien realizó estudios fitoquímicos para el control de hongos fitopatógenos, afirma que los principales componentes responsables de las propiedades antibacterianas, antifúngicas y antitumorales son los alcaloides, flavonoides y los derivados del ácido benzoico y cafeico. Así mismo, Ferrero y col<sup>49</sup> confirmaron en el “muérdago criollo” (*Ligaria cuneifolia* Thiegh.) la presencia de constituyentes macromoleculares con acción citotóxica sobre las células tumorales; uno de los constituyentes más estudiados es una glucoproteína, la lectina MLI, que tiene un efecto inhibitorio sobre la síntesis ribosomal de proteínas en las células eucariotas.

Por otra parte, Varela et al<sup>10</sup>, reporta mediante la revista *Ligaria cuneifolia* “muérdago criollo” desde el uso popular hacia el estudio de los efectos farmacológicos, determinando que la acción citostática e inmunomoduladora que presenta el extracto de *Ligaria cuneifolia* en las zonas Europeas, han sido muy populares durante las últimas décadas como agentes coadyuvantes en el tratamiento del cáncer; ya que según este trabajo de investigación se sabe que

los agentes o componentes activos contra el tumor han sido identificados como lectinas, viscotoxinas, proteínas, péptidos, oligosacáridos, alcaloides, compuestos polifenólicos y flavonoides.

De la misma manera, Carlos et al<sup>13,14</sup> evaluó la actividad anticancerígena de la *Ligaria cuneifolia* (Liga-liga), donde el extracto de la planta (0-100 mg/mL) fueron incubados en líneas celulares correspondientes a cáncer de colon (HCT-116), cáncer de mama (MDA-MB-231), cáncer de próstata (PC-3), cáncer de hígado (Hep- G2), cáncer de piel (A-375) y cáncer de ovario (OVCAR-3). El contenido total de polifenoles demostró una significativa cantidad de compuestos bioactivos, así mismo, la *Ligaria cuneifolia* presentó una actividad dependiente de la concentración en todas las líneas celulares cancerosas, lo cual el extracto mostró mayor actividad anticancerígena contra: las líneas celulares de cáncer de colon y cáncer de ovario.

Al respecto, por lo anteriormente mencionado señalamos que los resultados alcanzados en nuestro trabajo de investigación, coinciden perfectamente con lo reportado por los otros investigadores antes señalados, pues se confirma que la especie vegetal (*Ligaria cuneifolia*), posee actividad antimitótica por la presencia de metabolitos secundarios reportados por Sosa, Ferrero, Varela y Carlos, lo cual demuestra su potencial aplicación futura para el tratamiento de diversos malestares y enfermedades.

Esta publicación abre las puertas para un estudio más detallado sobre esta planta y otras plantas Peruanas para poder corroborar con base científica sus aplicaciones en medicina tradicional y correlacionarlo con posibles aplicaciones farmacológicas.

El presente trabajo de investigación demostró la inhibición de células meristemáticas en *Allium cepa* L. "cebolla", utilizando el extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Ligaria cuneifolia* "Tullma", donde se puede apreciar la disminución del índice mitótico aplicado al crecimiento celular.

Diversos autores han llevado a cabo estudios sobre índice mitótico siguiendo diferentes propósitos y utilizando distintas especies, entre ellos Gratti y col., evaluaron la toxicidad del extracto acuoso de la especies patogónicas del género *Euphorbia*, sobre el ciclo celular mediante el test de *Allium cepa* L. "cebolla", todos los extractos ensayados produjeron un efecto inhibitor sobre el crecimiento de las raíces; a nivel microscópico, se registró disminución del índice mitótico de las células del meristemo radicular de la "cebolla" con acumulación

de profases, se considera que este efecto fue más citostático que citotóxico dado que fue revertido al colocar los ápices al agua. Similares resultados han sido obtenidos por Retuerto<sup>42</sup>, quien trabajó con los extractos acuosos y etanólico de *Tropaeolum tuberosum* "mashua", que tiene actividad insecticida, nematicida y antitumoral, encontrando un descenso del índice mitótico con ambos extractos. Así mismo, Otárola, trabajó con los extractos acuosos al 1% y 10% de *Piper elongatum* Trel. "matico" que tiene actividad antimitótica y citotóxica, encontrando también un descenso en el índice mitótico con más evidencia al 10%. Por otro lado, Shehab, trabajó con *Allium cepa* L. "cebolla" y *Vicia faba* con el extracto acuoso de *Allium sativum* "ajo" demostrando que el ajo posee actividad antifúngica y nematicida, indicando también un descenso en el índice mitótico.

Finalmente, podemos concluir que el extracto hidroalcohólico de las hojas y de las flores *Ligaria cuneifolia* "tullma" posee actividad antimitótica, dentro de la población meristemática radicular de *Allium cepa* L. "cebolla".

## VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas y de las flores de la planta *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. "Tullma", presentan actividad antimitótica en el meristemo radicular de los bulbos de *Allium cepa* L. "cebolla".
2. Los parámetros fisicoquímicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. "Tullma", fueron: coloración verde oscuro, olor sui géneris, sabor amargo, aspecto homogéneo, pH 5,27, soluble en agua y etanol, mientras que en las flores fueron: coloración naranja rojizo, olor sui géneris, sabor amargo, aspecto homogéneo, pH 4,80, soluble en agua y etanol.
3. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. "Tullma", presenta alcaloides, flavonoides, esteroides, taninos, fenoles, saponinas, aminoácidos, lactonas y cumarinas; mientras que las flores presenta alcaloides, lactonas y cumarinas, flavonoides, saponinas, azúcares reductores, taninos, fenoles, aminoácidos, triterpenos como metabolito secundarios.
4. El extracto hidroalcohólico de las flores de *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. "Tullma" a una concentración de 1%, presentó un mejor actividad citostática que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ligaria cuneifolia*, ya que este tiende a tener un mejor efecto citostático a una concentración de 4%, sobre el meristemo radicular de los bulbos de *Allium cepa* L. "cebolla".
5. El extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de la planta *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. "Tullma", obtuvo la disminución del índice mitótico en función a las 5 concentraciones administradas (0.5%, 1%, 2%, 4% y 6%) y tiempo de tratamiento (4, 8, 12 y 24 horas), dentro de la población meristemática de la raíz de *Allium cepa* L. "cebolla".

## VII. RECOMENDACIONES

1. Incentivar el estudio de plantas medicinales, cuyos resultados deben ser publicados a través de los medios de comunicación como una alternativa en la atención primaria de salud por su bajo costo.
2. Realizar otros estudios científicos que confirmen las diversas propiedades medicinales atribuidas a *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. "Tullma", de acuerdo con los estudios etnobotánicos.
3. Realizar estudios farmacológicos de a *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. "Tullma", a fin de profundizar el estudio orientado al tratamiento terapéutico por tratarse de un producto de nuestra zona y de gran importancia en la actualidad, por sus alto beneficios para la salud.
4. Evaluar el efecto antimotórico de a *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. "Tullma", para determinar la DL50, y así conocer la dosis ideal del extracto.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castellanos G. Uso de las plantas medicinales en la Ranchería Centro Tular, 1<sup>a</sup> Sección del Municipio de Comalcalco, Tabasco [Tesis]. Tabasco: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; 2008.
2. Dovale C, Rosell W. Elementos básicos de Medicina Bioenergética para estudiantes de Ciencias Médicas. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2002.
3. Hernández G. Contribución para el uso y manejo de las plantas medicinales de la Villa Tepetitán Macuspana, Tabasco [Tesis]. Tabasco: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; 2006.
4. Ministerio de Salud Pública de Cuba. Programa Nacional para el desarrollo y la generalización de Medicina Tradicional y Natural. La Habana (Cuba); 1999. Disponible en:  
<http://aps.sld.cu/bvs/materiales/programa/otros/progmtrd.pdf>.
5. Organización Mundial de la Salud Tradicional. Complementary and alternative medicines and therapies. Washington DC. Regional de la OMS para Las Américas. OPS (Grupo de Trabajo OPS/ OMS); 2009.
6. Arturo R. Efecto citostático del látex de *Euphorbia peplus L.* y *Ficus carica L.* en el meristemo radicular de *Allium cepa L.* "cebolla". [Tesis]. Ayacucho: Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga; 2006.
7. Fiskesjo G. The *Allium cepa L.* Test in wastewater monitoring. *Environmental Toxicology and Water Quality*. 8: 291 – 298. 1999.
8. Guimaraes A. Aspectos etnobotánicas y químicos de las familias Loranthaceae y Viscaceae: Potencialidades terapéuticas dadas en Hierbas parásitas dirigido por la fundación del Centro de control de oncología del Amazonas. Calle san Francisco Orellana N°215 URL. [Consulta 4 de abril 2019]. Disponible en:  
[http://www.revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revistafitos/article/viewFile/39/pdf\\_31](http://www.revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revistafitos/article/viewFile/39/pdf_31)
9. Planas S. Caracterización antitumoral de plantas medicinales peruanas. Actas de las sesiones de avances de investigación. CONCYTEC y ANCYT. Tomo 5, 2008. Lima –Perú.
10. Varela G, Et al. Muérdago criollo *Ligaria cuneifolia* (R. Et P.) Tiegh. Loranthaceae desde el uso popular hacia el estudio de los efectos farmacológicos. *An farmacology [Revista científica]*. Buenos Aires, república de Argentina. 2010 [Consulta 4 de Abril]. Disponible en:  
[https://www.researchgate.net/publication/235790584\\_El\\_muérdago\\_criollo\\_Ligaria\\_cuneifolia\\_R\\_P\\_Tiegh\\_Loranthaceae\\_Desde\\_el\\_uso\\_popular\\_hacia\\_el\\_estudio\\_de\\_los\\_efectos\\_farmacologicos](https://www.researchgate.net/publication/235790584_El_muérdago_criollo_Ligaria_cuneifolia_R_P_Tiegh_Loranthaceae_Desde_el_uso_popular_hacia_el_estudio_de_los_efectos_farmacologicos)
11. Hostanska K, Et al. La lectina de plantas derivada de *Viscum álbum* induce la expresión de genes de citoquinas y la producción de proteínas en cultivos de células no nucleares de sangre periférica humana. *Inmunidad natural*; 2009.14: 295-304
12. Gabius S, Joshi S. La lectina específica de galactósido del muérdago como modificador de respuesta biológica. *Revista Internacional de Oncología* (2000) 1: 705-708.
13. Arenas C, Vera C. Identificación de polifenoles individuales y evaluación de la actividad anticancerígena de la *Ligaria cuneifolia* (Liga-liga). [Revista científica]. Perú - Agosto 2011 Editorial ECIPERÚ, [Consulta 4 de Abril]. Disponible en:  
<https://revistaeciperu.com/wpcontent/uploads/2019/01/20110038.pdf?fbclid=IwAR28Ocsuei6M3yKnXHpfkyDyE3grzbHCbghi4ZiM5qs2yhQbIKaPNsvioBo>

14. Arenas C. Evaluación de la capacidad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica del extracto metanólico de *Ligaria cuneifolia* (liga liga) *Veritas* (2008).10 (1): 104- 112.
15. María V. Ricco, Et al. Análisis de polifenoles e iniciación de cultivos in vitro de *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh (Loranthaceae) de ejemplares provenientes de la localidad La Población, provincia de Córdoba. Argentina. *Dominguezia* vol.34 (2018)
16. Instituto Nacional de Cáncer. Actividad antimetabólica atlas [Internet]. National Cancer Institute; c2012 [citado el 22 de julio del 2019]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/español/publicaciones/diccionario/def/antimetabolico.com>.
17. Avers Ch. *Biología Celular*. 2da edición. México. Editorial Iberoamericana. (1984).
18. Alberts B, Et al. *Biología Molecular de la célula*. 5ta edición. Barcelona. España. Edit. Omega S.A. (2006).
19. Lodish H, Et al. *Biología Celular y Molecular*. 6ta. Ed. Edit. Médica Panamericana S.A. Madrid. (2008).
20. Sánchez Javier, Trejo Nayeli. *Biología celular y Molecular*. 1ra edición Colombia editorial Alfil – (2009).
21. Sheeler P. *Biología celular. Estructura, Bioquímica y Función*. Ed. LIMUSA. México. (1993).
22. Talledo D, Zambrano S. Ciclo celular y número cromosómico de *Tropaeolum tuberosum*, “mashua”. Tesis URP. Fac. Cs. Apartado. 138 Lima. 1995.
23. Karp Gerald, *Biología Celular y Molecular conceptos y experimentos*. 5ta edición. Universidad de Florida - EE.UU. Editorial Mc Graw Hill. (2009).
24. Hidroalcohólico para estudios tropicales, pag.28 Costa Rica [Internet] Fundesyran; 2013 [fecha de acceso 4 de Abril de 2019]. Disponible en: <http://www.fundesyr.com/biblioteca.php?id=323>
25. Giménez M. Cell division in the higher plants. In Rost T. (Ed): *Mechanism and control of cell vision*. (1997). Pennsylvania, pp 261-307
26. Sato S. Electron microscopy on mitotic and chromosomal aberrations induced by colchicine mercaptoethanol and nitrogen mustard. (1970). *Cytology*. 35: 415-422.
27. Lock S. *Investigación Fitoquímica*. Pontificia Universidad La Católica del Perú. (2009). Lima.
28. Muños L. *Plantas Medicinales Aromáticas. Estudio, Cultivo y procesado*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. (2005).
29. Wagner ML, *Estudios Fitoquímicos comparativos de los flavonoides de Loranthaceae de la flora Argentina. Relación con el Muérdago Europeo*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires 1993.
30. Kuklinski C. *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Ediciones Omega. (2000) España. pp.130.
31. Bruneton J. *Farmacognosia, Fitoquímica y Plantas Medicinales*. 2da edición editorial Acribia. Zaragoza – España (2001).
32. Dobrecky C, Et al. Contenido de polifenoles en “Contenido de polifenoles en *Ligaria cuneifolia* y su relación con la capacidad antioxidante”. *Dominguezia* 30 (2): 35-39., (2014).
33. Martínez A. Sesquiterpenlactonas [revista en internet] 2003. [acceso 06 de Abril de 2015]. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/slactonas2001.pdf>.
34. Abbiatti D. Las Lorantáceas Argentinas. *Revista del Museo de La Plata (nueva serie)* 7 (sección botánica): 1-110. (1946).

35. Becker H. Botánica de Europa Mistle (*Viscum álbum* L.) Oncología 2009. 43 (supl.1): pg. 2-7.
36. Luther P, Becker H. Parasitische Phase. Die Mistel: Botanik, Lektine, Medizinische Anwendung. 2001.
37. Villar del Fresno A. Farmacognosia General. Madrid- España; Editorial síntesis S.A; 1999. [Monografía en Línea]. [Acceso, 1 de Agosto del 2019]. Disponible en URL: <https://www.lineasalud.com/que-es/maceracion>.
38. Miranda M. Métodos de Análisis de Drogas y Extractos. Universidad de la Habana. Cuba. (1996).
39. Quirós P, Albertin A y Blázquez S. Elaboración de extractos 2008.
40. Tenorio M. Biología. Edit. DISUM E.I.R.L. Ayacucho – Perú.2011.
41. Retuerto P, La Torre J. Índice mitótico y de las fases en el meristemo radicular de *Allium porum* L. “poro” Tesis UNMSM. Facultad de Ciencias Biológicas. Lima. (1995).
42. Retuerto F, Barreto T. Efectos citostáticos del extracto etanólico de *Lepidium meyenii* W. en las células meristemáticas de *Allium cepa* L. “cebolla” Tesis UNMSM. Facultad de Ciencias Biológicas. Lima. (1996).
43. Pérez C. Temas Estadísticos con SPSS 11. Edit. Acribia S.A. Zaragoza-España. (2001).
44. Actividad Antimitótica URL [http:// www.iqp.es/cbasicas/farma.html](http://www.iqp.es/cbasicas/farma.html).
45. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance” (1998). nutrition Reviews 56(11):317-333.
46. Evans W. Farmacognosia. 4a edición. México: Editorial Interamericana McGraw Hill.; 1991.
47. Karol P. Efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las flores y hojas de *Ligaria cuneifolia* “tullma”, Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho – Perú. Pág. 20. 2008.
48. Kolling A. et al. Estudios microbiológicos y de cuantitativos de extractos de *ligaria cuneifolia* y *Jodina rhombifolia*. 2010.
49. Ferrero et al. Fracción metanólica de *Ligaria cuneifolia* “muérdago criollo”: efecto sobre parámetros hemorreológicos y secreción biliar. Dominguezia 22 (1): 27-33, (2006).

## **ANEXOS**

**Anexo 1.** Fotografía de las muestras de *Ligaria cuneifolia* “tullma” en hospederos de níspero de la localidad de Huamanguilla, Ayacucho 2019.



**Anexo 2.** Constancia de identificación botánica de *Ligaria cuneifolia* "tullma".  
Ayacucho - 2019.

## CONSTANCIA

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

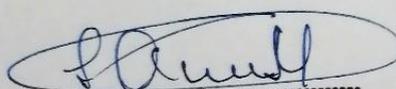
Que, el **Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fito medicamentos**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de Investigación.

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	:	SANTALALES
FAMILIA	:	LORANTHACEAE
GENERO	:	Ligaria
ESPECIE	:	<i>Ligaria cuneifolia</i> (R. & P.) Tiegh.
N.V.	:	"tullma"

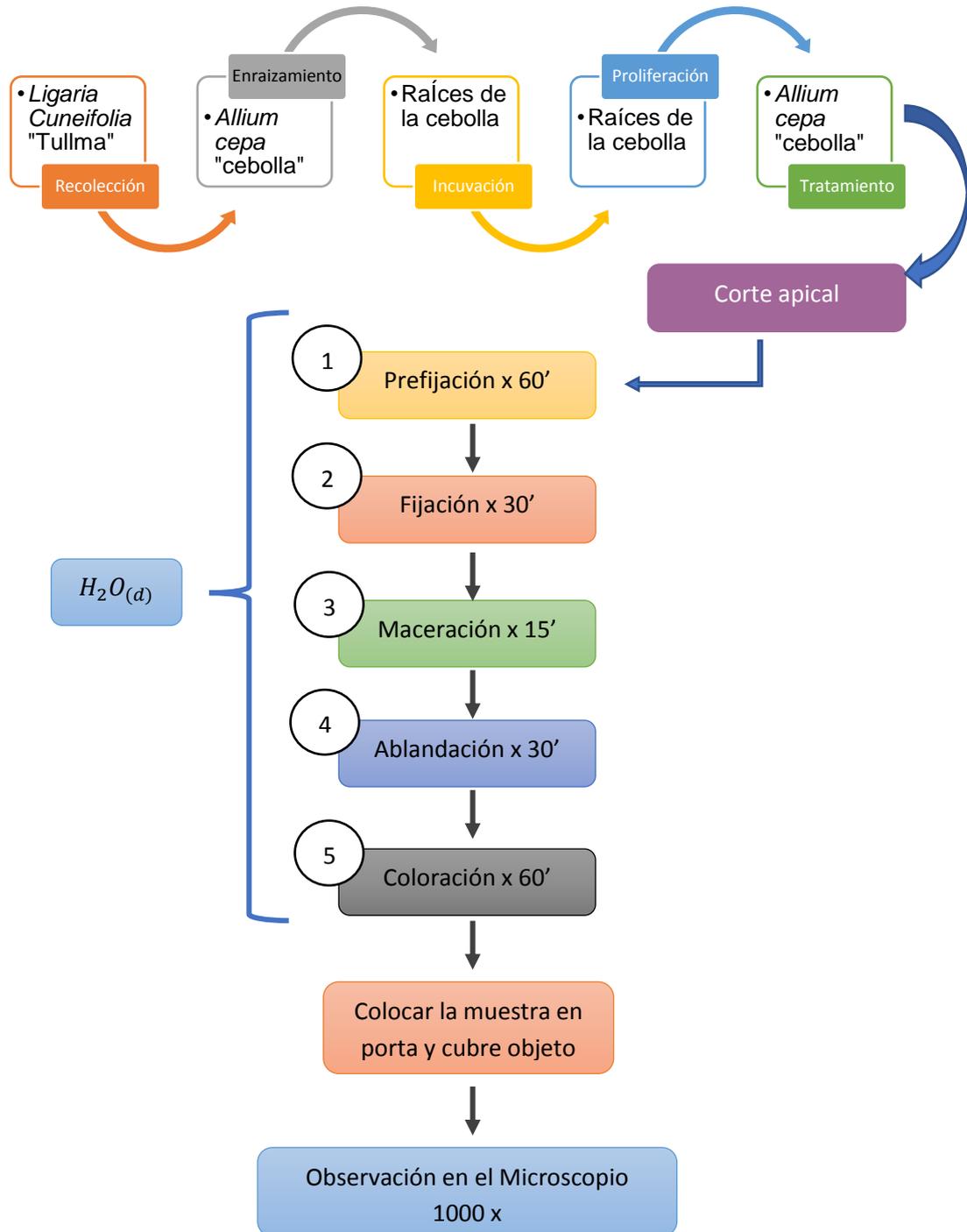
Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 11 de Abril del 2019



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

**Anexo 3.** Flujograma del procedimiento experimental. Ayacucho 2019.



**Anexo 4.** Extracción hidroalcohólico y extracto blando de *Ligaria cuneifolia* "tullma". Ayacucho 2019.



**A**



**B**



**C**



**D**



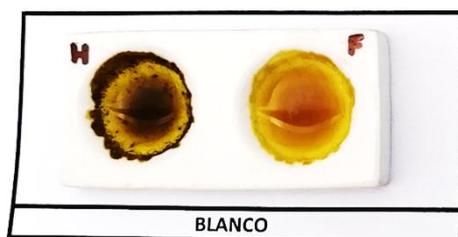
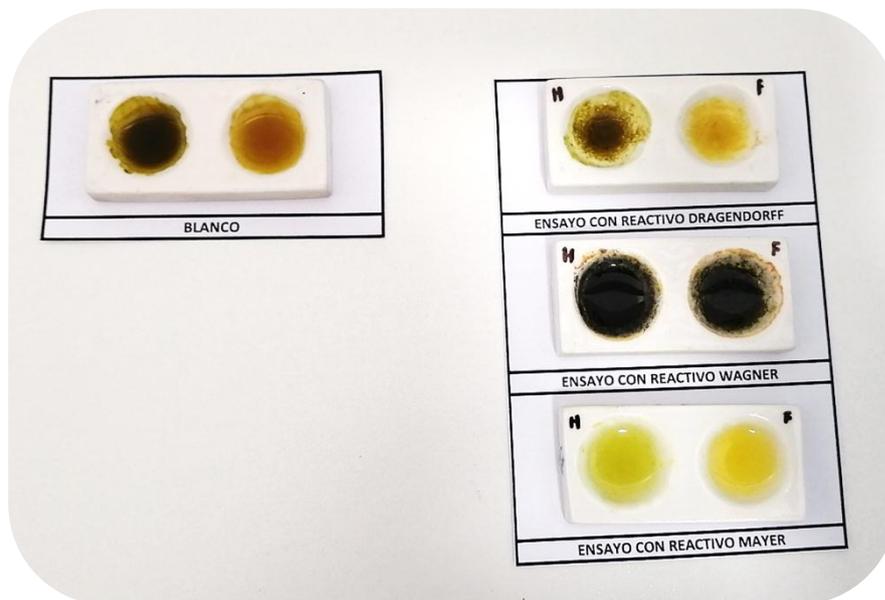
**E**



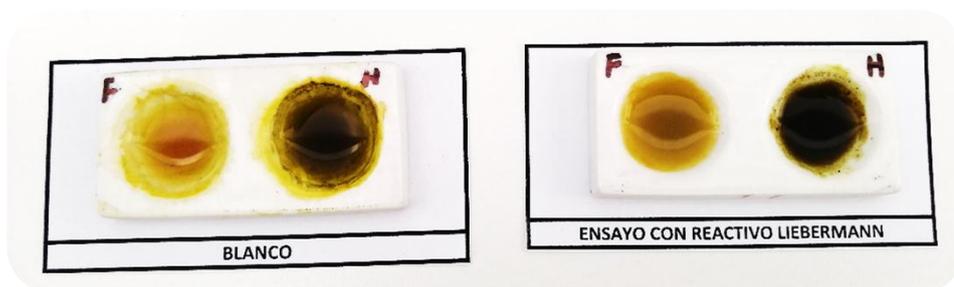
**F**

**A.** Seleccionar hojas y flores de la muestra seca; **B.** Molienda y peso; **C.** extracto hidroalcohólico; **D.** filtración; **E.** Obtención de extracto fluido en baño maría; **F.** Extracto fluido de hojas y flores.

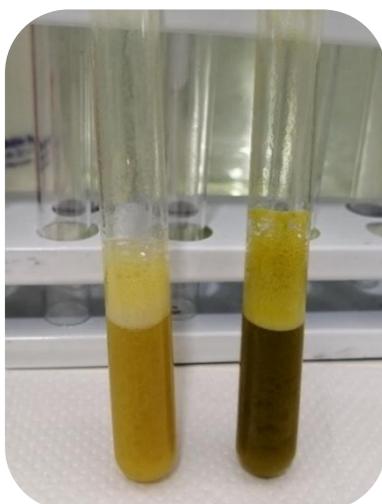
**Anexo 5.** Reconocimiento de los principales metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas y de las flores de *Ligaria cuneifolia* "tullma". Ayacucho 2019.



**Anexo 6.** Reconocimiento de los principales metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas y de las flores de *Ligaria cuneifolia* "tullma". Ayacucho 2019.



### ENSAYO DE ESPUMA



**Anexo 7.** Enraizamiento de los bulbos de *Allium cepa* L. “cebolla” y administración del extracto blando de *Ligaria cuneifolia* “tullma”. Ayacucho – 2019.



**A**



**B**



**C**



**D**



**E**

**A.** Acondicionamiento de la cámara de enraizamiento; **B.** Colocación de ápices de cebolla en la cámara; **C.** Preparación a diferentes concentraciones del extracto fluido; **D.** Extracto blando de *Ligaria cuneifolia* a diferentes concentraciones; **E.** Administración del extracto fluido a diferentes concentraciones.

**Anexo 8.** Preparación citológica según la técnica de Deysson modificado.  
Ayacucho – 2019.



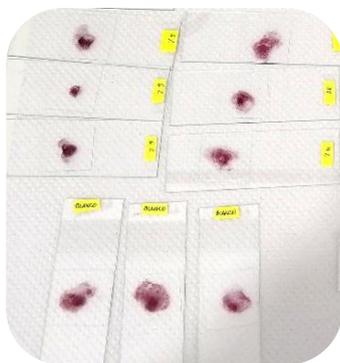
**A**



**B**



**C**



**D**



**E**

**A.** Preparación de reactivos; **B.** Técnica de Deysson Modificada; **C.** Ápices de cebolla en tubos de eppendorf; **D.** Muestras selladas en láminas de cobre y porta objeto; **E.** Observación de las muestras.

**Anexo 9.** Fases de la mitosis celular. Ayacucho – 2019.

---

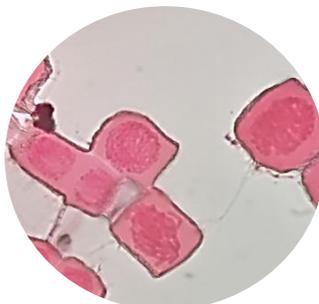
**FASES DE LA MITOSIS**

---

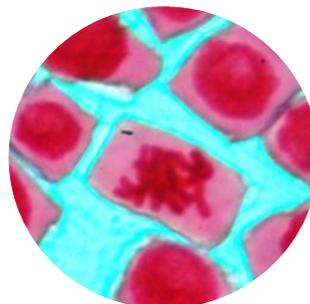
**INTERFASE**



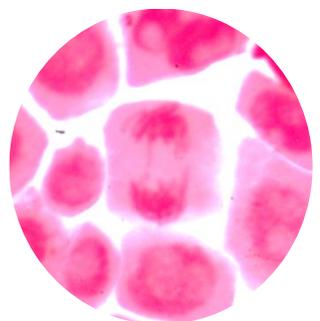
**PROFASE**



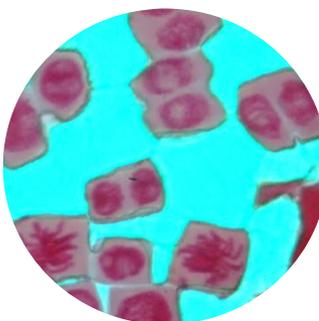
**METAFASE**



**ANAFASE**



**TELOFASE**



**TELOFASE FINAL**



**Anexo 10.** Comparaciones múltiples según el test de DUNCAN de los promedios del índice mitótico de las hojas. Ayacucho – 2019.

Tratamiento-4 horas	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
6%	3	18,8				
4%	3	19,7				
2%	3		43,7			
1%	3			49,0		
0,5%	3				59,2	
Blanco	3					74,8
Sig.		0,7	1,0	1,0	1,0	1,0

Tratamiento-8 horas	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	0
6%	3	10,5				
4%	3	11,0				
2%	3	13,0				
1%	3		19,7			
0,5%	3			31,8		
Blanco	3				74,8	
Sig.		0,3	1,0	1,0	1,0	0,0

Tratamiento-12horas	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
4%	3	7,0				
6%	3	8,2	8,2			
2%	3		11,0			
1%	3			18,5		
0,5%	3				31,5	
Blanco	3					74,8
Sig.		0,5	0,1	1,0	1,0	1,0

Tratamiento-24 horas	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	0	0	0
6%	3	5,8				
2%	3	6,1				
4%	3	6,7				
1%	3	7,5				
0,5%	3	8,5				
Blanco	3		74,8			
Sig.		0,1	1,0	0,0	0,0	0,0

**Anexo 11.** Comparaciones múltiples según el test de DUNCAN de los promedios del índice mitótico de las flores. Ayacucho – 2019.

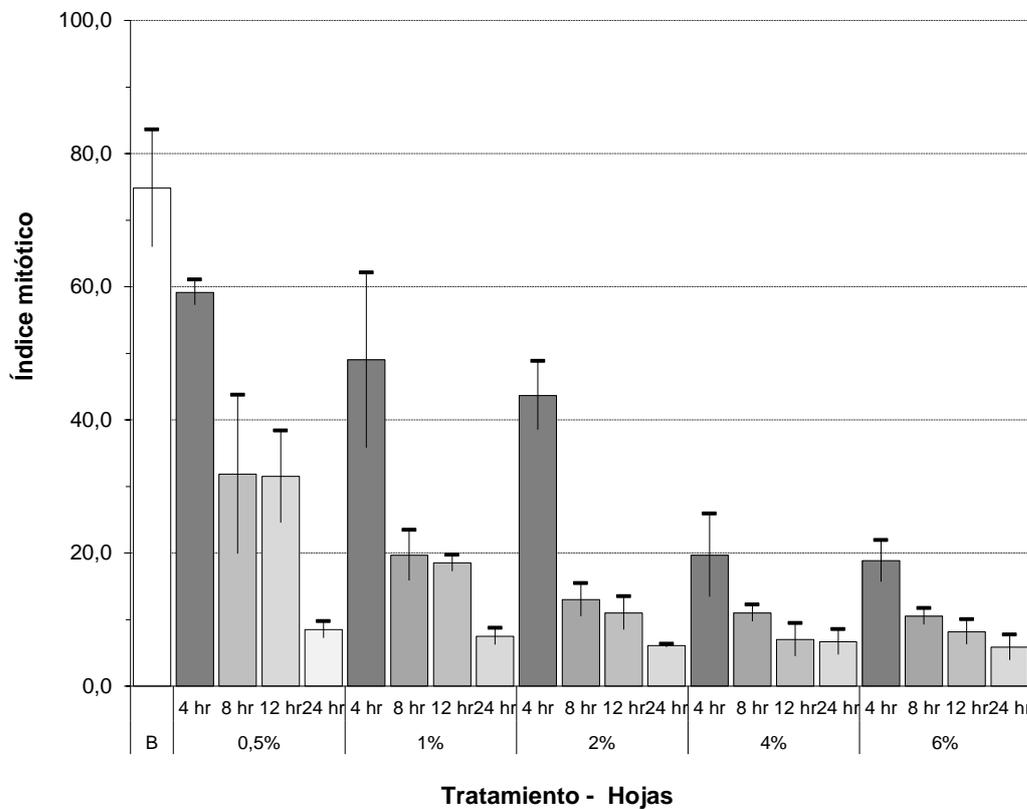
Tratamiento - 4 horas	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	0
6%	3	12,4				
4%	3	14,7	14,7			
2%	3	15,5	15,5			
1%	3		17,5			
0,5%	3			23,8		
Blanco	3				74,8	
Sig.		0,1	0,1	1,0	1,0	0,0

Tratamiento - 8 horas	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	0	0
4%	3	7,7				
6%	3	8,3	8,3			
2%	3	9,7	9,7			
1%	3	10,5	10,5			
0,5%	3		11,7			
Blanco	3			74,8		
Sig.		0,1	0,1	1,0	0,0	0,0

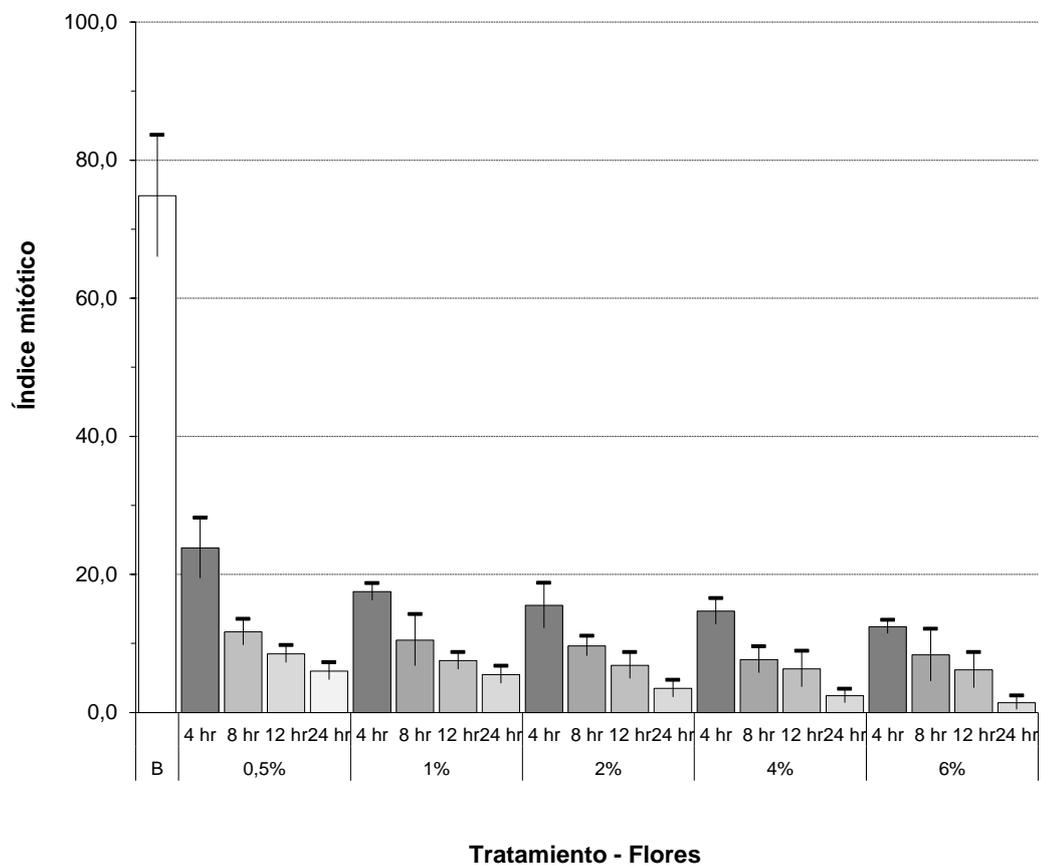
Tratamiento - 12 horas	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	0	0	0
6%	3	6,2				
4%	3	6,3				
2%	3	6,8				
1%	3	7,5				
0,5%	3	8,5				
Blanco	3		74,8			
Sig.		0,1	1,0	0,0	0,0	0,0

Tratamiento - 24 horas	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	0	0
6%	3	1,4				
4%	3	2,4				
2%	3	3,5	3,5			
1%	3		5,5			
0,5%	3		6,0			
Blanco	3			74,8		
Sig.		0,1	0,1	1,0	0,0	0,0

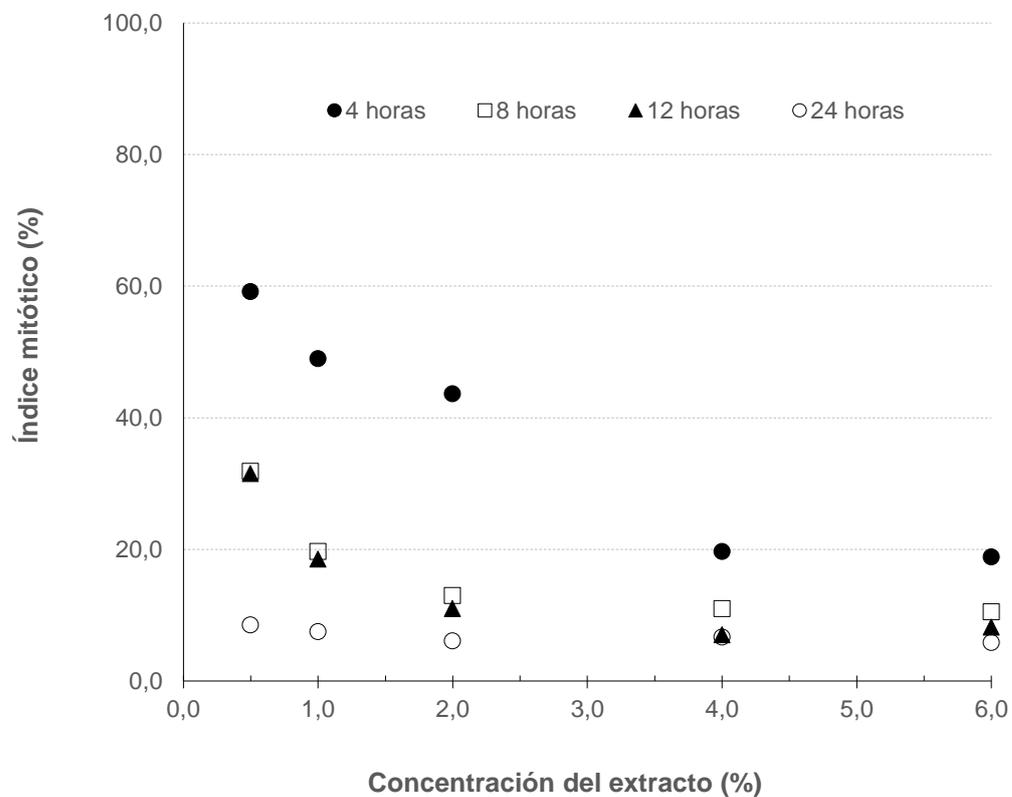
**Anexo 12.** Índice mitótico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "Tullma", en el meristemo radicular de *Allium cepa* L."Cebolla", según concentración y tiempo de tratamiento frente al blanco. Ayacucho -2019.



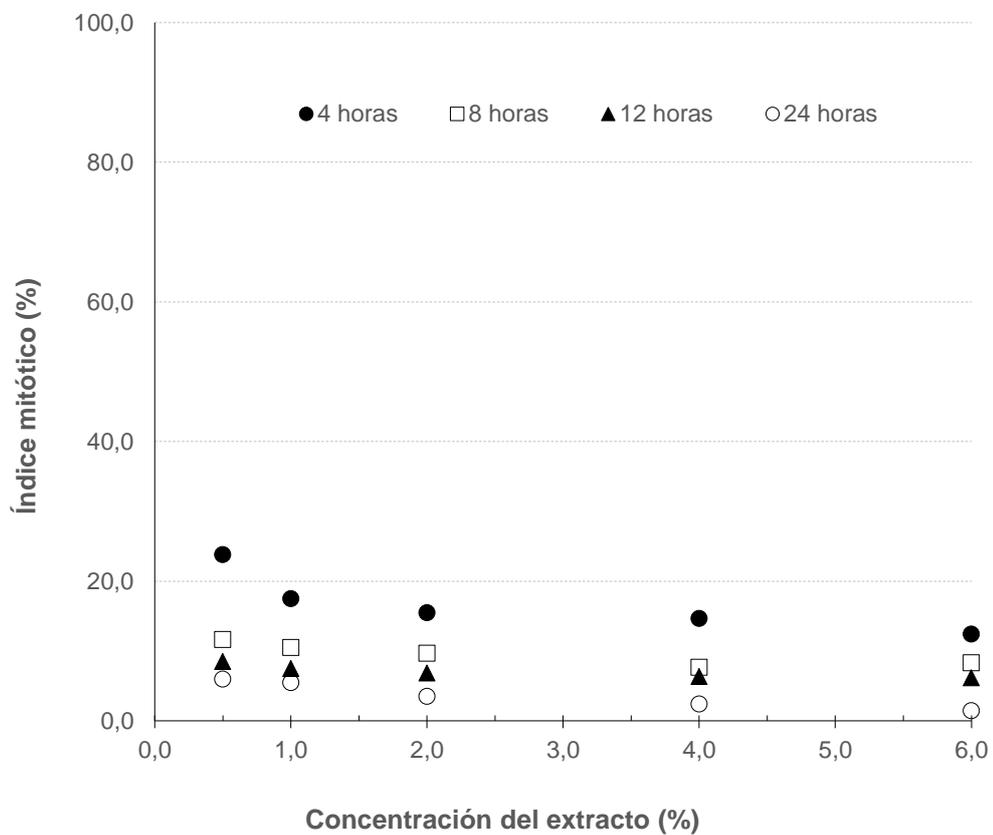
**Anexo 13.** Índice mitótico del extracto hidroalcohólico de las flores de *Ligaria cuneifolia* "Tullma", en el meristemo radicular de *Allium cepa* L."Cebolla", según concentración y tiempo de tratamiento frente al blanco. Ayacucho -2019.



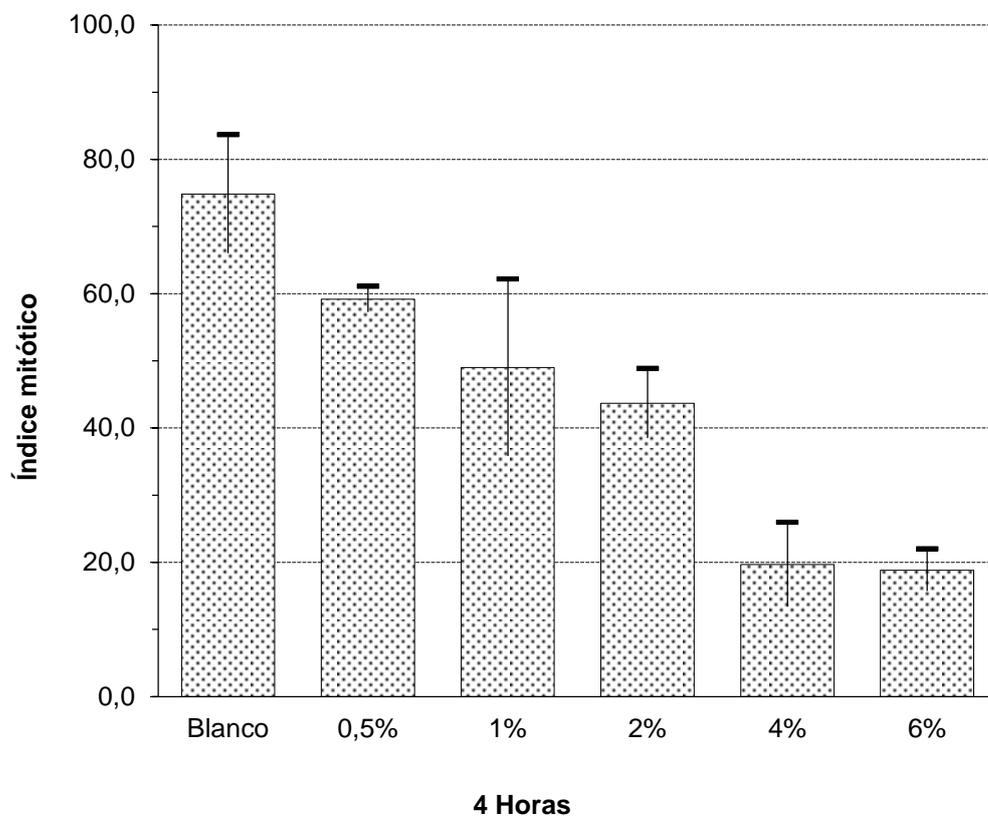
**Anexo 14.** Variación del índice mitótico del efecto antimitótico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "Tullma", en el meristemo radicular de *Allium cepa* L."Cebolla", según tiempo de tratamiento y concentración. Ayacucho -2019.



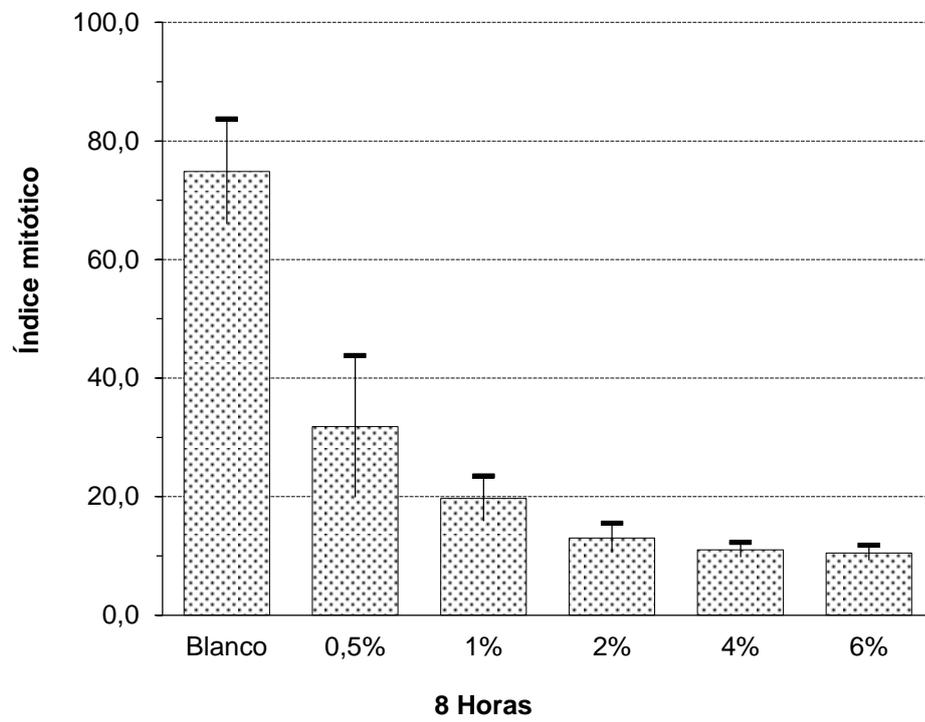
**Anexo 15.** Variación del índice mitótico del efecto antimitótico del extracto hidroalcohólico de las flores de *Ligaria cuneifolia* "Tullma", en el meristemo radicular de *Allium cepa* L."Cebolla", según tiempo de tratamiento y concentración. Ayacucho -2019.



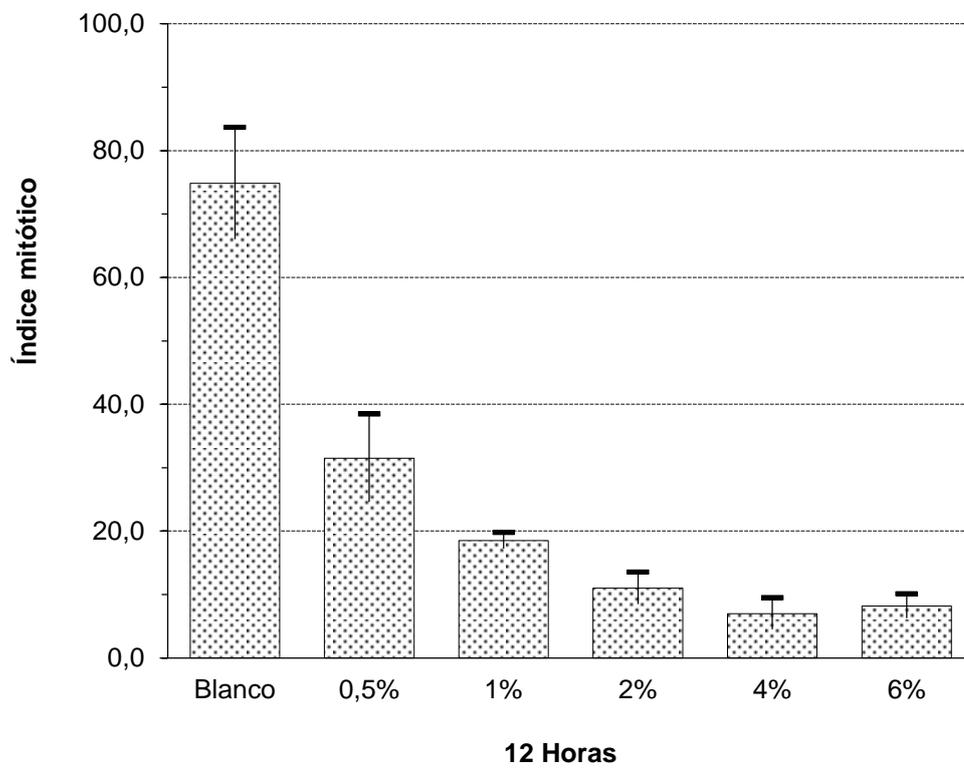
**Anexo 16.** Índice mitótico a las 4 horas del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ligaria cuneifolia* según concentración frente al blanco. Ayacucho – 2019.



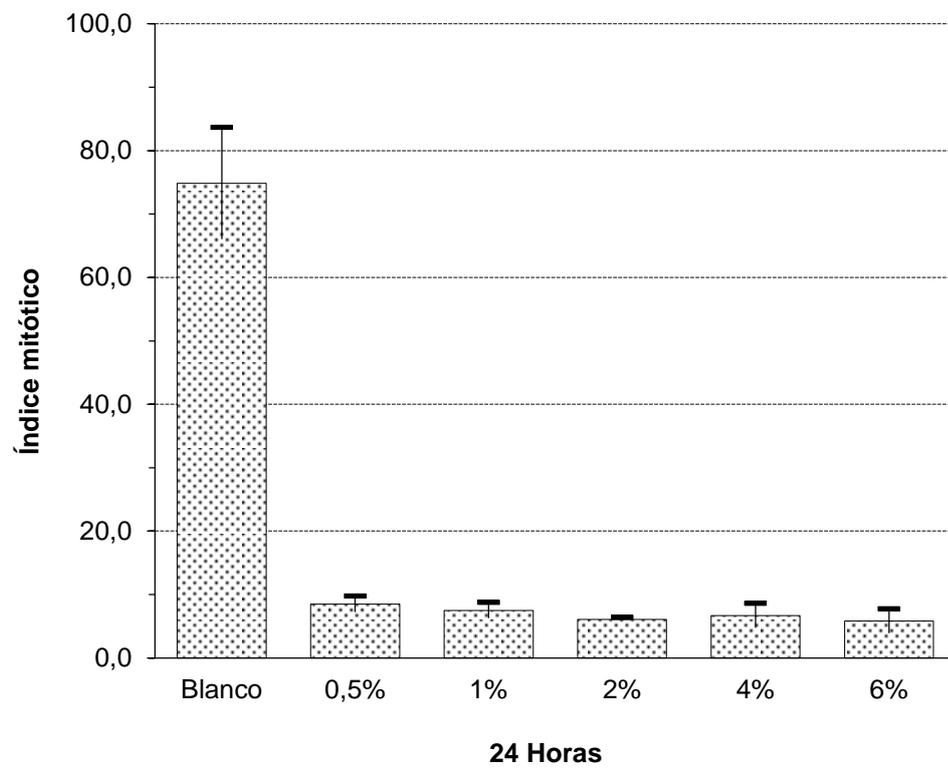
**Anexo 17.** Índice mitótico a las 8 horas del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ligaria cuneifolia* según concentración frente al blanco. Ayacucho – 2019.



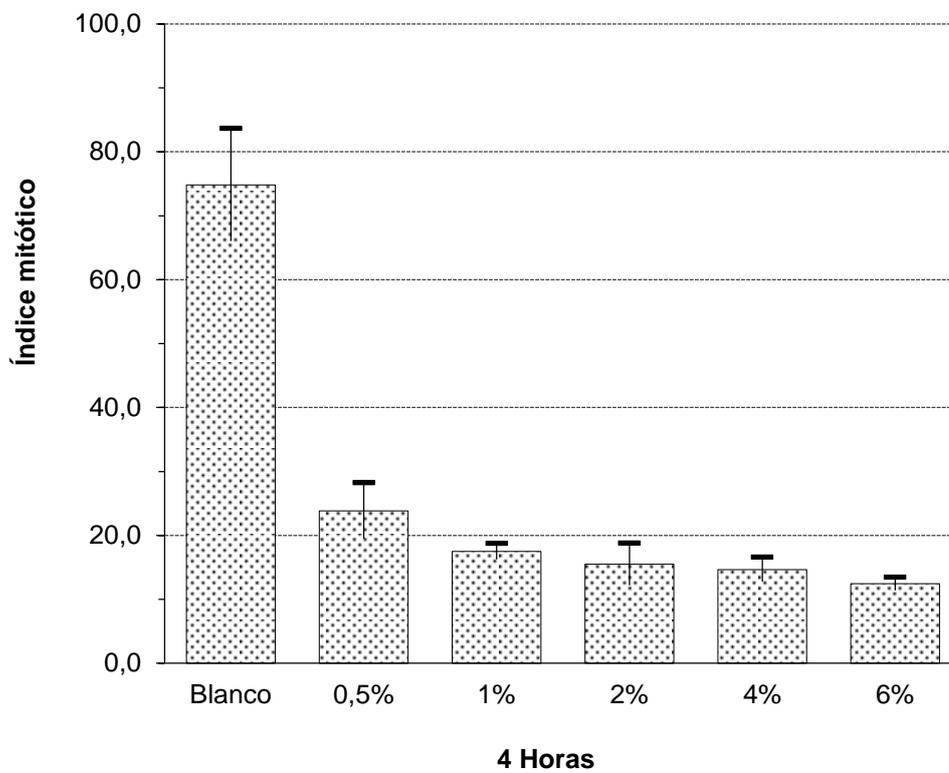
**Anexo 18.** Índice mitótico a las 12 horas del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ligaria cuneifolia* según concentración frente al blanco. Ayacucho – 2019.



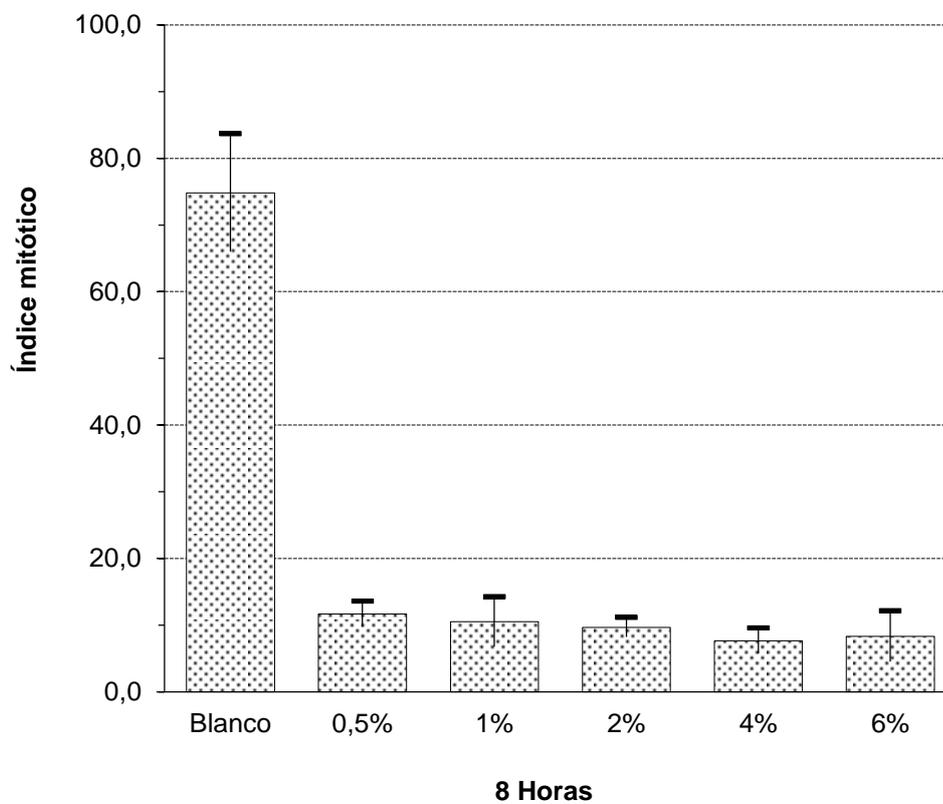
**Anexo 19.** Índice mitótico a las 24 horas del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ligaria cuneifolia* según concentración frente al blanco. Ayacucho – 2019.



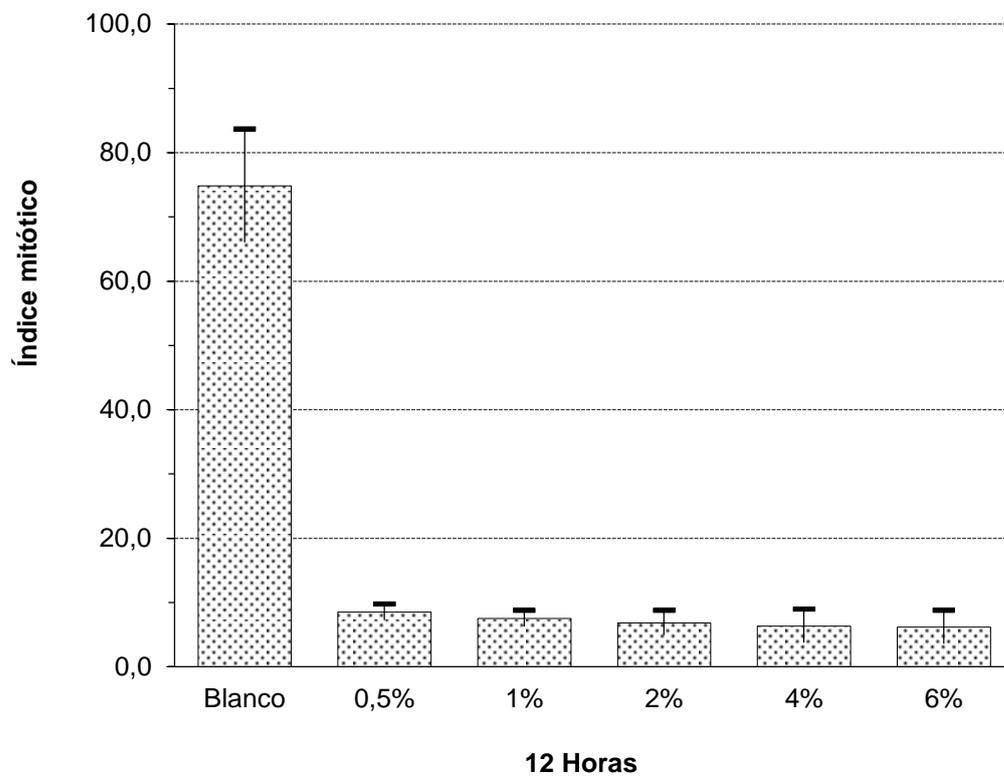
**Anexo 20.** Índice mitótico a las 4 horas del extracto hidroalcohólico de las flores de *Ligaria cuneifolia* según concentración frente al blanco. Ayacucho – 2019.



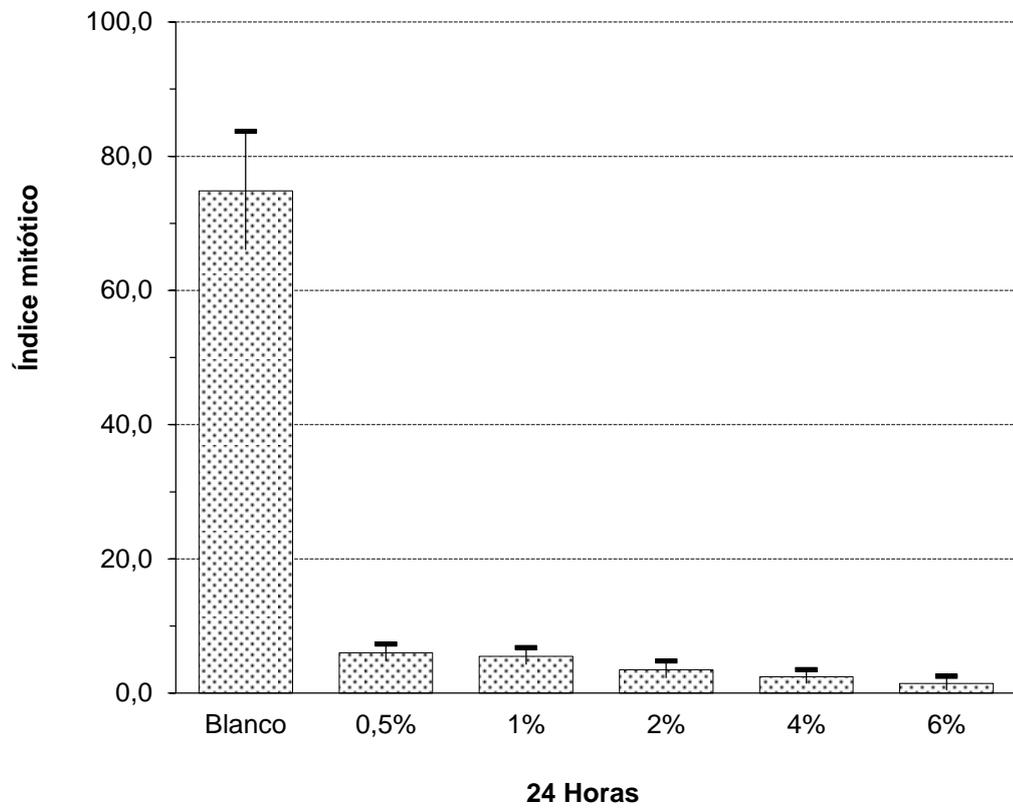
**Anexo 21.** Índice mitótico a las 8 horas del extracto hidroalcohólico de las flores de *Ligaria cuneifolia* según concentración frente al blanco. Ayacucho – 2019.



**Anexo 22.** Índice mitótico a las 12 horas del extracto hidroalcohólico de las flores de *Ligaria cuneifolia* según concentración frente al blanco. Ayacucho – 2019.



**Anexo 23.** Índice mitótico a las 24 horas del extracto hidroalcohólico de las flores de *Ligaria cuneifolia* según concentración frente al blanco. Ayacucho – 2019.



## Anexo 24. Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
Actividad antimitótica del extracto hidroalcohólico de las hojas y de las flores de <i>Ligaria cuneifolia</i> (R.&P.) Tiegh. "Tullma" Ayacucho - 2019.	¿Las hojas y las flores del extracto hidroalcohólico o de <i>Ligaria cuneifolia</i> (R.&P.) Tiegh. "Tullma" presenta actividad antimitótica, Ayacucho 2019?	<p><b>Objetivo general</b></p> <p>Evaluar la actividad antimitótica del extracto hidroalcohólico de las hojas y de las flores de la planta <i>Ligaria cuneifolia</i> (R.&amp;P.) Tiegh. "Tullma". Ayacucho - 2019.</p> <p><b>Objetivos específicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinar los parámetros fisicoquímicos del extracto hidroalcohólico de <i>Ligaria cuneifolia</i> (R.&amp;P.) Tiegh. "Tullma".</li> <li>• Realizar la identificación fitoquímica preliminar del extracto hidroalcohólico de <i>Ligaria cuneifolia</i> (R.&amp;P.) Tiegh. "Tullma".</li> <li>• Evaluar la actividad citostática a las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de <i>Ligaria cuneifolia</i> (R.&amp;P.) Tiegh. "Tullma".</li> <li>• Obtener el índice mitótico e interfásico dentro de la población meristemática total de la raíz de <i>Allium cepa</i> L. "cebolla".</li> </ul>	<p><b>Actividad Antimitótica</b></p> <p><b>Ciclo celular</b></p> <p><b>La célula</b></p> <p><b>Mitosis</b></p> <p><b>División de la mitosis</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Interfase</li> <li>• Profase</li> <li>• Metafase</li> <li>• Anafase</li> <li>• Telofase</li> </ul> <p><b>Características de la fase M</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La condensación cromosómica</li> <li>• El huso mitótico</li> <li>• El anillo contráctil</li> </ul> <p><b>Cálculos de los índices</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Índices del ciclo celular</li> <li>• Determinación del índice mitótico</li> </ul> <p><b>Citocinesis</b></p> <p><b>Características del material biológico.</b></p> <p><b>Metabolitos de la planta</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ <b>Metabolitos primarios</b></li> <li>✓ <b>Metabolitos secundarios</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Flavonoides</li> <li>• Alcaloides</li> <li>• Taninos</li> <li>• Furanocumarinas</li> <li>• Saponinas</li> <li>• Antraquinonas</li> <li>• Triterpenos y esteroides</li> </ul> </li> </ul> <p><b>Aspectos Botánicos de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma".</b></p> <p><b>Clasificación Taxonómica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Descripción botánica <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma"</li> <li>• Distribución geográfica</li> <li>• Hospedantes</li> </ul>	El extracto hidroalcohólico de las hojas y de las flores de la planta <i>Ligaria cuneifolia</i> (R.&P.) Tiegh. "Tullma" presenta actividad antimitótica. Ayacucho - 2019	<p><b>Variable Independiente</b></p> <p>Extracto hidroalcohólico de las hojas y de las flores de <i>Ligaria cuneifolia</i> "Tullma".</p> <p><b>Variable Dependiente</b></p> <p>Actividad antimitótica</p> <p><b>Indicadores</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Índice mitótico</li> <li>• Índice de fases</li> </ul>	<p><b>Estructura metodológica</b></p> <p><b>Tipo, nivel y régimen de investigación</b></p> <p><b>Tipo de investigación:</b> Básico</p> <p><b>Nivel de investigación:</b> Experimental</p> <p><b>Régimen:</b> Libre</p> <p><b>Población, muestra y unidad de análisis</b></p> <p><b>Población:</b> Plantas de la especie <i>Ligaria cuneifolia</i> "Tullma" recolectadas en el distrito de Huamanguilla de la provincia de Huanta del departamento de Ayacucho.</p> <p><b>Muestra:</b> 1 Kg de hojas y de flores secas de la especie <i>Ligaria cuneifolia</i> "Tullma" recolectadas al azar.</p> <p><b>Unidad de análisis:</b> <i>Ligaria cuneifolia</i> "Tullma"</p> <p><b>Muestreo:</b> No probabilístico intencional</p> <p><b>Técnicas, instrumentos y procedimientos</b></p> <p><b>Técnica de recolección de datos:</b> Observación</p> <p><b>Instrumento de recolección de datos:</b> Microscopio,</p> <p><b>Procedimiento de recolección de datos:</b></p> <p>a. Preparación del extracto hidroalcohólico de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma"</p> <p>b. Tamizaje fitoquímico de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma"</p> <p>c. Evaluación de los parámetros fisicoquímicos del extracto hidroalcohólico de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma"</p> <p>d. Enraizamiento de los bulbos de <i>Allium cepa</i> "cebolla"</p> <p>e. Preparación de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas y de las flores de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma".</p> <p>f. Diseño experimental, determinación del índice mitótico e índice de fases.</p> <p><b>Análisis, interpretación y procesamiento de datos:</b> Para el análisis de la información se elaborará una hoja de cálculo en un Software informático utilizando Microsoft office – Excel 2016, los datos se llevarán a contrastar mediante el análisis de varianza con un 95% de nivel de confianza y la prueba de Duncan al 0.05.</p>