

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Genotoxicidad *in vitro* de extracto hidroalcohólico  
de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo” frente a ADN  
genómico humano y *Escherichia coli*.**

**Ayacucho, 2019.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGA, EN LA ESPECIALIDAD DE MICROBIOLOGÍA**

**Presentado por la:**

**Bach. BEIZAGA BAUTISTA, Giulia Katherine**

**AYACUCHO – PERÚ**

**2020**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**  
**Bach. Giulia Katherine BEIZAGA BAUTISTA**  
**R.D.N° 124-2020-UNSCH-FCB-D**

A los cinco días del mes de marzo del año dos mil veintiuno, siendo las cuatro de la tarde, se reunieron a través de la plataforma virtual Google Meet, los docentes miembros del jurado calificador conformado por: Dr. Saturnino Martín TENORIO BAUTISTA (presidente encargado); Dr. Gilmar PEÑA ROJAS (miembro jurado); Mg. Raúl Antonio MAMANI AYCACHI (miembro jurado); Blgo. Tomás Yuret MIRANDA TOMASEVICH (miembro asesor), Mg. Jime Jack RIVERA VILLAR (miembro 4to jurado), actuando como secretaria docente la Mg. Nilda Aurea Apayco Espinoza, para recepcionar la sustentación de tesis titulada: Genotoxicidad in vitro de extracto hidroalcohólico de *Artemisia absinthium* L. "ajeno" frente a ADN genómico humano y *Escherichia coli*. Ayacucho, 2019, presentado por la Bach. Giulia Katherine BEIZAGA BAUTISTA; previa verificación de la documentación exigida, el presidente autorizó el inicio del acto académico precisando que el sustentante dispone de cuarenta y cinco minutos, conforme lo establece el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias Biológicas. Finalizada la sustentación, el presidente invitó a los miembros del jurado a participar con observaciones, aclaraciones y/o preguntas relacionadas al tema; el asesor se comprometió cumplir con las correcciones y sugerencias realizadas. Concluida esta etapa, el presidente invitó al sustentante y a los asistentes abandonar la sala virtual a fin de proceder a la deliberación y calificación correspondiente.

Seguidamente procedieron a la calificación, alcanzando los siguientes resultados:

MIEMBROS DEL JURADO EVALUADOR	EXPOSICIÓN	RESPUESTA A PREGUNTAS	PROMEDIO
Dr. Saturnino Martín Tenorio Bautista			
Dr. Gilmar Peña Rojas	15	14	15
Mg. Raúl Antonio Mamani Aycachi	17	17	17
Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich	17	17	17
Mg. Jime Jack Rivera Villar	15	16	16
		<b>PROMEDIO</b>	<b>16</b>

La sustentante alcanzó el promedio de 16 (dieciséis) aprobatorio. Acto seguido, el presidente invitó al sustentante y público reingresar a la sala virtual para dar a conocer el resultado de la evaluación; finalizando el presente acto académico siendo las seis y treinta minutos de la noche, firmando al pie del presente en señal de conformidad.




Dr. Saturnino Martín Tenorio Bautista  
Presidente (e)



Dr. Gilmar Peña Rojas  
Miembro – Jurado



Mg. Raúl Antonio Mamani Aycachi  
Miembro - Jurado



Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich  
Miembro - Asesor



Mg. Jime Jack Rivera Villar  
Miembro – 4to Jurado



Mg. Nilda Aurea Apayco Espinoza  
(Secretaría - Docente)



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

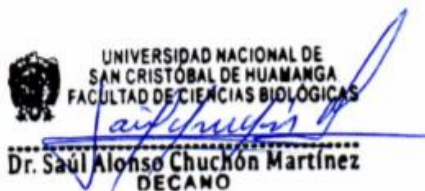
DECANATURA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS N° 021-  
2021-FCB-D

Yo, SAÚL ALONSO CHUCHÓN MARTÍNEZ, Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional De San Cristóbal De Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **“Genotoxicidad in vitro de extracto hidroalcohólico de Artemisia absinthium L. “ajenjo” frente a ADN genómico humano y Escherichia coli. Ayacucho, 2019”**, presentado por la Bach. GIULIA KATHERINE BEIZAGA BAUTISTA; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 25%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario N° 039-2021-UNSCHE-C.

En tal sentido, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 04 de agosto del 2021.

  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Dr. Saul Alonso Chuchón Martínez  
DECANO

Genotoxicidad in vitro de  
extracto hidroalcohólico de  
Artemisia absinthium L. “ajenjo”  
frente a ADN genómico  
humano y Escherichia coli.

Ayacucho, 2019

*por* Giulia Katherine Beizaga Bautista

---

**Fecha de entrega:** 04-ago-2021 07:22p.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 1627831793

**Nombre del archivo:** 1A\_Beizaga\_Bautista\_Giulia\_Katherine\_Pregrado\_2021\_TURNITIN.docx (372.69K)

**Total de palabras:** 17754

**Total de caracteres:** 92988

# Genotoxicidad in vitro de extracto hidroalcohólico de Artemisia absinthium L. "ajenjo" frente a ADN genómico humano y Escherichia coli. Ayacucho, 2019

## INFORME DE ORIGINALIDAD

25%

INDICE DE SIMILITUD

25%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://repositorio.unsch.edu.pe">repositorio.unsch.edu.pe</a> Fuente de Internet	13%
2	<a href="http://cybertesis.unmsm.edu.pe">cybertesis.unmsm.edu.pe</a> Fuente de Internet	7%
3	<a href="http://repositorio.unsaac.edu.pe">repositorio.unsaac.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
4	<a href="http://rpmesp.ins.gob.pe">rpmesp.ins.gob.pe</a> Fuente de Internet	1%
5	Submitted to Universidad Internacional Isabel I de Castilla Trabajo del estudiante	1%
6	<a href="http://www.clubensayos.com">www.clubensayos.com</a> Fuente de Internet	1%
7	Submitted to Universidad Católica del CIBAO Trabajo del estudiante	<1%
8	<a href="http://biblioteca.usac.edu.gt">biblioteca.usac.edu.gt</a> Fuente de Internet	<1%

9

documents.mx

Fuente de Internet

<1 %

10

repositorio.lamolina.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

11

worldwidescience.org

Fuente de Internet

<1 %

12

www.slideshare.net

Fuente de Internet

<1 %

13

1library.co

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo

A Dios padre y a mi querido abuelito en el cielo, no estando presente físicamente, siempre está lado mío guiándome.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecimiento especial a mi Alma Mater la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga forjadora de excelentes profesionales al servicio de la sociedad, dentro y fuera del país.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología, así mismo a los docentes que me impartieron sus conocimientos y experiencias en el transcurso de mi vida estudiantil, preparándome para un futuro competitivo no sólo como profesional sino también como mejor persona.

A mi asesor el Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich y a la coasesora la Blga. Miriam Moreno Hinojosa, quienes accedieron a brindarme su paciencia, capacidad y experiencia científica.



## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Marco conceptual	9
2.2.1. <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo”	9
2.2.2. Ácido desoxirribonucleico (ADN o DNA) genómico humano	11
2.2.3. <i>Escherichia coli</i>	12
2.2.4. Toxicidad y genotoxicidad	13
2.2.5. Mutaciones	16
2.2.6. Evaluación genotóxica	17
2.2.7. Electroforesis en gel	19
2.2.8. Espectrofotometría	19
2.2.9. Evaluación de la genotoxicidad in vitro por el “Método Tomasevich”	20
2.2.10. Ensayo cometa	21
2.2.11. Metabolitos secundarios	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. Lugar de ejecución	25
3.2. Definición de la población y muestra	25
3.2.1. Población	25
3.2.2. Muestra	25
3.2.3. Muestreo	25
3.3. Unidad experimental	26
3.4. Metodología y recolección de datos	26
3.4.1. Recolección de la muestra	26
3.4.2. Procesamiento de la muestra de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo”	26
3.4.3. Obtención de los extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo”	26

3.4.4.	Tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo”	27
3.5.	Extracción de ADN genómico a partir de sangre humana	27
3.6.	Cultivo de <i>Escherichia coli</i> y extracción del ADN genómico	29
3.7.	Cuantificación y observación de la calidad de ADN genómico de <i>Escherichia coli</i> .	30
3.7.1.	Por espectrofotometría	30
3.7.2.	Por electroforesis	31
3.8.	Ensayo de genotoxicidad in vitro “método Tomasevich”	31
3.8.1.	Fase de cuantificación y preparación de stock de ADN genómico obtenido para el ensayo	31
3.8.2.	Fase de ensayo de genotoxicidad in vitro del extracto hidroalcohólico de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo”, sobre ADN genómico	32
3.8.3.	Fase de electroforesis para la detección de genotoxicidad	33
3.8.4.	Fase de lectura por radiación UV	33
3.8.5.	Fase de interpretación visual y clasificación de la genotoxicidad, en el registro fotográfico	34
3.9.	Tipo de investigación	34
3.10.	Diseño de investigación	34
3.11.	Análisis de datos estadísticos	35
IV.	RESULTADOS	37
V.	DISCUSIÓN	57
VI.	CONCLUSIONES	67
VII.	RECOMENDACIONES	69
VIII.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	71
	ANEXOS	75

## ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Características obtenidas mediante pruebas para identificar metabolitos secundarios de plantas.	27
Tabla 2.	Premisa de carga de ADN para visualizar banda en electroforesis. Ayacucho, 2019.	31
Tabla 3.	Concentraciones de <i>Artemisia absinthium</i> L. "ajenjo" para preparar una mezcla para pruebas de genotoxicidad <i>in vitro</i> de extractos de ADN genómico.	32
Tabla 4.	Concentraciones de extractos alcohólicos de agua de <i>Artemisia absinthium</i> L. "ajenjo" en el ADN genómico para preparar una mezcla para las pruebas de genotoxicidad <i>in vitro</i> .	32
Tabla 5.	Digestión de ADN genómico y el extracto hidroalcohólico extraído de Artemisa "ajenjo" se usaron para elaborar un volumen de solución en los pocillos de gel de agarosa para prueba de genotoxicidad <i>in vitro</i> , conjunto 1, Ayacucho 2019.	33
Tabla 6.	Digestión de ADN genómico y el extracto hidroalcohólico extraído de Artemisia se utilizan para preparar un volumen de solución en los pocillos del gel de agarosa. "ajenjo", para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> , grupo 2. Ayacucho 2019.	33
Tabla 7.	Clasificación visual de la fragmentación <i>in vitro</i> del ADN, en términos de niveles de su fragmentación (valores numéricos), observados en registro fotográfico.	34
Tabla 8.	Diseño de investigación con post ensayo únicamente y grupo de control.	34
Tabla 9.	Cribado fitoquímico para identificar los metabolitos secundarios existentes en los extractos hidroalcohólicos de las hojas y tallos de <i>Artemisia absinthium</i> L. "ajenjo". Ayacucho, 2019.	39
Tabla 10.	Valores de prueba de genotoxicidad <i>in vitro</i> de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg / ml del extracto de agua y alcohol de hojas de "ajenjo" de artemisa. ADN genómico humano incubado a 37°C, 1 hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.	42

Tabla 11.	Los valores de prueba de genotoxicidad <i>in vitro</i> de los extractos hidroalcohólicos de tallos de "ajenjo" de <i>Artemisia</i> en concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg / ml, representativamente, frente a ADN genómico humano a 37°C, se incubó a C en el lapso de 1 hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.	46
Tabla 12.	Valores numéricos del ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Artemisia absinthium</i> L. "ajenjo" a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente, frente a ADN genómico de <i>Escherichia coli</i> incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.	50
Tabla 13.	Valores numéricos del ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de tallos de <i>Artemisia absinthium</i> L. "ajenjo" a concentrados de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente, frente a ADN genómico <i>Escherichia coli</i> incubado a 37°C en el tiempo de una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Registro fotográfico del ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/ml, frente a ADN genómico humano incubado a 37°C durante una hora. CIBMB- UNSCH. Ayacucho 2019.	40
Figura 2. Registro fotográfico de la prueba genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo” a concentrados de 200, 300, 400 y 500 mg/ml, frente a ADN genómico humano, incubado durante una hora a 37°C. CIBMB- UNSCH. Ayacucho 2019.	41
Figura 3. Nivel de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/ml, ante ADN genómico humano, incubado a 37°C a lo largo de una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019. Ensayo de Kruskal-Wallis (H=35,0, GL=8, P=0.000).	43
Figura 4. Registro fotográfico del ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de tallos de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/ml, ante ADN genómico humano incubado a 37°C a lo largo de una hora. CIBMB- UNSCH. Ayacucho 2019.	44
Figura 5. Registro fotográfico del ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de tallos de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo” a concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg/ml frente a ADN genómico humano, incubado durante una hora a 37°C. CIBMB- UNSCH. Ayacucho 2019.	45
Figura 6. Nivel de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de tallos de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo” a concentrados de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/ml, ante ADN genómico humano, incubado a 37°C a lo largo de una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019. Prueba de Kruskal-Wallis (H=35,0, GL=8, P=0.000).	47
Figura 7. Registro fotográfico del ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto	48

- hidroalcohólico de hojas de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo" a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/ml, frente a ADN genómico de *Escherichia coli*, incubado a 37°C durante una hora. CIBMB- UNSCH. Ayacucho 2019.
- Figura 8. Registro fotográfico de la determinación *in vitro* de genotoxicidad del ADN genómico de *E. coli* a partir del extracto hidroalcohólico de hojas de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo" a concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg / mL, incubados a 37°C a lo largo de 1 h. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019. 49
- Figura 9. Nivel de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo" a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente a ADN genómico de *Escherichia coli*, incubado a 37°C a lo largo de 1 h. CIBMB- UNSCH. Ayacucho 2019. Prueba de Kruskal-Wallis (H=35,0, GL=8, P=0.000). 51
- Figura 10. Registro fotográfico del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de tallos de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo" a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, frente a ADN genómico de *Escherichia coli*, incubado a 37°C durante una hora. CIBMB- UNSCH. Ayacucho 2019. 52
- Figura 11. Registro fotográfico del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de tallos de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo" a concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg/mL frente a ADN genómico de *Escherichia coli*, incubado mientras pasa una hora a 37°C. CIBMB- UNSCH. Ayacucho 2019. 53
- Figura 12. Nivel de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de tallos de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo" a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente a ADN genómico de *Escherichia coli*, incubado a 37°C en el lapso de una hora. CIBMB- UNSCH. Ayacucho 2019. Prueba de Kruskal-Wallis (H=35,0, GL=8, P=0.000). 55

## ÍNDICE DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1.	Clasificación taxonómica de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo”. Ayacucho 2019.	77
Anexo 2.	Descripción Botánica de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo”. Ayacucho 2019.	78
Anexo 3.	Constancia de tamizaje fitoquímico de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo”. Ayacucho 2019.	79
Anexo 4.	Estructura del ADN.	80
Anexo 5.	Esquema de obtención de extracto hidroalcohólico, tamizaje fitoquímico y determinación del efecto genotóxico.	81
Anexo 6.	Protocolo para la determinación del efecto genotóxico in vitro mediante electroforesis, propuesto por Miranda T.	82
Anexo 7.	Protocolo extracción de ADN genómico de <i>Escherichia coli</i> . Ayacucho 2019.	83
Anexo 8.	Protocolo de extracción de ADN genómico de muestra de sangre humana. Ayacucho 2019	84
Anexo 9.	Esquema de electeoforesis	85
Anexo 10.	Diagrama de la Marcha fitoquímica del extracto de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo”. Ayacucho 2019.	86
Anexo 11.	Matriz de consistencia	87

## RESUMEN

El trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar el efecto genotóxico *in vitro* de los extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo”, frente a ADN genómico humano y de *Escherichia coli* e identificar los metabolitos secundarios presentes. Se desarrolló durante los meses de febrero a setiembre de 2019 en el laboratorio del Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Los extractos hidroalcohólico de hojas y tallos se obtuvo por maceración en etanol: agua (3:1), se realizó una marcha fitoquímica; el efecto genotóxico *in vitro* fue determinado con el “Método Tomasevich”, mediante electroforesis en gel de agarosa. Los metabolitos secundarios identificados en el extracto hidroalcohólico de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo” fueron: fenoles y/o taninos, flavonoides y aminoácidos libres en concentraciones abundantes (++++); seguido de alcaloides y catequinas en regular concentración (+++); y azúcares reductores también en regular concentración, pero sólo en tallos. La genotoxicidad demostró que: con extracto de hojas a 300, 400 y 500 mg/mL la fragmentación fue mayor al 95% del ADN genómico humano; mientras que, con el extracto de tallos fue desde 200 mg/mL; así mismo, con extracto de hojas a 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL la fragmentación fue mayor al 95% del ADN genómico bacteriano; mientras que, con el extracto de tallos fue desde 10 mg/mL. Se concluye que los extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo”, tiene un efecto genotóxico *in vitro* de frente a ADN genómico humano y de *Escherichia coli*.

**Palabras clave:** Genotoxicidad, *Artemisia absinthium* L.



## I. INTRODUCCIÓN

En el mundo, existe una gran variedad de especies de plantas, en las cuales existen gran cantidad de sustancias que aún no han sido estudiadas, solamente se han realizado estudios en un 10% de las plantas, que han sido estudiadas El mundo botánico es un gran receptáculo de extractas, gran parte de ellas de manera minusiosa<sup>1</sup>.

La humanidad ha recurrido frecuentemente a través de su existencia, al uso de las plantas medicinales, para enfrentar diversas afecciones a su salud; en tal sentido, *Artemisia absinthium* L. “ajenjo”, planta originaria de Europa, en donde en el Perú la encontramos distribuida en las tres regiones como es la sierra, selva y la costa, donde las comunidades lo vienen usando como un tratamiento natural y de manera tradicional en la cura de afecciones gástricas (malestar estomacal, dolor abdominal, gastritis diarrea, disentería, gases, contra parásitos, indigestión); de la misma manera el uso del aceite esencial del “ajenjo” tiene actividad antibacteriana, espasmolítico, antifúngica, carminativa. El uso de esta planta está indicada para tratar principalmente en personas que padezcan de falta de apetito, anorexia, discinesias hepatobiliares dispepsias hiposecretoras, flatulencia y espasmos gastrointestinales<sup>2</sup>.

En el Perú, las plantas medicinales se aprovechan desde hace siglos. Durante muchos años los investigadores han estudiado las propiedades de diversas especies vegetales y han descubierto diversas posibilidades, uno de ellos se concentra en sus propiedades medicinales<sup>3</sup>.

Además podemos seguir afirmando que desde tiempos muy remotos el hombre ha utilizado las plantas para tratar todo tipo de afecciones, desde que el hombre habitó la tierra. A inicios del siglo XIX, incluso antes, es decir, en la época prehistórica, en ensayos realizado de ensayo y error, se utilizó los componentes que se encuentra en la naturaleza y estos componentes ayudan a curar

enfermedades y al de los animales, y de la misma manera ayuda a mejorar el estado de ánimo. Estos conocimientos médicos fueron puestos en práctica y con el pasar del tiempo se fue perfeccionando y pasando de generación en generación, por ello lo que ahora conocemos como medicina tradicional<sup>4</sup>.

Por ello, los ensayos para determinar la genotoxicidad que ejercen las plantas medicinales, han alcanzado gran importancia en los últimos años. En ensayos realizados evidencian expresamente que las plantas contienen compuestos que producen la genotoxicidad, principalmente actúa fragmentando el ADN genómico, rompiendo ésta macromolécula específicamente a nivel de los puentes de hidrógeno, y los enlaces fosfodiéster, hacen que el ADN quebrado adquiera un modelo típico cuando es expuesto en el gel de electroforesis de agarosa. Cuando se ejecuta el ADN el recorrido en el gel de agarosa, se observan fracciones disímiles en tamaños, lo vemos que aparecen de manera paralela entre sí, optando el patrón que va en forma de escalera<sup>5</sup>.

Por su conveniencia, este trabajo de investigación permitirá obtener mayores conocimientos respecto a la existencia de metabolitos secundarios, éstos mismos que poseen efectos curativos a diversos males, así como determinar la actividad genotóxica que pudiera estar ejerciendo sobre el ADN.

El presente trabajo de investigación tiene por propósito demostrar el efecto genotóxico *in vitro*, de los extractos de la planta en estudio, *Artemisia absinthium* L. “ajenjo” una de tantas plantas medicinales de uso común en la región de Ayacucho, frecuentemente utilizada para el tratamiento de males estomacales en la población humana.

### **Objetivo general**

Determinar el efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo”, frente a ADN genómico humano y de *Escherichia coli*.

### **Objetivos específicos**

1. Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo”.
2. Evaluar el efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo”, frente a ADN genómico humano y *Escherichia coli*.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Se tiene referencia del uso del “ajenjo” desde la antigüedad, como menciona Dioscórides (40 a 90 d.C), un médico griego en su obra “De Materia Médica y de los Venenos Mortíferos”, describió una gran cantidad de propiedades del ajeno, según manifiesta: “Sirve para mejorar la digestión, depura los humores coléricos recogidos en el estómago y vientre, diurético, sirve para las flatulencias, y calma los dolores de estómago y vientre<sup>6</sup>.”

Publicaciones científicas respecto a las actividades genotóxicas de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo”, no se ha encontrado; sin embargo, existe una variedad de métodos y estudios de otras especies de plantas medicinales que nos conducen a la interpretación de nuestros resultados, por mencionar:

*Artemisia absinthium* L. el "ajenjo" se ha empleado como planta beneficiosa en medicina a partir de la antigüedad. Las funciones farmacológicas más inspeccionadas de la *artemisia absinthium* L. que producen la pérdida de peso y la buena digestión, aunque hasta ahora su impacto antiparasitario todavía no queda claro. Por esto, el objetivo de este estudio es evaluar el impacto antihelmíntico del extracto alcohólico de esta plántula. La investigación fotoquímica del fármaco terminó en una actitud positiva a los próximos metabolitos: aceites fundamentales, alcaloides, antocianinas blancas, flavonoides, compuestos fenólicos, triterpenos y/o esteroides y elementos amargos. Gracias a su relativa facilidad de recolección y su trascendencia para el desarrollo sustentable, las plantas mayores ocupan un espacio apreciable entre los recursos renovables de los productos naturales. El dominio vegetal es una gigantesca biblioteca de materias sustanciales, la mayor parte de los que todavía no se han descubierto, pues se considera que menos del 10% de las especies de plantas se han estudiado a fondo hasta ahora. Gran parte de los compuestos vegetales biológicamente activos provienen de esos originalmente

denominados metabolitos secundarios, y últimamente, productos de la asimilación exclusiva de las plantas.<sup>8</sup>

Aunado a esto, estas materias sustanciales fueron hechas en el lapso de 300 millones de años en proceso evolutivo, como contestación de custodia a patógenos y depredadores, el mecanismo todavía se desconoce en varios casos.<sup>9</sup>

Por otro lado, en la medicina clásica iraní, *Artemisia absinthium* L. se utiliza extensamente. Su auge logra estar entrelazado con la existencia de concentrados antioxidantes. Se aplicaron 5 sistemas experimentales complementarios para identificar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *Artemisia absinthium* L en la fase de floración. Además, su actividad antidepresiva se ha definido por medio de experimentos de natación forzados (FST) e interrupción de la cola (TST). El extracto enseñó una actividad antioxidante óptima.<sup>10</sup>

Es importante enfatizar que el ajeno debería evitarse a lo largo del embarazo y la lactación; los chicos y jóvenes menores de 18 años y los pacientes con obstrucción biliar, colangitis o patología hepática tienen que estar contraindicados.

El extracto preparado *Artemisia absinthium* L. se evaluó *in vitro* ante la cepa *P. falciparum* F321/Tanzania, y la concentración mínima inhibitoria de *Artemisia absinthium* L. estuvo en el rango de 3,1 a 50 ug / mL. Al examinar los resultados de estas 4 especies sobre *Plasmodium berghei* NK65 *in vivo*, revelaron acreciente dinamismo inhibitor, a una dosis de 500 miligramo/kilogramo la parasitemia se disminuyó en un 65,9%. El extracto menos tóxico es el ajeno. Dichas resultas presentan el potencial antipalúdico de varias plantas medicinales usadas en Cuba y dan una vía para el análisis de seguimiento de sus elementos químicos activos.<sup>12</sup>

Así mismo, se sometieron a estudios los aceites fundamentales de 3 plantas aéreas de absinthium, *Artemisia absinthium* L. "ajeno" logrados por destilación de agua, y se contrastó su toxicidad para el gorgojo común (*Sitophilus Granarius*.) (Coleoptera: Curculioceae). La colectividad de los aceites fundamentales examinados son deletéreos para los adultos de *S. granarius*. El aceite sugiere que la tasa de mortalidad del gorgojo del establo es del 80 al 90% luego de 48 horas de exposición, la dosis de *S. granarius* ha sido de 9 ul / L. Ciertos elementos purificados (alcanfor, 1,8-cineol, terpinen-4-ol, borneol,

acetato de borneol y  $\alpha$ -terpineol) se determinaron como los compuestos primordiales del aceite, a una dosis de 0,5-0,75 y 1  $\mu$ l / se probó el aire L contra *S. granarius*. Entre los compuestos puros examinados, el 1,8-cineol y el terpinen-4-ol son más tóxicos para *S. granarius*, con una mortalidad del 100% en cada una de las dosis luego de 12 horas de exposición. Se puede concluir que los aceites esenciales de las tres plantas de Artemisia y sus componentes principales 1,8-cineol y terpinen-4-ol son fármacos potenciales para el control de *Salmonella graminearum*<sup>13</sup>

Por otro lado, Bezerra<sup>14</sup>, realizó un estudio fitoquímico y biológico *in vitro* en especies del género Euphorbia (Euphorbiaceae), donde revelan una fuerte presencia de terpenos, esteroides y flavonoides entre otros, en todas las especies. En la evaluación de la actividad antibacteriana, las tres especies en estudio presentaron buena actividad antibacteriana, destacándose en la eficiencia de inhibición del crecimiento de bacterias Gram- negativas. De esta forma concluye que las tres especies de la familia Euphorbiaceae, presentan gran potencial en la actividad antioxidante y antibacteriana.

También Craig<sup>15</sup>, señala que el tratamiento tópico de cáncer de piel no melanoma; los carcinomas de células basales (BCC) y los carcinomas de células escamosas (SCC) son los cánceres humanos más comunes; planteando que como primera aplicación médica está la *Euphorbia peplus* L., es uno, de una serie de plantas de la familia Euphorbiaceae que ha atraído la atención como un remedio casero para el cáncer de piel debido a su savia lechosa. Sin embargo, una encuesta realizada por Peplin Biotech de más de 200 especies de la familia Euphorbiaceae ha demostrado que sólo *Euphorbia peplus* L. tiene los atributos deseados de eficacia anticancerígena *in vitro* e *in vivo*.

El efecto *in vitro* anti-*Helicobacter pylori* por Mena<sup>16</sup>, realizó estudios utilizando el extracto acuoso y aceite esencial de la parte carnosa, pulpa de los frutos maduros de *Carica candamarcensis* Hook. (Nombres con los que es conocido en diferentes lugares: chilacuán, papayuela de clima frío) el cual tiene dicha actividad, por lo que se consideran primarios en la realización de terapias adicionales para el control de un contagio infeccioso gástrico provocado por dicho microorganismo. Realizó estudios de dichos extractos evaluando: a) genotoxicidad a través de electroforesis alcalina de células individuales [ensayo cometa (SGCE)]. c) mutagenicidad por medio de la prueba de Ames; b) citotoxicidad a través indagación de viabilidad de linfocitos humanos bloqueados

por el método tradicional en gradiente de Hystopaque® y en cultivo con medio RPMI-1640. Para la evaluación del extracto acuoso se utilizaron dosis que fueron a partir de la sustancia concentrada auténtica hasta 10<sup>-2</sup> (disoluciones en H<sub>2</sub>O extraída estéril) y en la cuestión del líquido aceitoso básico se usó desde el inicio del extracto único diluido en DMSO al 1% incluso 10<sup>-6</sup>. Esta investigación constata que de acuerdo a los exámenes realizados la totalidad de los concentrados evaluados son fiables agrado genotóxico, citotóxico y mutagénico. Pero, de todas maneras, se necesita realizar más estudios, pero utilizando ya nuevas metodologías de prueba que consientan ratificar o rechazar si realmente las extracciones incitan averías notables en el ADN, y si poseen productos anti-mutagénicos y anti-genotóxicos y de esta forma presenciar, para su futura introducción en el perfeccionamiento de un fitofármaco de *Carica candamarcensis* para su utilización como medio de trato adicional en personas con historial médico de un estado infeccioso por *Helicobacter pylori*.

En este sentido, se han reportado investigaciones sobre genotoxicidad en diversas plantas de uso medicinal, bastante utilizado en diversas regiones en especial en nuestra región de Ayacucho, tales como:

Evaluó Vega<sup>17</sup>; *Euphorbia peplus* L. f. “Leche leche” y *Ficus carica* L. “higo” en el radicular meristemo de *Allium cepa* L. “cebolla” se realizó estudios acerca del efecto citostático del látex, utilizando el látex de estas dos plantas medicinales mencionadas. Lo que se realizó fue la determinación de la diferenciación del indicador de la mitosis, realizado por una secuela citostático del goma de *Ficus carica* L. y *Euphorbia peplus* L. en el tejido meristemático de las raíces de *Allium cepa* L. “cebolla”, en donde la metodología consistió en que fueron sometidos a tratamiento con el látex de ambas plantas medicinales, a concentrados de 01%, 1.5%, 02%, 03%, 05% y 10% de cada variedad, apreciando el resultado que inhibe el desarrollo y multiplicación de las células en un intervalo de tiempo de 4, 8, 12 y 24 horas, para luego realizar la lectura entre 1,000 a 3,500 células por muestra. De acuerdo con el estadístico, el ensayo de Tukey arroja que la familia con acreciente emanación citostática fue la *Euphorbia peplus* L.f. (IM=0,00%), y con menor efecto citostático *Ficus carica* L. (IM=0,32%). La duración de trato de más diligencia antimitótica fue a las 20 h con goma al 03% de *Euphorbia peplus* L. f. “leche leche”, le sigue la resina con un 10% de “higo” a las 24 horas.

También, Pilaca, L.<sup>18</sup> hizo cribado fitoquímico y pruebas de genotoxicidad de látex de diferentes concentrados exhibidos al ADN genómico de linfocitos

humanos, dichos látex se obtienen de manera directa de las plantas y se cortan a grado de los tallos de las mismas como producto verde de "higuera" (sicono), donde se cree el mal genotóxico "*in vitro*", que se establece por la radiación violeta sometiendo a bromuro de etidio para electroforesis en gel de agarosa, ultraimagen, y cámaras digitales clásicas. Los metabolitos secundarios que se identificaron en el látex de la planta "leche leche" fueron: alcaloides, fenoles y/o taninos, flavonoides, lactonas y/o cumarinas, principios amargos, astringentes y saponinas, y en látex de la planta "higo" se identificaron lactonas y/o cumarinas alcaloides, principios amargos y astringentes, flavonoides. En conclusión se identificó que en la goma de ambas plantas, *Euphorbia peplus* L. "leche leche" como de *Ficus carica* L "higo" se halló gran dinamismo genotóxica en el ADN genómico de linfocito humano, estando a concentrados de 100% y 50% el más grande fraccionamiento del ADN con respecto a 25% y 10%. Finalmente el látex de plántulas de medicina anti verrugosas *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L "higo" exhiben resultado genotóxico "*in vitro*", donde este efecto es directamente proporcional a la concentración del látex a la que se someta; pero no influye el tiempo de incubación.

Además, Alarcón, Gramo.<sup>19</sup> evaluó extractos hidroalcohólicos conseguidos con alcohol a 80°C, concluyó la genotoxicidad a diferentes concentraciones, y expuso dichos extractos al ADN genómico de linfocitos humanos; entre ellos, se evaluó la herencia "*in vitro*" mal tóxico por electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1%. Muestra que el extracto hidroalcohólico tiene fundamental actividad genotóxica sobre el ADN genómico de linfocitos humanos, se usa como extracto de plantas medicinales "ganai" y "yavascu" a 50 miligramo / ml y 100 miligramo / ml de Marico". Al final, se apunta que el mal genotóxico es de manera directa proporcional a la concentración del extracto hidroalcohólico; sin embargo la era de incubación no perjudica.

Por su lado, Martínez, J.<sup>20</sup> midió la actividad genotóxica a disímiles concentrados, la enfrentó con ADN genómico humano y la evaluó por medio de el "procedimiento Tomasevich", extracto hidroalcohólico y etanol: agua (3: 1) obtenido al sumir el ADN genómico humano en un lapso de 7 días; después de que el extracto ha sido expuesto al ADN genómico humano, el mal genómico se vio por medio de electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1%, y se vio bajo luz ultravioleta. Las concentraciones genotóxicas que produjeron los más grandes perjuicios fueron 500 miligramo/mL, 400 miligramo/mL y 300

miligramo/mL. Una vez que se hizo la prueba de Kruskal-Wallis, demostró que el mal genotóxico estaba referente con la concentración y tiempo de incubación del extracto hidroalcohólico de *Datura Proporcional* ( $p = 1 \times 10^{-4}$ ). Por consiguiente, se puede concluir que el extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura* ocasionará un mal genotóxico proporcional a la concentración y además perjudicará la época de incubación.

Montes, M.<sup>21</sup> utilizó látex de plantas medicinales para realizar investigaciones y utilizó *Argemone mexicana* L. "cardosanto" y diente de león "*Taraxacum officinale*" para la piel, que tienen una actividad genotóxica considerable en el ADN del genoma humano. En esta investigación se estimó el daño genotóxico "*in vitro*", el cual se determinó sometándolo a electroforesis en gel de agarosa. Asimismo, los metabolitos secundarios identificados en el látex de la planta medicinal *Argemone mexicana* L. "cardo santo" son los siguientes: compuestos fenólicos, taninos (+++), alcaloides, y en el látex de la planta medicinal diente de león "Diente de león" se encontraron los siguientes metabolitos secundarios: cardenólidos (+), compuestos fenólicos y taninos (+++), alcaloides (+). Los resultados mostraron que el látex "Holy Thistle" en una concentración de 10% a 100% tuvo un efecto genotóxico significativo en el ADN genómico humano, haciendo que la fragmentación del ADN fuera del 100%; mientras que el látex "Dandelion" mostró 50% y 100%. La concentración de látex del 10% y 25% fragmenta el ADN al 100%, mientras que la concentración del 10% y 25% fragmenta el ADN genómico humano al 40% al 95%, podemos explicar la significancia estadísticamente ( $p < 0.05$ ). Se concluye que el látex de *Argemone mexicana* L. "Holy Thistle" y Diente de león "*Taraxacum*" es genéticamente tóxico.

Al final, Cosquillo, M. et al.<sup>22</sup> valoraron la actitud citotóxica del extracto, y la curcumina es distinta en medio de las células tratadas. No obstante, el extracto de etanol que exhibió la mejor actividad exhibió una CI50 más baja. La curcumina que tiene EC y EE inhibe el aumento de las células HT-29 de forma más eficaz que la línea celular DU-145. Usando células murinas de colon 26, de cáncer colorrectal (CRC), HT-29 humano y HCT 116, Kuete et al. (26). La actividad citotóxica *in vitro* de la CE (18,8% gramo / g) se reveló en cada una de las pruebas, en especial luego de 48 a 72 horas de incubación, la IC50 del CCR ha sido de 15  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , en lo que la IC50 de la curcumina ha sido de 5  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . Dichos resultados son semejantes a nuestro análisis y son alentadores gracias a su impacto citotóxico sobre HT-29.



## **2.2. Marco conceptual**

### **2.2.1. *Artemisia absinthium* L. “ajenjo”**

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

Para hacer el trabajo de tesis, las plantas medicinales fueron identificadas y clasificadas de acuerdo con el sistema de categorización Cronquist A. 1988. La identificación se hizo en el Laboratorio de Botánica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Cristóbal de Vamanga, Y es de la siguiente forma: (Anexo 1)

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Asteridae
Orden	: Asterales
Familia	: Asteraceae
Subfamilia	: Asteroideae
Género	: Artemisia
Especie	: <i>Artemisia absinthium</i> L.
Nombre vulgar	: “ajenjo”

#### **2.2.1.2. Nombres vernaculares**

Ajenjo, absenta, asensio, ajorizo, artemisia amarga, hierba santa, hierba maestra<sup>23</sup>.

#### **2.2.1.3 Descripción botánica**

Se le conoce como una plántula herbácea perenne, de tallos erguidos o decumbentes bastante ramificados, de aproximadamente 1 metro de alto, tanto tallos y hojas presentan un color blanco cenizo debido a la presencia de pelos glandulares blanquecinos y sedosos, vello canoso las hojas son pecioladas, bipinnadas, con foliolos alargados muy aromáticas que despide un olor fuerte desagradable y persistente, se identifica por poseer hojas sustituyentes levemente lanceoladas, inflorescencias en grupos postreros de matiz amarillento con florecillas de pequeño tamaño de talante papilionáceo.

Los tallos germinan a partir de rizomas leñosos, hierbas ramificadas; cuando llega la temporada de floración, son leñosos, regordetes y duros. Las ramas son delgadas y flexibles. Es una hierba perenne con rizomas leñosos duros con foliolos delgados muy aromáticos que emiten un olor fuerte, desagradable y de larga duración. Las flores aparecen en muchas pequeñas cabezas amarillas,

vestidas de finos pelos plateados. El talluelo es erguido y extendido. Las hojuelas son pinnadas, alternas, de 5-7 centímetros de extenso, partidas en 24 triángulos, cada uno con lóbulos estrechos. Las flores miden 4-6 mm de trazo, mayormente hemisféricas, distribuidas en todo el tallo, las inflorescencias son de colores amarillo claro, pequeños y posteriores. Hecha su flor en otoño y verano. Una fruta de aquenio exclusiva, suave y bastante pequeña.<sup>24</sup> (Anexo 2)

#### **2.2.1.4. Hábitat y distribución**

Se le considera un espécimen nativo europeo, crece en forma cultivada en huertos y jardines, o en forma silvestre, en costa, sierra y selva generalmente en zonas húmedas. Se encuentra en todas las estaciones del año, de preferencia en época lluviosa donde florece y fructifica. Se propaga mediante esquejes<sup>24</sup>.

#### **2.2.1.5. Propiedades y usos tradicionales**

Esta planta medicinal se usa en infusión de las hojas en pequeñas cantidades para cólicos hepáticos y renales, como depurativo de la sangre, como antiespasmódico, digestivo, como regulador de la menstruación, para combatir la obesidad, diabetes, etc. El "ajenjo" es tóxico en dosis elevada, produce intoxicaciones del sistema nervioso manifestándose con dolor de cabeza, náuseas, mareos y pérdida del conocimiento; como abortivo utilizando la decocción de las ramas tiernas y hojas. También se usa como insecticida utilizando el extracto de la planta como repelente de pulgones, polillas y otros insectos. Esta bebida compuesta de ajenjo es muy tóxica para el sistema nervioso, por lo que en muchos países está prohibido su venta y consumo.

La planta presenta un aceite esencial conteniendo entre otros un glucósido (la absintina) y una cantidad importante de principio amargo. En Lima, Antonio Brack informó que Artemisia "ajenjo" es una plántula empleada en la medicina clásico ya que tiene una pluralidad de características farmacológicas y es la más conocida para el procedimiento de patologías gastrointestinales por infusión o uso de aceites fundamentales en forma diluida<sup>24</sup>. Hojas: se disponen para tratar patologías de los nervios y del hígado, leucorrea, trastornos menstruales, patologías gastrointestinales (cólicos, diarreas, disentería, flatulencias, gastritis, indigestión y parásitos); estimulan la secreción de estómago y bilis. Desinfectar heridas y acné, intentar inflamaciones, tumores, artritis reumática o gotosa y aliviar esguinces 9-13. Otros usos célebres: Antes usado como insecticida de la casa para el control de las polillas de la ropa.<sup>25</sup>

### 2.2.1.6. Composición química

Su compuesto primordial es un aceite volátil, en el cual la medicina herbal aporta de 0,5 a 1,0% por medio de la destilación. Frecuente ser de coloración verde sombrío o, en ocasiones, azul, con un profundo amargor y aroma. Este aceite tiene tujona (absenta o butaacetona), tujol (usado solo o en mezcla con ácido isovalérico y ácido málico), isotujona, cadinena, felaneno y pineno. Este aceite ocasionalmente está en el té o las tinturas de ajeno. Aunque este aceite puede matar muchos tipos de gusanos, puede dañar el sistema nervioso humano. Los agentes amargos fuertes llamados ajeno y absenta también están presentes en el aceite. Acetileno: matriz de deshidrogenación trans.

- Azulenos: tiene ocupaciones antiinflamatorias, antileucotrienos, antipiréticas y antisépticas. Dichos integran camazuleno, dihidrocamazuleos, bisabolenos, camfene, cadineno, sabineno, trass-sabiylacetate, felandreno, pineno, etcétera.
- Carotenoides,  $\beta$ -caroteno (alérgeno, anti-acné, anti-cáncer)
- Flavonoides: espinaquina, artemisinina, artemisinina (detiene el sangrado, antiinflamatorio y antipalúdico), isoquercitrina (inhibidor de la aldosa reductasa, anticanceroso, antioxidante, igninas: diaqyangambin y epiyangambin)
- Ácido fenólico: ácido p-hidroxifenilacético, ácido p-cumárico
- Tanino (4.5-7.0%).
- Tujona e isotujona: cetonas terpénicas. Actividad antihelmíntica
- Tujol: lactonas sesquiterpénicas de alcohol monoterpénico (0,15-0,4%): son sustancias amargas y se caracterizan por sus efectos insecticidas y antitumorales. Son primariamente de la clase guayanólido. Entre ellos, destaca la absintina (guayanolida dimérica, 0,20-0,28%), en compañía de artabsin, artamarin, artamaridin, artamarinin, matricin y anabsintin, entre otros.<sup>26</sup>

### 2.2.2. Ácido desoxirribonucleico (ADN o DNA) genómico humano

Se plantea que las células tienen dentro una diversidad de macromoléculas, como polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, estas macromoléculas tienen la posibilidad de clasificar como polímeros, o sea, moléculas con unidades estructurales reiteradas frecuentemente. Los polisacáridos se forman de monosacáridos, las proteínas permanecen compuestas de aminoácidos y los ácidos nucleicos se forman de nucleótidos. Los ácidos nucleicos se parten en 2

categorías: ADN o ácido desoxirribonucleico, con desoxirribonucleótidos o desoxinucleótidos como unidades estructurales; y ácido ribonucleico o ARN con ribonucleótidos. Se plantea que las células tienen dentro una diversidad de macromoléculas, como polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, estas macromoléculas tienen la posibilidad de clasificarse como polímeros, o sea, moléculas con unidades estructurales reiteradas frecuentemente. Los polisacáridos se forman de monosacáridos, las proteínas permanecen compuestas de aminoácidos y los ácidos nucleicos se forman de nucleótidos. Los ácidos nucleicos se parten en 2 categorías: ADN o ácido desoxirribonucleico, con desoxirribonucleótidos o desoxinucleótidos como unidades estructurales; y ácido ribonucleico o ARN con ribonucleótidos<sup>27</sup>.

Por consiguiente, el sistema cromosómico es la unidad de funcionalidad, composición y reorganización de la información genética en las células somáticas y las células germinales. Además es responsable de estandarizar su propia organización y la información de funcionalidades. Escondido en su composición está el código de relación entre los cromosomas, códigos que conforman la funcionalidad del núcleo celular], propiedades que confieren a este compartimento un fundamental rango de potencia evolutiva.<sup>28</sup>

### **2.2.3. *Escherichia coli***

Puede decirse que el genoma de las bacterias frecuentemente existe en una sola molécula de ADN circular, empero además hay bacterias con 2 moléculas circulares o una o más moléculas lineales. Cada corpúsculo tiene una zona a partir de la que imitará. Como el ADN de cada una de las células, este ADN tiene un tamaño bastante enorme comparativamente con el volumen que ocupa en la célula, lo cual supone que el ADN bacteriano está presente en la célula y tiene una composición bastante compacta llamada nucleoide. Actualmente, el modelo nucleoide más completo es *Escherichia coli*, de alrededor de 1 milímetro de extenso, organizado en bucles superenrollados, alrededor del 50% del ADN está superenrollado cerca de proteínas semejantes a las histonas eucariotas.<sup>29</sup>

Se dice que la *Escherichia coli* es un bacilo gramnegativo anaerobio facultativo que forma parte del núcleo familiar *Escherichia coli* de las Enterobacteriaceae. *E. coli* que coloniza el intestino humano unas horas a partir del origen y se estima que tiene una flora habitual, pero se han descrito 6 conjuntos de *E. coli* productoras de diarrea: de enterotoxina (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC). ), enteropatogenicidad (EPEC), adición intestinal (EAEC)

y adherencias difusas (DAEC). Comúnmente, las bacterias tienen la posibilidad de aislar e detectar en funcionalidad de sus propiedades bioquímicas o serológicas, no obstante, el mecanismo patogénico además se puede aprender por medio de la detección en cultivos celulares o exploratorios animales, y la utilización existente de tecnologías de biología atómica que presentan la existencia de genes. El objetivo de este trabajo es enfatizar el valor de la indagación y diagnóstico de *Escherichia coli* como patógeno, que puede producir casos aislados o brotes de diarrea, síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica y disentería, primordialmente en chicos; por esto, se necesita entender mejor las bacterias y conservar la atención epidemiológica.<sup>29</sup>

Como cualquiera de las bacterias Gram-negativas, la capa externa de *E. coli* está formada por 3 recursos: la membrana citoplasmática, la membrana externa y el espacio periplásmico, que se compone de peptidoglicanos en el medio. Esta última composición da a las bacterias su forma y rigidez y les permite tolerar una presión osmótica ambiental subjetivamente alta. Es una bacteria mesófila y se desarrolla mejor alrededor de animales de sangre caliente (35-43°C). El límite de temperatura para el aumento es de alrededor de 7°C, lo que sugiere que el control efectivo de la cadena de heladas en la industria alimentaria es esencial para evitar el aumento de *E. coli* en los alimentos. Además de la temperatura, el pH y la actividad del agua afectan el aumento de *E. coli*. Las condiciones óptimas de desarrollo para estos límites son 7,2 y 0,99, respectivamente. *E. coli* deja de crecer a niveles extremos de pH (por debajo de 3.8 o por encima de 9.5) y por debajo de 0.94. Por consiguiente, la acidez de los alimentos puede constituir un componente defensor y asegurar su estabilidad. *E. coli* tiene muchas propiedades y puntos, y es la taxonomía bacteriana mejor estudiada, aun cuando la comprensión de las cepas silvestres todavía es parte de ella. Mientras se obtienen nuevos genotipos desde plásmidos, fagos y otros recursos que transfieren su material genético, la adaptabilidad de esta bacteria parece ser poco común. Además, su popular universalidad conduce a la aparición repetida de cepas con novedosas propiedades, incluidas habilidades patógenas que son difíciles de detectar.<sup>30,31</sup>

## **2.2.4. Toxicidad y genotoxicidad**

### **2.2.4.1. Toxicidad**

La toxicidad se define como la función de una sustancia química de tener un impacto perjudicial sobre el organismo una vez que entra en contacto con ella.

De igual modo, cualquier sustancia tóxica natural o artificial se define como tóxica si es perjudicial (en otras palabras, cualquier factor que logre tener un impacto nocivo en el organismo una vez que entra en contacto con el organismo).<sup>32</sup>

Otra definición de toxicidad es la función de una sustancia o preparado para provocar mal a los organismos. Esta capacidad es inherente a la sustancia y puede modificarse por varios componentes, como por ejemplo:

- Gestión y / o dosis absorbida
- Ruta de administración
- Repartición de la dosis en todo el tiempo<sup>33</sup>

#### **2.2.4.2. Genotoxicidad**

La definición de genotoxicidad se expone como la facultad de provocar daño, perjuicio al material genético; el perjuicio provocado podría ser de tipo mutagénico y/o carcinógeno.<sup>34</sup>

Estas sustancias dañinas que generan genotoxicidad permanecen en relación directa o de forma indirecta con el ADN, lo cual pueden ocasionar alteraciones, interrumpir el proceso de compostura y/o alineación, el principio o polimerización de proteínas o la separación cromosómica.

Al hacer una prueba de genotoxicidad, evalúa el mal o perjuicio a grado de material genético (cromátidas cromosomas y / o composición del ADN) u otras permutas epigenéticas en los cuerpos provocados por la diferencia de la expresión génica, sin tener nada que ver con los cambios y la mutación de la sustancia.<sup>35</sup>

Los compuestos o reactivos que poseen la función de provocar mal a grado de material genético se llaman genotóxicos o xenobióticos, y se parten en 3 categorías según su origen: químico, físico y biológico. La clase inicial está formada por sustancias químicas, la sucesiva categoría encierra todo el espectro de radiación y la última clase envuelve los efectos de ciertos parásitos, bacterias, hongos, plantas e inclusive virus (aunque es bien conocido que los virus no se piensan organismos vivos). En otros términos, se cataloga en otra categoría) La calidad o capacidad de generar o inducir dichos agentes se ve afectada por la porción y la época de exposición del mutágeno, y añadido a la estructura genética del sujeto, la persona podría ser susceptible, si es propio todavía es específico.<sup>37</sup>

### 2.2.4.3. Mecanismo de genotoxicidad

Las mutaciones son producidas de manera natural, pero si se expone un organismo a componentes que inducen a las mutagénesis, lo que va producir es una acelerada frecuencia en la mutación natural. En la actualidad se observa una gran diversidad de factores, entre ellos factores físicos, químicos; que tienen la capacidad de accionar como elementos mutágenos. Donde operarán como entes mutágenos todos aquellos con la cualidad de alterar el material hereditario y principalmente, todos esos que trastornen la secuenciación del ADN (material genético). Podemos mencionar como principales agentes mutágenos los siguientes:

#### a) Agentes físicos

- Las radiaciones electromagnéticas: rayos X y los rayos gamma.
- Las radiaciones corpusculares: rayos  $\alpha$ , los rayos  $\beta$  y los flujos de protones o neutrones.
- Los ultrasonidos, los choques térmicos, la centrifugación, etc.

#### b) Agentes químicos

- Los equivalentes de las bases nitrogenadas.
- El ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ).
- Los alcaloides como por ejemplo: la cafeína, la nicotina.
- El fluido gaseoso mostaza, el agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el ciclamato, etc<sup>40</sup>.

Las equivocaciones cromosómicas integran cambios extensos en el ADN provocados por la exposición humana a radiación ionizante y otras sustancias genotóxicas.

Las ilustraciones epidemiológicas han demostrado que los individuos con una alta periodicidad de yerros cromosómicos en los linfocitos de sangre periférica poseen un peligro de manera significativa más grande de cáncer.<sup>38</sup>

Las aberraciones cromosómicas tienen la posibilidad de ser estructurales o numéricas. Las roturas cromosómicas o los cruces dispares proporcionan sitio a cromosomas, inserciones, células, duplicaciones, translocaciones e inversiones. Dichos reordenamientos de estructuras están afectando el contenido y la manera de uno o más cromosomas y modifican el reparto de genes en el genoma, además de que además tienen la posibilidad de alterar el periodo celular y ocasionar procesos tumorales.<sup>39</sup>

La genética es la ciencia delegada de aprender todo lo referente con la herencia; entendida como letras y números o información transmitida de generación en

generación. Se puede recordar que esta transmisión se hace por medio de genes, que son fragmentos de ADN que codifican esta información al componer una misma réplica de diversos tipos de ARN. Cualquier cambio (mutación) en el ADN genético perjudicará al mismo sujeto (si la mutación pasa en una célula somática) o su descendencia (si pasa en una célula sexual o gametos).

### **2.2.5. Mutaciones**

Tienen la posibilidad de conceptualizar como cambios permanentes en la información genética, o sea, uno o más nucleótidos del ADN. Así como pasar en células somáticas o en células germinales, siendo estas últimas las más relevantes a partir de la perspectiva genética. Las mutaciones son cambios en el material genético. Por consiguiente, solo tienen la posibilidad de heredar una vez que están afectando a las células germinales; si están afectando a las células somáticas, se extinguirán, principalmente con la persona, a menos que se intente un organismo asexual. Estas alcanzan ser: naturales (espontáneos) o inducidos (artificiales por radiación, sustancias químicas u otros mutágenos).

#### **2.2.5.1. Mutaciones génicas**

Se le conoce como eso que generan cambios en la sucesión de nucleótidos de los genes. Si perjudica a un solo nucleótido, se llama mutación puntual. Teniendo presente los criterios morfológicos, hay diversos tipos de mutaciones:

a) Reemplazo del par de bases. Dichos tienen la posibilidad de ser por:

- Transición: Es la permuta de nucleótido de una base purina a otra base purina o de una pirimidina a otra.
- Transversión: cambio de base purina a pirimidina y al revés.

b) La pérdida o inserción de nucleótidos causa un cambio en el orden de lectura.

Tienen la posibilidad de ser:

- Suma de genes: inserta nucleótidos en la sucesión del gen.
- Deleción de genes: pérdida de nucleótidos.
- Repeticiones de nucleótidos.

#### **2.2.5.2. Aberraciones cromosómicas estructurales**

Son permutas en la composición interna de los cromosomas. Se dividen en 2 tipos dependiendo del caso:

a) Esos en los cuales falta el segmento hipotético o está duplicado:

a. Deleción cromosómica: es la pérdida de fragmentos cromosómicos.

Acá encontramos:

- ✓ Terminal: una vez que se pierde un segmento del final de un cromosoma



- ✓ Intersticiales: una vez que falta el segmento interior, respete el extremo
- Duplicación cromosómica: es la duplicación de segmentos cromosómicos.
- 1. Las que presumen diferenciaciones en la distribución de los segmentos de los cromosomas.
- Inversión: el segmento cromosómico del cromosoma está en la postura de inversión. Tienen la posibilidad de ser:
  - Excentricidad: Permanecen del lado del centrómero y lo respetan.
  - ✓ Pericéntrico: Rodean los filamentos y participan en la inversión.
- Translocación: un segmento cromosómico de un cromosoma está en otro cromosoma no homólogo. Tienen la posibilidad de ser:
  - Sencilla: parte del cromosoma pasa al cromosoma no homólogo.
  - ✓ Reciprocidad: 2 cromosomas no homólogos cambian un segmento entre ellos.
- Robertson: Los brazos cortos de 2 cromosomas no homólogos se pierden y los brazos largos se juntan en el centrómero para conformar un cromosoma.

### **2.2.5.3. Aberraciones cromosómicas numéricas**

Son cambios en la cifra de cromosomas de una especie.

Euploidía Una vez que el número de cromosomas nucleares en una célula humana es un múltiplo de 23, se llama euploidía. Por consiguiente, las células sexuales (23 cromosomas) y las células somáticas (46 cromosomas) son euploides tradicionales. No obstante, además puede haber situaciones anómalas en las que la proporción de cromosomas todavía es un múltiplo de 23, como un óvulo fertilizado con 23 cromosomas o un cigoto con 46 cromosomas de un solo papá, o un óvulo fertilizado con una más grande proporción de cromosomas pero continuamente un múltiplo de 23. Esto es lo que crea poliploides.<sup>40</sup>

### **2.2.6. Evaluación genotóxica**

El extracto de las plantas vasculares o superiores componen una mezcla compleja que abarcan una gran cantidad de sustancias que contengan la cualidad o propiedad de producir mutaciones a nivel del genoma.<sup>41</sup> y carcinogénicas, y su uso persistente ha sido vinculado con la concurrencia de enfermedades en las personas que lo usan de manera tradicional, es aquí donde radica el potencial peligro que implica el consumo excesivo, y de manera indiscriminada de remedios, y de la medicina de origen vegetal, ya que aún hasta el momento es desconocida y con muy pocos estudios acerca de que éstas plantas que son una gran farmacia natural, tengan una acción mutagénica,

ya que son consumidas desde la antigüedad por la población<sup>42</sup>.

La ciencia de genes toxicológicos cultiva los resultados mutagénicos de las sustancias químicas y la radiación, así como los efectos de la exposición a mutágenos en la salud humana, teniendo presente las mutaciones genéticas inducidas (cambios en uno o diversos pares de bases), errores cromosómicos (cambios en la organización) o costo numérico (aneuploidía y poliploidía gracias a la predominación de los elementos de la mitosis o meiosis) también cambios en el ADN (alquilación de bases, formación de aductos, inserción de bases), mecanismos de compostura (efectos aumentados sobre varios mutágenos) y eventos de recombinación en la mitosis.<sup>43</sup>

Las mutaciones del ADN conforman la fase elemental de la aparición y el desarrollo del tumor. Por cierto, muchas sustancias con actividad carcinogénica además poseen actividad mutagénica y la activación de oncogenes es un resultado directo de la actividad mutagénica del compuesto. La necesidad de valorar la actividad mutagénica de un enorme conjunto de carcinógenos potenciales ha llevado al desarrollo de pruebas a corto plazo.

No obstante, el ingerir plantas medicinales puede provocar inconvenientes a causa de la toxicidad inherente, identificación equivocada, falsificación, contaminación, colaboraciones medicamentosas o falta de estandarización de las plantas medicinales. El abuso de plantas medicinales puede estar referido con la toxicidad y carcinogénesis de diversos órganos (sangre, riñón, corazón, hígado, sistema nervioso central y piel)<sup>44</sup>

El principal objetivo que se obtiene al realizarse investigaciones sobre la genotoxicidad, es demostrar cuál es el tipo y/o a qué nivel de la estructura del material genético (ADN) ocasiona daño el mutágeno a estudiar. En conformidad con lo dicho, se distingue 4 grados de mutación: mutación génica (grado I), mutación cromosómica (grado II), daño primario del ADN (grado III), transformaciones celulares (grado IV), entre otros grados. Referente a las pruebas en relación a los primeros dos grados varían significativamente, pero también son ensayos más comúnmente realizados, específicamente ensayos *in vitro*, esto debido a que tienen la particularidad de poseer gran sensibilidad y precisión.<sup>37</sup> Estudios recientes se han realizado ensayos para determinar, cuantificar el daño ocasionado a nivel principal del material genético (ADN), que hoy en día han obtenido una enorme importancia en la indagación de la genotoxicidad<sup>40</sup>.

### **2.2.7. Electroforesis en gel**

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica extensamente usada para segmentar, identificar y purificar fragmentos de ADN. La agarosa es un polímero lineal producido desde algas en el cual la migración de moléculas de ADN de doble hebra es inversamente proporcional al logaritmo ( $\log_{10}$ ) de su tamaño molecular.

Debido al dispositivo de fosfato molecular, el ADN está cargado negativamente, por lo que la migración en la cámara de electroforesis es del electrodo negativo al electrodo positivo. La electroforesis en gel es uno de los procedimientos más potentes y convenientes para la separación de moléculas grandes, los más utilizados son los geles, geles de poliacrilamida y agarosa.<sup>46</sup>

La electroforesis se cimienta en el empleo de diversas matrices de soporte, originadas por la polimerización de sustancias que consienten el paso seleccionado de las moléculas acorde a tamaño.

El ADN extraído de las células se puede digerir con una enzima de restricción, la cual tiene como función fragmentar el ADN, esta enzima reconoce secuencias específicas en el ADN de doble cadena, hidrolizando ambas hebras, dando lugar a la formación de bandas que se separan por el método de electroforesis en gel de agarosa de acuerdo con el tamaño de dichos fragmentos<sup>47</sup>.

### **2.2.8. Espectrofotometría**

La base de la espectroscopia se debería a la función de las moléculas para absorber la radiación, incluida la radiación en el espectro ultravioleta visible. La longitud de onda de radiación que puede absorber una molécula y su eficiencia de absorción están sujetas a la composición atómica y las condiciones del medio ambiente (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo cual esta tecnología es una importante herramienta de medición y caracterización de biomoléculas. Las moléculas tienen la posibilidad de absorber energía luminosa y almacenarla como energía interna. Esto da lugar a la fotosíntesis y otros ciclos de vida de plantas y bacterias. Una vez que la luz (catalogada como energía) es absorbida por una molécula, pasa del estado de energía importante o significativa E1 a un estado de energía preeminente (estadía excitada) E2. Únicamente se absorberá la energía que posibilita la transición al estado excitado. Cada molécula tiene una secuencia de estados excitados (o bandas) para distinguirla de otras moléculas. Por tal motivo, la absorción de una molécula a diversas longitudes de onda, o sea, su espectro de absorción,

constituye un símbolo de su identidad. Al final, las moléculas en el estado excitado liberan la energía absorbida al estado de energía importante. La espectrofotometría ultravioleta visible es una técnica analítica que puede decidir la concentración de compuestos en una solución, se fundamenta en el hecho de que las moléculas absorben la radiación electromagnética, y la proporción de luz absorbida es dependiente de la concentración de manera lineal. Para hacer esta clase de medición se usa un espectrofotómetro, en el cual se puede elegir la longitud de onda de la luz que atraviesa la solución, y se puede medir la proporción de luz absorbida por ella.<sup>48</sup>

### **2.2.9. Evaluación de la genotoxicidad *in vitro* por el “Método Tomasevich”**

Miranda<sup>1</sup> señaló el método enunció para puntear el efecto genotóxico *in vitro* de las plantas beneficiosas para la salud, que tienen efectos que poseen propiedades terapéuticas enfrentado al ADN genómico. Para utilizar esta técnica, es muy importante qué órgano de la planta es utilizado para uso medicinal, podría ser los tallos, flores u hojas y también semillas, de esta manera podremos extraer la muestra correcta, de ésta forma podremos utilizar el extracto acuoso, hidroalcohólico o con algún otro solvente orgánico, y si se va usar látex, usaremos de manera directa de la planta.

El procedimiento de Tomasevich se desarrolla preparando extractos de diferentes concentraciones: 1 miligramo / mL, 2.5 miligramo / mL, 5 miligramo / mL, 10 miligramo / mL, 25 miligramo / mL, 50 miligramo / mL y 100 miligramo / mL, 200 miligramo. / mL, 300mg / mL, 400mg / mL y 500mg / mL; si es látex, elaborar diluciones con concentraciones de 1%, 2.5%, 5%, 10%, 25%, 50% y 100%. El ADN genómico además se puede obtener de los organismos a aprender: humanos, animales o microorganismos. Utilice kits comerciales o extractos orgánicos para aseverarse de que el ADN se encuentre intacto y independiente de fragmentación o rotura; después prepare una reserva de 200  $\mu$ L con una concentración de 1.500 ng /  $\mu$ L de líquido.

Para realizar pruebas de genotoxicidad *in vitro* por fragmentación del ADN, se marca una secuencia de 9 tubos con 500  $\mu$ L; Coloque 14  $\mu$ L de ADN del suministro en el que pasa del No. 1 al 7, y luego agregue 6  $\mu$ L de todas las concentraciones del extracto o látex a los tubos correspondientes del 1 al 7; El tubo # 8 será “blanco”, agregue 14  $\mu$ L de extracto 100% o látex 100%, más 6  $\mu$ L de agua bidestilada; El tubo n° 9 se usa como "control", agregando 14  $\mu$ L de ADN más 6  $\mu$ L de agua bidestilada; El tubo n.° 10 está lleno con 14  $\mu$ L de ADN

más 6 µL de extracto 100% o látex 100% más 6 µL de enzima proteinasa K, esto se usa para “descartar la existencia de nucleasas”, cada serie de tubos se va incubar a baño María a 37°C a lo largo de una hora o hasta 4 horas si es preciso. A parte de un índice de tamaño atómico (50 pb), dichos productos de prueba se introducen a electroforesis a 40 voltios a lo largo de 3 h en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1%, después se visualizan en radiación ultraligera y se hace el registro fotográfico. Dichos registros fotográficos presentan la actividad genotóxica por fragmentación del ADN de las 7 concentraciones ensayadas; el "costo en blanco" se usa para verificar que el extracto o el látex no tienen dentro ADN contaminante; el "control" se usa para igualar la cantidad de ADN sin el método respecto a los 7 tubos que fueron sometidos al método; y el "descarte de nucleasas" para revisar el impacto por medio de la acción de los metabolitos secundarios, sin embargo no por medio de la actividad nucleasa, debido a que dichos serían acabados por la acción de la proteinasa K en el lapso de incubación. El nivel de fragmentación es un porcentaje comparable en una escala numérica de cero a 4. Se concluye que el procedimiento Tomasevich es eficaz y eficiente para establecer la genotoxicidad de las plantas medicinales por medio de la fragmentación del ADN.<sup>4,41</sup>

#### **2.2.10. Ensayo cometa**

La prueba del cometa permite medir las roturas del ADN monocatenario y bicatenario provocadas por un determinado compuesto después de que se hayan eliminado proteínas, péptidos y carbohidratos de las células tratadas. Las células evaluadas se incrustaron en agarosa sobre un portaobjetos de vidrio, se lisaron con detergente, se trataron con sal y se sometieron a electroforesis. El ADN roto se extiende hacia el ánodo para formar la "cola" del cometa, mientras que el ADN intacto permanece en la "cabeza". Después de teñir el ADN con tintes fluorescentes, se puede ver bajo un microscopio de fluorescencia. Este ensayo es utilizado con mucha frecuencia porque nos permite visualizar y calcular el deterioro en el material genético (ADN) de las células. El mal provocado en el material genético, principalmente es reparado enzimáticamente, sin embargo el mal no reparado, se acumula y con la época puede dañar mecanismos de control del periodo celular, comunicación citoplasmamitocondria, expresión génica, entre otros<sup>49</sup>.

#### **2.2.11. Metabolitos secundarios**

Poseen una repartición restringida en el reino vegetal, desea mencionar, que los pudimos encontrar muchas veces en una sola especie de vegetal o conjunto de

especies en relación, a diferencia de los metabolitos primarios se hallan a lo largo del reino vegetal. Son productos orgánicos que no parecen tener una funcionalidad directa en el incremento y desarrollo, productos secundarios o productos naturales, no poseen funcionalidad reconocida o directa en los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, etc<sup>55</sup>. El aspecto metabólico que distingue al reino animal del reino vegetal es la capacidad de las plantas para producir sustancias que no son necesarias para su supervivencia. Estas sustancias se denominan metabolitos secundarios y los animales superiores rara vez las producen, aunque ocasionalmente se encuentran en insectos y otros invertebrados. Algunos metabolitos secundarios existen solo en ciertas especies y realizan funciones ecológicas específicas, como atraer insectos para que les pasen el polen o atraer animales para que consuman frutas para esparcir semillas; también pueden usarse para atacar a herbívoros o microorganismos patógenos. La defensa natural. Los insecticidas también pueden sintetizar metabolitos secundarios para hacer frente al daño de ciertos tejidos vegetales, así como resistir los rayos ultravioleta y otros factores físicos agresivos, e incluso actuar como microorganismos simbióticos para señales de comunicación entre plantas.<sup>56</sup>

#### **2.2.11.1. Flavonoides**

Metabolito secundario de tipo fenilpropano mayormente se puede encontrar de manera natural como O-glicósido, también como agliconas, se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas, también se les encuentran en líquenes y musgos, y en casi todas las familias de las plantas superiores. Su función de este metabolito no ha sido claramente establecida, pero existen evidencias de propiedades protectoras contra la radiación UV-B, como las fitoalexinas, antibacterianos, coloración y sabor característico, se han encontrado en la literatura que el O-glicósido presenta propiedades alelopáticas<sup>57</sup>.

#### **2.2.11.2. Azúcares reductores**

Azúcares que se transportan por el floema de la planta, como es la glucosa y fructosa entre otros, que se pueden acumular en hojas y tallos actuando en la osmorregulación, disminuye el punto de congelación del citoplasma, diluye componente tóxico y estabilizando proteínas y membranas, su acumulación está relacionada con la tolerancia al congelamiento y a las bajas temperaturas<sup>58</sup>.

#### **2.2.11.3. Alcaloides**

Metabolito secundario que contiene nitrógeno y se encuentra en un 20% de las plantas vasculares, son los más conocidos por sus efectos farmacológicos que

tiene sobre los animales vertebrados. Son difíciles de conceptualizar porque no representa un grupo homogéneo de compuestos, son compuestos heterocíclicos, muchos de ellos son alcalinos, protonados (cargados positivamente), generalmente soluble en agua. Se sintetizan a partir de los aminoácidos, lisina, tirosina, y triptófano. Protegen a la planta de animales herbívoros<sup>55</sup>.

#### **2.2.11.4. Fenoles**

Son composiciones químicas que se hallan extensamente en frutas y vegetales. Es una de las clases más relevantes de metabolitos secundarios en plantas derivados primordialmente de fenilalanina y, en menor medida, de tirosina<sup>1</sup>. Trabajan como antioxidantes naturales en los alimentos, y esta actividad antioxidante se ha referente con su funcionalidad defensora en las patologías cardiovasculares y el cáncer<sup>2</sup>. En medio de las características de los fenoles, se les atribuye el papel de los antibióticos, que se aplican como pesticidas naturales y protectores contra los relámpagos UV<sup>59</sup>.

#### **2.2.11.5. Taninos**

Los taninos son diversos compuestos fenólicos con la particularidad de que se integran a las proteínas y precipitan. El nombre de taninos hace referencia al procedimiento de curtido en el cual la dermis de los animales se convierte en cuero. Básicamente, los taninos extirpados de las plantas se utilizaban para procesos de habla hasta que fueron sustituidos por minerales. Están en hojas, frutos y cortezas. Se hallan en roble (*Quercus sp.*), Castaño (*Castanea sp.*), Entre otros. Dichos compuestos complicados forman parte de la custodia de una planta contra infecciones y herbívoros.<sup>60</sup>

#### **2.2.11.6. Catequinas**

Son el tipo de compuestos más común, el nombre procede del árbol de mimosa (*Cassia catechu*), del cual se sitió catecol por original ocasión, están presentes en muchas plantas alimenticias, las más exitosas; Granos de cacao, té, arándanos y vino. El impacto astringente en la boca luego de comer productos de chocolate o tomar té verde o vino se debería de alguna forma a su presencia. Se contemplan composiciones bioactivas. Ejemplificando, la catequina se ha implicado en la inhibición de la trombosis arterial, la actividad antiinflamatoria, la reducción del colesterol total y las lipoproteínas de baja densidad como parte de su capacidad antioxidante in vivo<sup>60</sup>.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de ejecución

El trabajo de indagación presentado fue desarrollado en las instalaciones de la casa de estudios, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH), desde el mes de febrero al mes de setiembre del año 2019 en la ciudad de Ayacucho. El proceso de tamizaje fitoquímico de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo", se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de Facultad de Ciencias de la Salud. La identificación taxonómica fue realizada en el Laboratorio de Botánica por parte de la Bióloga Laura Aucasime (Anexo 1 y 2); y la obtención de ADN genómico humano, ADN genómico de *Escherichia coli*, así como las pruebas de genotoxicidad, fueron realizadas en las instalaciones del Centro de Biología Molecular y Bioinformática (CIBMB) de la Facultad de Ciencias Biológicas. Con las siguientes coordenadas: 13°08'53"S 74°13'12"O.

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

##### 3.2.1. Población

Estuvo constituida por matas de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo" que se desarrollan en el distrito de Huanta, provincia de Huanta, región Ayacucho. Con las siguientes coordenadas: Latitud: -12.94, Longitud: -74.2478 12° 56' 24" Sur, 74° 14' 52" Oeste.

##### 3.2.2. Muestra

Hojas y tallos de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo" en cantidad de dos Kilos, respectivamente. Las muestras fueron obtenidas de un huerto del distrito de Huanta en la región Ayacucho, luego transportadas al Laboratorio del CIBMB, para su respectivo procesamiento.

##### 3.2.3. Muestreo

Muestreo de tipo no probabilístico o dirigido, donde se obtuvo subgrupo de la



población muestra, la cual se seleccionó los componentes, de acuerdo al tipo de investigación, mas no de la probabilidad.

#### **Criterios de inserción**

Matas de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo” frescas y en buen estado.

#### **Criterios de exclusión**

Matas de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo” marchitas y en mal estado.

### **3.3. Unidad experimental**

ADN genómico humano y ADN genómico de *Escherichia coli* a concentración de 1500 ug/μL por cada prueba, respectivamente.

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

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

Los especímenes de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo” se obtuvieron mediante la recolección en un huerto ubicado en distrito de Huanta sito en la región de Ayacucho, y fueron inmediatamente transportadas al laboratorio del CIBMB para su procesamiento y al Laboratorio de Botánica para la identificación taxonómica.

#### **3.4.2. Procesamiento de la muestra de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo”**

**Secado.**- Las muestras fueron lavadas con agua a presión a fin de remover los vestigios de tierra. Para su conservación y tener buen secado, se colocaron a condiciones ambientales adecuadas, es decir, bajo sombra, temperatura del ambiente y como soporte se usa el papel madera (kraft) los cuales fueron cambiadas continuamente y volteadas las muestras con el objetivo de obtener un desecado homogéneo, previniendo la degradación ocasionado por humedad y apartando las partes de la planta que se observen alteradas en el color o exhiban signos de deterioro y/o alteración.

**Molienda.**- Se realizó en mortero de porcelana previamente esterilizado, las muestras secas se molieron hasta obtener un polvo fino.

#### **3.4.3. Obtención de los extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo”**

Se pesó 100 gr de muestra seca y pulverizada, tanto de hojas como de tallos de manera separada, cada una de ellas se vaciaron en su respectivo frasco de vidrio color ámbar y se agregaron a cada uno 1 L de solvente etanol: agua (3:1) que resultó de mezclar 750 ml de etanol de 96° con 250 ml de agua bidestilada estéril; cubriendo a las muestras. Se estuvo agitando los frascos por un tiempo de 15 minutos en un intervalo de dos veces al día, por un plazo de 7 días del macerado, con el objetivo de que el solvente se disperse uniformemente en las

muestras, estos frascos de los macerados se conservaron en un lugar fresco, seco y en sombra. Seguidamente se filtró usando papel filtro, luego se llevó cada filtrado, al dispositivo de evaporador rotatorio BUCHI-3000 a una presión limitada, y reducida, por último se congeló a sequedad llevando a una estufa MEMMERT a 37°C. Después de estos extractos se ejecutó las determinaciones cualitativas fitoquímicas y se dispuso las diversas concentraciones del extracto o látex para los ensayos de genotoxicidad. (Anexo 4)

#### 3.4.4. Tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo”

La marcha fitoquímica cualitativa de los extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo” respectivamente, fueron realizados para su identificación de los diversos metabolitos secundarios. Las pruebas para la identificación se realizaron prosiguiendo el método propuesto por Lock<sup>50</sup>. (Anexo 10).

**Tabla 1.** Características obtenidas mediante pruebas para identificar metabolitos secundarios de plantas.

Metabolitos secundarios	Ensayos: con reactivos	Observación
Alcaloides	Dragendorff	Formación de un precipitado en la totalidad de las reacciones, si es positivo.
	Mayer	
	Hager	
	Wagner	
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	Precipitado formando una coloración de anaranjado a rojo.
Flavonoides	Shinoda	Color amarillo, anaranjado, o rojo en la etapa amílica
Quinonas	Borntrager	Si es positivo la fase amoniacal es de color rojizo o rosada.
Catequinas	Catequinas	Coloración verde carmelita a luz UV, indica un ensayo positivo.
Saponinas	Espuma	Si es positivo hay formación de espuma en la superficie.
Azúcares reductoras	Benedict	Formación de precipitado rojo ladrillo, en caso de ser positivo
Taninos y/o fenoles	Cloruro férrico	Formación de una coloración verde intenso, azul o negruzca.
Aminas (aminoácidos)	Ninhidrina	Se da coloración violeta.
Cardenólidos	Kedde	Coloración violácea.

Fuente: según Lock<sup>50</sup>

#### 3.5. Extracción de ADN genómico a partir de sangre humana

Este proceso se lleva a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática, y se obtiene una bolsa de recolección de

sangre "cuádruple" separada que contiene paquetes de glóbulos blancos (para desechos), esto es a través del Hospital Regional de Ayacucho Una donación del banco de sangre "Miguel Ángel Mariscal Llerena", del cual se obtuvo un paquete de glóbulos blancos. Este procedimiento se basa en el procedimiento descrito en Lodish.<sup>51</sup> (Anexo 7).

### **Procedimiento**

1. Se transfirió 1 ml de plasma (sangre) a un tubo de centrifuga con tapa, se agregaron 9 ml del tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,7), recientemente calentado a 37°C.
2. Se mezcló y se preparó a 37°C por un tiempo de 30 minutos, luego centrifugamos a 2,500 rpm por un tiempo de 10 minutos para sedimentar los glóbulos blancos.
3. Se desechó el excedente aspirando con la ayuda de una pipeta Pasteur sobrando 1ml del centrifugado en la base del tubo.
4. Se repite el procedimiento, es decir, agregar Tris HCl 50 mM luego centrifugar, repetir 3 veces hasta obtener una solución de color claro.
5. Se agregó 1ml de centrifugado, 9ml de solución salina (NaCl al 0.85%) se homogenizó luego se centrifugó a 2,500 rpm por 10 minutos.
6. Se aspiró luego se descartó el excedente dejando solo el sedimento, se resuspendió el sedimento en 0,5 ml de la solución *High* TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 100 mM). Se resuspendió el sedimento y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 2 ml.
7. Se adicionó 0,5 ml de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 40 mM; SDS al 1%; NaCl 10 mM). Atemperado a 50°C.
8. Se adicionó 10 µL de solución de proteinasa K (20 mg/ml) y se puso a incubar por una noche a 53°C.
9. Se agregó 1 ml de solución fenol saturado con Tris: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), y se homogenizó con movimientos suaves, en forma invertida un lapso de 10 minutos.
10. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos para obtener dos fases de la solución, luego se aspiró la fase acuosa que se encuentra en la parte superior del tubo conteniendo el ADN luego se transfirió a otro tubo nuevo y limpio para microcentrífuga de 2 ml.
11. Se añadió a la fase acuosa 1ml de solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) homogenizando por inversión con movimientos suaves por un lapso

de 5 minutos. Luego se procedió a centrifugar 12,000 rpm durante 10 minutos. Se aspiró la fase acuosa que contiene el material genético (ADN) y se transvasó a un tubo nuevo y limpio de microcentrífuga de 2 ml.

12. Se volvió a realizar el método anterior con el objetivo de obtener una fase acuosa totalmente clara, transparente.
13. Se adicionó alcohol isopropílico frío y se dejó en reposo por 1 hora en la nevera. Luego se llevó a la centrífuga 12,000 rpm durante 15 minutos.
14. Se desechó de manera cuidadosa el sobrenadante para luego enjuagar el sedimento con 1 ml de etanol al 70 %.
15. Se llevó a la centrífuga a 12,000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el alcohol, luego se dejó a temperatura ambiente para dejar que seque el sedimento.
16. Se volvió a suspender el sedimento colocando 200  $\mu$ l de la solución *Low TE* (Tris HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 1 Mm), y finalmente se lleva a la nevera para su conservación y posterior uso.

### **3.6. Cultivo de *Escherichia coli* y extracción del ADN genómico**

Se realizó la reactivación de la cepa *Escherichia coli*, en caldo EC incubándose a 37°C durante 24 horas, luego se sembró por agotamiento de superficie sobre agar Müller Hinton (MH) incubándose a 37°C durante 24 horas, con el objetivo de obtener una biomasa bacteriana y a partir de ella se extrajo el ADN genómico con el siguiente protocolo, de acuerdo a Yoc<sup>52</sup>: (Anexo 6)

1. Se anexó 400  $\mu$ L de tampón buffer 1X TE en un tubo eppendorf de 2 ml, utilice un anillo kolle para transferir alrededor de 100 miligramo de conjuntos de células de cultivos adolescentes de *E. coli* y después desactívelos a 85°C a lo largo de 25 min.
2. Añadir 60  $\mu$ L de lisozima (10 miligramo/mL) e incubar en un baño de agua a 37°C a lo largo de 2 horas.
3. Posteriormente, añada SDS / Proteasa K (75  $\mu$ L de SDS al 10% + 5  $\mu$ L de PK 10 miligramo/mL) e incube a 65°C a lo largo de 15 min.
4. 100  $\mu$ L de NaCl 5 M más 5  $\mu$ L de CTAB (bromuro de N-cetil-N, N, N-trimetilamonio), incubar a 65°C a lo largo de 15 min.
5. Adicionar 750  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1), homogeneizar delicadamente a lo largo de 5 min y centrifugar a 14.000 rpm a lo largo de 15 min.
6. Luego de conformar 2 capas en el tubo eppendorf, transfiera con cuidado el

sobrenadante a otro tubo eppendorf.

7. Se añadió 600 µL isopropanol frío, luego se llevó el tubo a – 20°C durante toda la noche.
8. Luego, se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos y se desechó el sobrenadante.
9. Se añadió 1 mL de etanol al 70%, y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min.
10. Se desechó el sobrenadante, dejando evaporar el etanol y se hidrató el sedimento agregando 50 µL de agua bidestilada estéril.
11. Se añadió 1 µL ARNasa de 20 mg/ µL y se incubó a 37°C por un tiempo de 1 hora.
12. Luego se procedió a guardar a temperatura de – 20°C incluso su uso posterior.

### **3.7. Cuantificación y observación de la calidad de ADN genómico de *Escherichia coli*.**

#### **3.7.1. Por espectrofotometría**

La cuantificación del ADN obtenido de las diferentes muestras, se realizó con el siguiente procedimiento: Yoc<sup>52</sup>.

Se homogenizó agitando con movimientos suaves (diez veces), los ejemplares de ADN con un micropipeto de 100 µL previamente desinfectada.

1. Se adecuó el espectrofotómetro UV marca Eppendorf Bio Photometer ® plus, con el objetivo de ponderar cuantitativamente el ADN.
2. Se utilizó 2 µL de agua bidestilada esterilizada, con el objeto de realizar una limpieza de la superficie de muestra del adaptador, luego de un rato se absorbió ésta agua utilizando papel “tisú”, y se repitió dos veces para garantizar una mejor limpieza.
3. Nuevamente se depositó otros 2 µL de agua bidestilada estéril sobre la superficie del adaptador, se colocó la tapa de factor 50 – Lp 0,2 mm para luego presionar la opción BLANK para calibrar y obtener “cero de Absorbancia” (0.000 A°).
4. Se absorbió el agua utilizando papel “tisú”, luego se colocó 2 µL de la muestra de ADN, se colocó la tapa y presionó la opción SAMPLE con la finalidad de hacer lectura de los resultados de la cuantificación y pureza de ADN, en la pantalla del equipo; luego se absorbió la muestra con papel “tisú”.
5. Se realizaron de nuevo los pasos d) y e) para la cuantificación de cada muestra de ADN.

- Una vez finalizada la cuantificación de ADN, se agregó 2  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril, luego de 30" se secó con papel "tisú" y finalmente apagar el equipo.

### 3.7.2. Por electroforesis

La calidad, en términos de integridad del ADN obtenido de las diferentes muestras, fue visualizada mediante electroforesis, realizando los siguientes pasos:

- Alistamos el volumen de carga para la electroforesis en gel de agarosa al 1% para cada muestra de ADN conforme con la sucesiva tabla.

**Tabla 2.** Premisa de carga de ADN para visualizar banda en electroforesis. Ayacucho, 2019. Yoc<sup>52</sup>.

Nº de carril en gel de agarosa	ADN ( $\mu\text{L}$ )	Buffer <i>Loading</i> 6X ( $\mu\text{L}$ )	Agua grado PCR ( $\mu\text{L}$ )	Volumen final de carga ( $\mu\text{L}$ )
01	07	01	02	10

- Coloque todo el contenido de la mezcla individualmente en cada pocillo del gel de agarosa al 1%, en su propio carril.
- Después, conecte la cámara de electroforesis a una fuente de energía y déjela funcionar a 30 voltios a lo largo de 1 hora.
- Sumerja el gel de agarosa en un recipiente que contenga bromuro de etidio al 1% a lo largo de 15 min, después enjuague cuidadosamente 2 veces con agua del grifo o agua del grifo y después visualícelo con radiación ultravioleta en el sistema de registro de datos. Biometra UV solo tiene imágenes de la marca TS. Miranda.<sup>54</sup>

### 3.8. Ensayo de genotoxicidad *in vitro* "método Tomasevich"

Los ADN genómicos humano y de *Escherichia coli*, fueron sometidos a los ensayos de genotoxicidad, independientemente, siguiendo el procedimiento descrito en Miranda<sup>54</sup> con las siguientes etapas: (Anexo 5)

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

La muestra de ADN, fue cuantificada por espectrofotometría UV, en un equipo marca Eppendorf BioPhotometer plus; a partir del cual se preparó un stock a concentración de 1 500 ng/ $\mu\text{L}$  en volumen final de 200  $\mu\text{L}$ , para cada ensayo de genotoxicidad de la planta medicinal en estudio.

### 3.8.2. Fase de ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo", sobre ADN genómico

Se realizó la preparación en primer lugar las soluciones del extracto hidroalcohólico de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo", a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, para el primer ensayo; posteriormente se preparó concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente, para el segundo ensayo.

Además, prepare el tubo con 14 µl de ADN más 6 µl de extracto de concentración más alta y 3 µl de proteinasa K.

Las condiciones de la mezcla utilizada para las pruebas de genotoxicidad *in vitro* del ADN genómico son las siguientes:

**Tabla 3.** Concentraciones de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo" para preparar una mezcla para pruebas de genotoxicidad *in vitro* de extractos de ADN genómico.

Condiciones		Mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>								
Nº de tubo		01	02	03	04	05	06	07	08	
							B	C	c/PK	
Stock de ADN (1 500 ng/µL)	Vol. en µL	14	14	14	14	14	-	20	14	
Extracto hidroalcohólico de "ajenjo"	Concentración (%)	5	10	25	50	100	100	-	100	
	Volumen (µL)	06	06	06	06	06	20	-	06	
Proteinasa K		-	-	-	-	-	-	-	03	
Volumen total (µL)		20	20	20	20	20	20	20	23	
Incubación en baño María a 37 °C		1 hora								

**Tabla 4.** Concentraciones de extractos alcohólicos de agua de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo" en el ADN genómico para preparar una mezcla para las pruebas de genotoxicidad *in vitro*.

Condiciones		Mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>								
Nº de tubo		01	02	03	04	05	06	7	8	9
								B	C	c/PK
Stock de ADN (1 500 ng/µL)	Vol. en µL	14	14	14	14	14	14	-	20	14
Extracto hidroalcohólico de "ajenjo"	Concentración (%)	50	100	200	300	400	500	500	-	500
	Volumen (µL)	06	06	06	06	06	06	20	-	06
Proteinasa K		-	-	-	-	-	-	-	-	03
Volumen total (µL)		20	20	20	20	20	20	20	20	23
Incubación en baño María a 37 °C		1 hora								

Se repitió cuatro veces cada prueba de genotoxicidad *in vitro* de la planta medicinal *Artemisia absinthium* L. "ajenjo" a estudiar.

### 3.8.3. Fase de electroforesis para la detección de genotoxicidad

Se procedió a preparar un gel de agarosa al 01% colocándolo luego en una cámara de electroforesis marca Biometra. Para el espesor de carga en el pozo de gel de agarosa, se empleó la porción especificada en el sucesivo tablón:

**Tabla 5.** Digestión de ADN genómico y el extracto hidroalcohólico extraído de Artemisa "ajenjo" se usaron para elaborar un volumen de solución en los pocillos de gel de agarosa para prueba de genotoxicidad *in vitro*, conjunto 1, Ayacucho 2019.

Condiciones		Volúmenes de carga para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>								
Nº de carril del gel		01	02	03	04	05	06	07	08	09
Muestra	Concent. (mg/mL)	Marcador molecular*1kb	05	10	25	50	100	B	C	c/PK
ADN-Ext	Volumen (µL)	05	08	08	08	08	08	08	08	08
	Loading (µL)	02	02	02	02	02	02	02	02	02
	Volumen total (µL )	07	10	10	10	10	10	10	10	10

\*Marcador de tamaño molecular de 1Kb, marca England biolabs (1 kb PLUS TM DNA Ladder).

Después hizo la instalación de la cámara de electroforesis en la fuente de energía y prográmela para que funcione a 40 voltios (V) a lo largo de 150 min.

**Tabla 6.** Digestión de ADN genómico y el extracto hidroalcohólico extraído de Artemisa se utilizan para preparar un volumen de solución en los pocillos del gel de agarosa. "ajenjo", para ensayo de genotoxicidad *in vitro*, grupo 2. Ayacucho 2019.

Condiciones		Volúmenes de carga para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>									
Nº de carril del gel		01	02	03	04	05	06	07	09	10	11
Muestra	Concent. (mg/mL)	Marcador molecular*1kb	50	100	200	300	400	500	B	C	c/PK
ADN-Ext	Volumen (µL)	05	08	08	08	08	08	08	08	08	08
	Loading (µL)	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02
	Volumen total (µL )	07	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Después hizo la instalación de la cámara de electroforesis en la fuente de energía y prográmela para que funcione a 40 voltios (V) a lo largo de 150 min.

### 3.8.4. Fase de lectura por radiación UV

Después de la electroforesis, sumerja el gel de agarosa en una solución de bromuro de etidio al 1% durante aproximadamente 15 minutos, lavé dos veces con una gran cantidad de agua destilada haciendo observación de las bandas genotóxicas y/o los productos de fragmentos de ADN. Coloqué el gel de agarosa en radiación Biometra UV dentro del Sistema de grabación de imágenes UVsolo TS.



### 3.8.5. Fase de interpretación visual y clasificación de la genotoxicidad, en el registro fotográfico

El nivel de fragmentación del ADN debido a la genotoxicidad del derivado de la planta medicinal en estudio, que son visualizados en el registro fotográfico, se llevaron a una escala de valores numéricos, están fundamentados en la categorización del “ensayo cometa” planteado por Speit (1995) y Collins (2004), en el trabajo de investigación de Mónica Marisol Larrea Poma.<sup>53</sup>

**Tabla 7.** Clasificación visual de la fragmentación *in vitro* del ADN, en términos de niveles de su fragmentación (valores numéricos), observados en registro fotográfico.

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

Fuente: Larrea Poma M, 2007

### 3.9. Tipo de investigación

La investigación realizada corresponde al tipo experimental, debido a que este estudio reúne los requisitos fundamentales para obtener validez interna y control: a) semejanza entre los grupos, y b) conjuntos de comparaciones (manejo de la variable independiente).

### 3.10. Diseño de investigación

La averiguación elaborada ha sido un diseño de conjunto de control y posprueba, que ha incluido 2 equipos: un conjunto recibió procedimiento empírico y el otro conjunto no recibió procedimiento (grupo de control). Al operar la variante independiente, muestra 2 niveles: vida e inexistencia. Finalmente del funcionamiento de ambos conjuntos, se mide la variable dependiente en análisis.

**Tabla 8.** Diseño de investigación con post ensayo únicamente y grupo de control.

Grupo	Tiempo de incubación	Tratamiento	Observación
G <sub>1</sub>	1 hora	Control	O1
		blanco	O2
		5mg/mL	O3
		10mg/mL	O4
		25mg/mL	O5
		50mg/mL	O6
		100mg/mL	O7
		200mg/mL	O8
		300mg/mL	O9
		400mg/mL	O10
		500mg/mL	O11
		Pk	O12

Se realizaron cuatro repeticiones de cada ensayo.

### **3.11. Análisis de datos estadísticos**

Los datos conseguidos se resumen y muestran en tablas, con fotografías y figuras para describir y verificar los resultados de la encuesta. El valor del daño del grado de ADN expresado se cree usando el paquete estadístico SPSS 23 versión, usando la prueba de Kruskal-Wallis, la más conveniente para muestras no paramétricas. Un valor con  $p < 0,05$  se considerará un grado significativo estadísticamente.

Por ello se plantea la siguiente hipótesis:

H<sub>0</sub> = No presenta genotoxicidad.

H<sub>i</sub> = Presenta genotoxicidad.

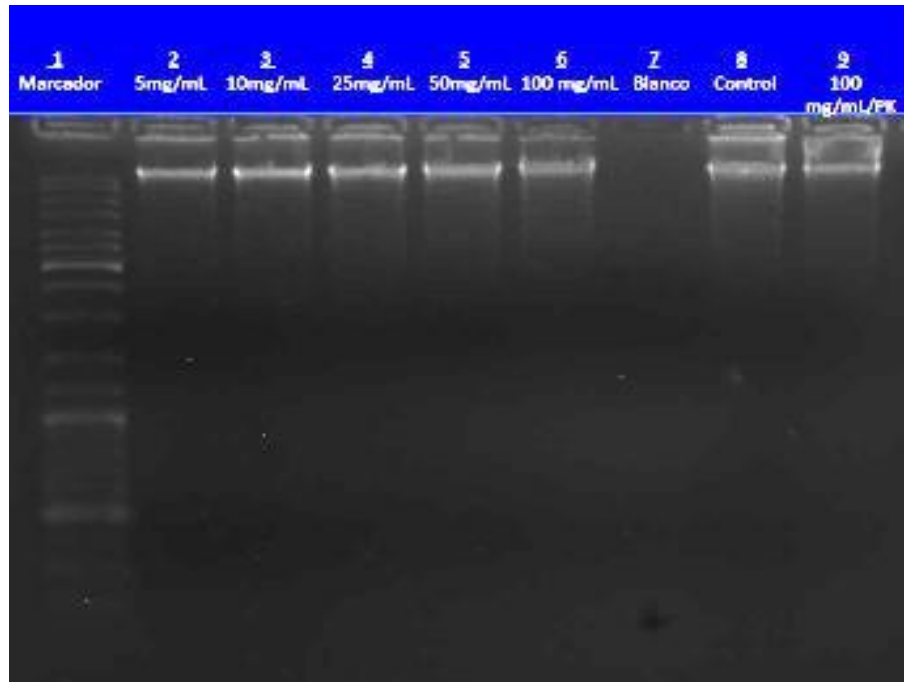
## **IV. RESULTADOS**

**Tabla 9.** Cribado fitoquímico para identificar los metabolitos secundarios existentes en los extractos hidroalcohólicos de las hojas y tallos de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo". Ayacucho, 2019.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Extracto hidroalcohólico <i>Artemisia absinthium</i> L. "ajenjo"		Observaciones
		Hojas	Tallos	
Alcaloides	Dragendorff	+++	+++	Hay formación de precipitado en todas las reacciones
	Mayer	+++	+++	
Fenoles y/o taninos	Cloruro Férrico	++++	++++	Formación de una coloración negruzca
	Shinoda	+++	++++	Hay una coloración amarilla, naranja, carmelita o rojo en la fase amilica
Aminoácidos libres	Ninhidrina	++++	++++	Coloración violeta
Catequinas	Catequinas	++	+++	Coloración verde carmelita a luz UV, indica un ensayo positivo
Azúcares Reductores	Benedict	Negativo	+++	Formación de precipitado rojo ladrillo
Sustancias reductoras	KMnO <sub>4</sub>	Negativo	Negativo	Incoloro en solución ácida. Precipitado marrón en neutro
Saponinas	Espuma	Negativo	Negativo	Formación de espuma al superficie
Cardenólidos	Kedde	Negativo	Negativo	No hay coloración violácea

Leyenda:

- (-) : Negativo
- (+) : Trazas
- (++) : Poco
- (+++): Regular
- (++++): Abundante



**Figura 1.** Registro fotográfico del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/ml, frente a ADN genómico humano incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.

Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de tamaño molecular 1kb (England biolabs)

Carril Nº 2: Con 5 mg/ml

Carril Nº 3: Con 10 mg/ml

Carril Nº 4: Con 25 mg/ml

Carril Nº 5: Con 50 mg/ml

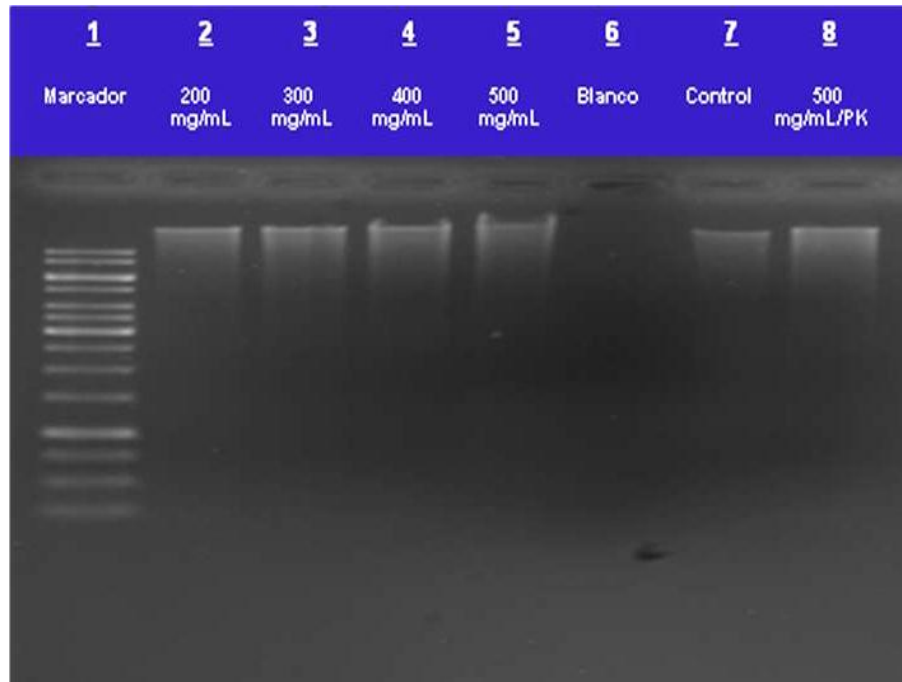
Carril Nº 6: Con 100 mg/ml

Carril Nº 7: Con 100 mg/ml del extracto hidroalcohólico (blanco).

Carril Nº 8: Con ADN puro (control).

Carril Nº 9: Con 100 mg/ml extracto hidroalcohólico + Proteínasa K Volumen de carga: Muestra (8 µL) + *loading* (2µL) = 10 µL. Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 150 minutos.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 15 minutos.



**Figura 2.** Registro fotográfico de la prueba genotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Artemisia absinthium* L. “ajeno” a concentrados de 200, 300, 400 y 500 mg/ml, frente a ADN genómico humano, incubado durante una hora a 37°C. CIBMB- UNSCH. Ayacucho 2019.

Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de tamaño molecular de 1Kb (England biolabs)

Carril Nº 2: Con 200 mg/mL

Carril Nº 3: Con 300 mg/mL

Carril Nº 4: Con 400 mg/mL

Carril Nº 5: Con 500 mg/mL

Carril Nº 6: Con 500 mg/mL del extracto hidroalcohólico (blanco).

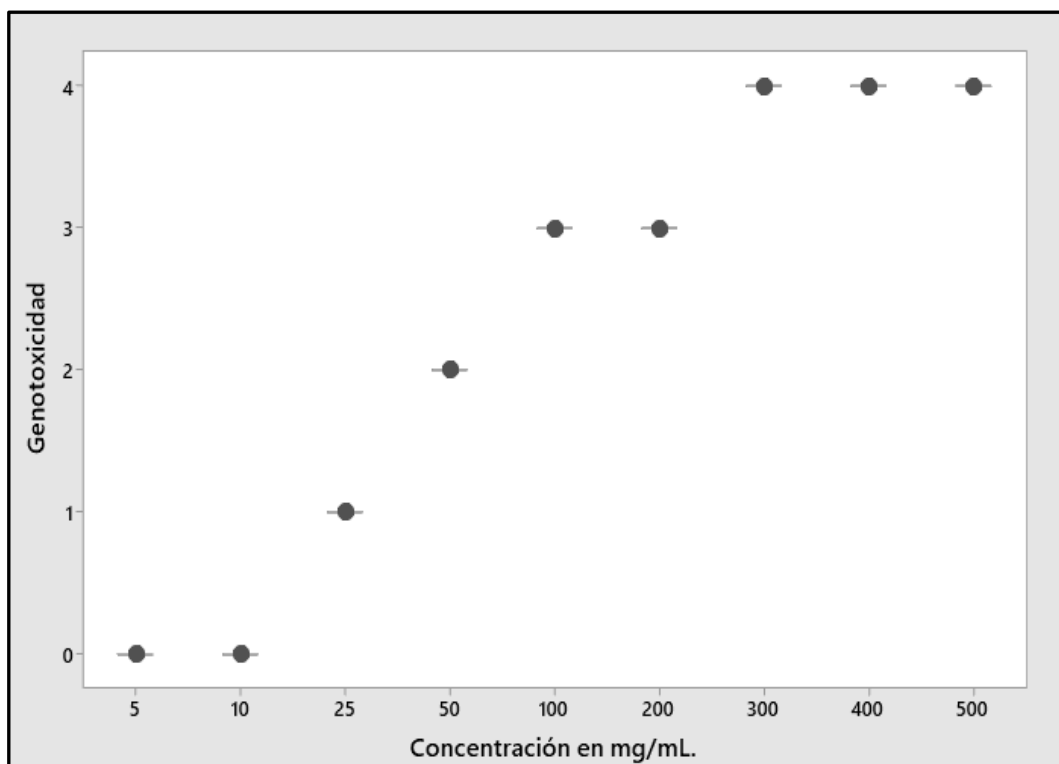
Carril Nº 7: Con ADN puro (control).

Carril Nº 8: Con 500 mg/mL del extracto hidroalcohólico + Proteinasa K Volumen de carga: Muestra (8 µL) + *loading* (2µL) = 10 µL. Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 150 minutos.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 15 minutos.

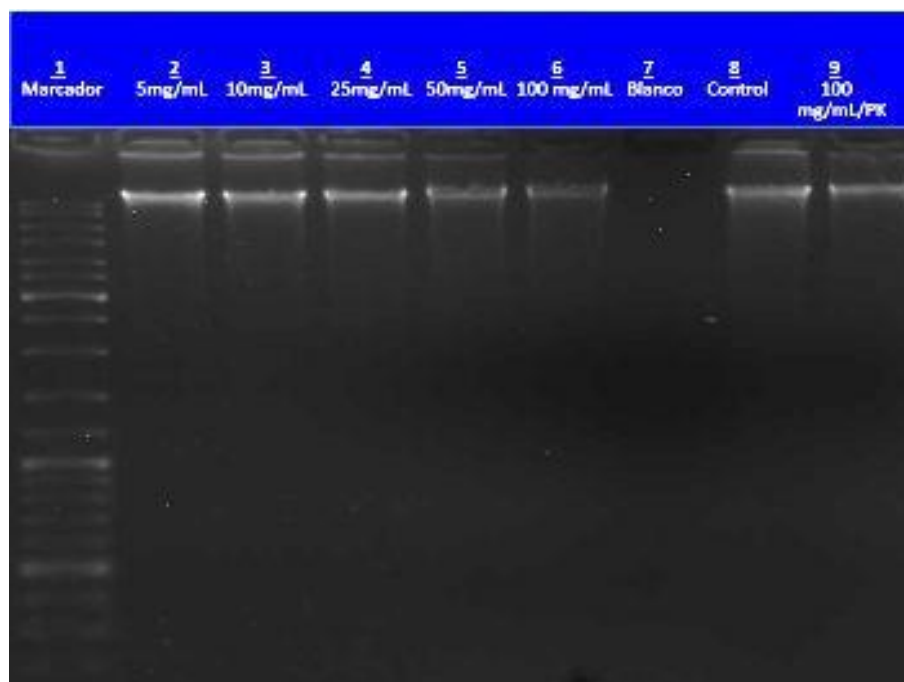
**Tabla 10.** Valores de prueba de genotoxicidad *in vitro* de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg / ml del extracto de agua y alcohol de hojas de "ajenjo" de artemisa. ADN genómico humano incubado a 37°C, 1 hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.

Condiciones de la incubación		<i>Artemisia absinthium</i> L. "ajenjo" Extracto hidroalcohólico de hojas									
Temperatura (°C)	Tiempo (hora)	Concentración en mg/mL									
		5	10	25	50	100	200	300	400	500	
		0	0	1	2	3	3	4	4	4	
37	1	0	0	1	2	3	3	4	4	4	
		0	0	1	2	3	3	4	4	4	
		0	0	1	2	3	3	4	4	4	



**Figura 3.** Nivel de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Artemisia absinthium* L. "ajeno" a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/ml, ante ADN genómico humano, incubado a 37°C a lo largo de una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019. Ensayo de Kruskal-Wallis (H=35,0, GL=8, P=0.000).





**Figura 4.** Registro fotográfico del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de tallos de *Artemisia absinthium* L. “ajeno” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/ml, ante ADN genómico humano incubado a 37°C a lo largo de una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.

Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de tamaño molecular 1kb (England biolabs)

Carril Nº 2: Con 5 mg/ml

Carril Nº 3: Con 10 mg/ml

Carril Nº 4: Con 25 mg/ml

Carril Nº 5: Con 50 mg/ml

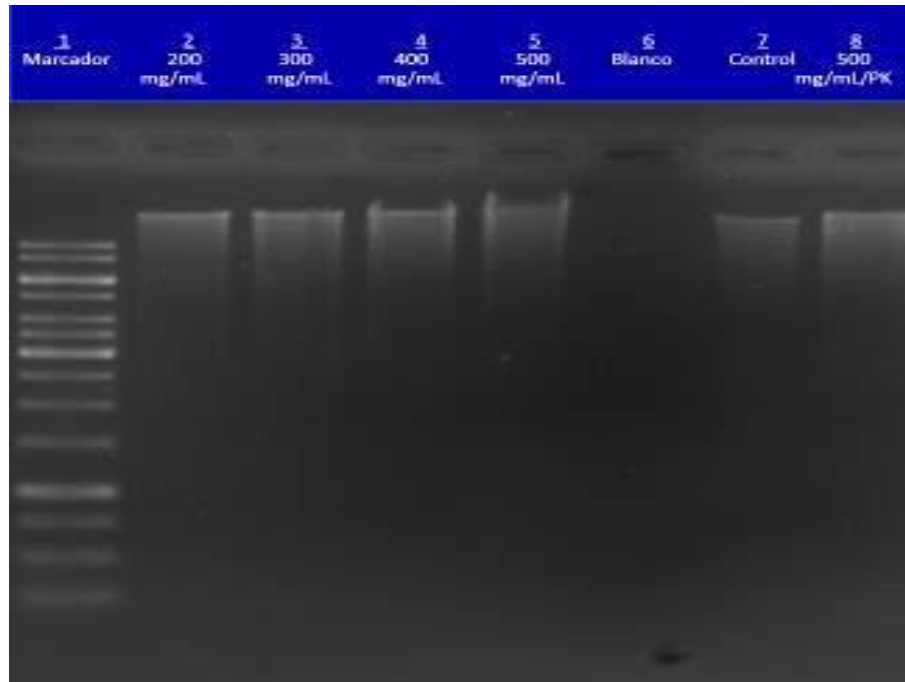
Carril Nº 6: Con 100 mg/ml

Carril Nº 7: Con 100 mg/ml del extracto hidroalcohólico (blanco).

Carril Nº 8: Con ADN puro (control).

Carril Nº 9: Con 100 mg/mL extracto hidroalcohólico + Proteinasa K Volumen de carga: Muestra (8 µL) + *loading* (2µL) = 10 µL. Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 150 minutos.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 15 minutos.



**Figura 5.** Registro fotográfico del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de tallos de *Artemisia absinthium* L. “ajeno” a concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg/ml frente a ADN genómico humano, incubado durante una hora a 37°C. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.

Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de tamaño molecular de 1Kb (England biolabs)

Carril Nº 2: Con 200 mg/mL

Carril Nº 3: Con 300 mg/mL

Carril Nº 4: Con 400 mg/mL

Carril Nº 5: Con 500 mg/mL

Carril Nº 6: Con 500 mg/ml del extracto hidroalcohólico (blanco).

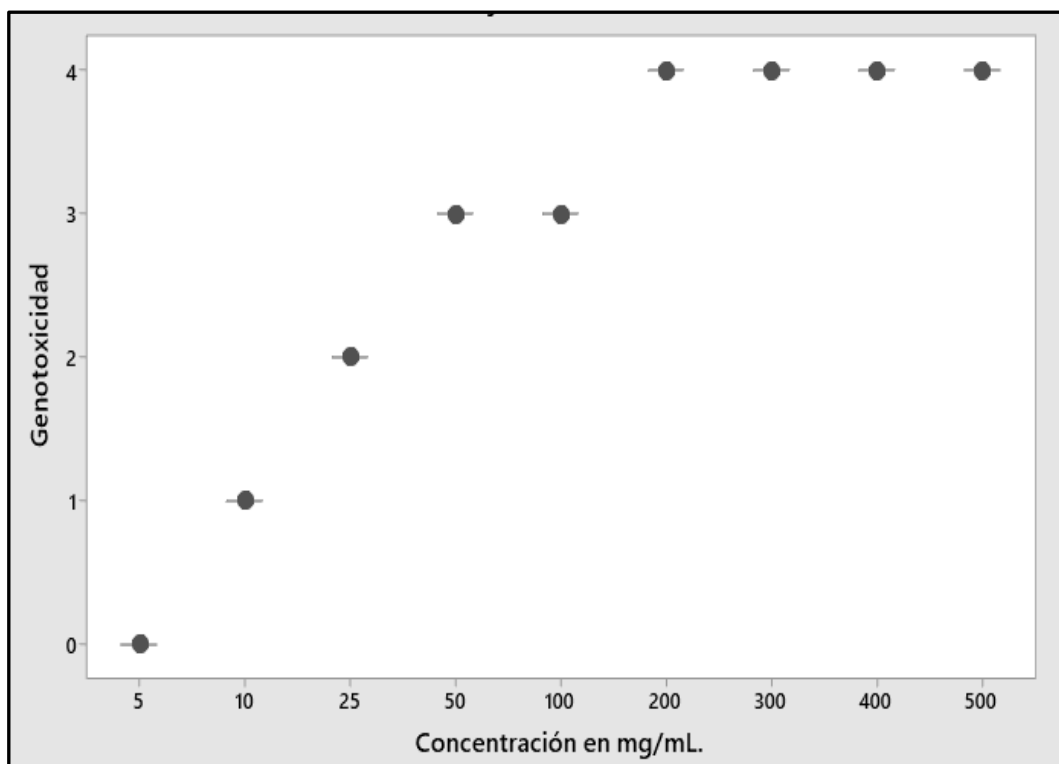
Carril Nº 7: Con ADN puro (control).

Carril Nº 8: Con 500 mg/mL del extracto hidroalcohólico + Proteinasa K Volumen de carga: Muestra (8  $\mu$ L) + *loading* (2 $\mu$ L) = 10  $\mu$ L. Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 150 minutos.

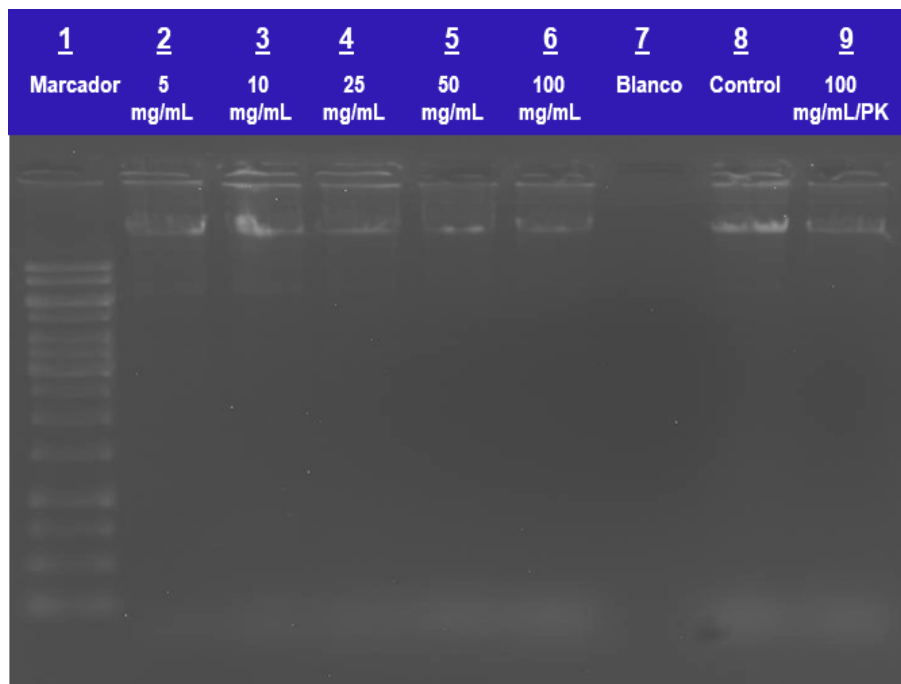
Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 15 minutos.

**Tabla 11.** Los valores de prueba de genotoxicidad *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de tallos de "ajenjo" de *Artemisia* en concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg / ml, representativamente, frente a ADN genómico humano a 37°C, se incubó a C en el lapso de 1 hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.

Condiciones de la incubación		<i>Artemisia absinthium</i> L. "ajenjo" Extracto hidroalcohólico de tallos									
Temperatura (°C)	Tiempo (hora)	Concentración en mg/mL									
		5	10	25	50	100	200	300	400	500	
		0	1	2	3	3	4	4	4	4	
37	1	0	1	2	3	3	4	4	4	4	
		0	1	2	3	3	4	4	4	4	
		0	1	2	3	3	4	4	4	4	



**Figura 6.** Nivel de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de tallos de *Artemisia absinthium* L. “ajeno” a concentrados de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/ml, ante ADN genómico humano, incubado a 37°C a lo largo de una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019. Prueba de Kruskal-Wallis (H=35,0, GL=8, P=0.000).



**Figura 7.** Registro fotográfico del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/ml, frente a ADN genómico de *Escherichia coli*, incubado a 37°C durante una hora. CIBMB- UNSCH. Ayacucho 2019.

Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de tamaño molecular 1kb (England biolabs)

Carril Nº 2: Con 5 mg/ml

Carril Nº 3: Con 10 mg/ml

Carril Nº 4: Con 25 mg/ml

Carril Nº 5: Con 50 mg/ml

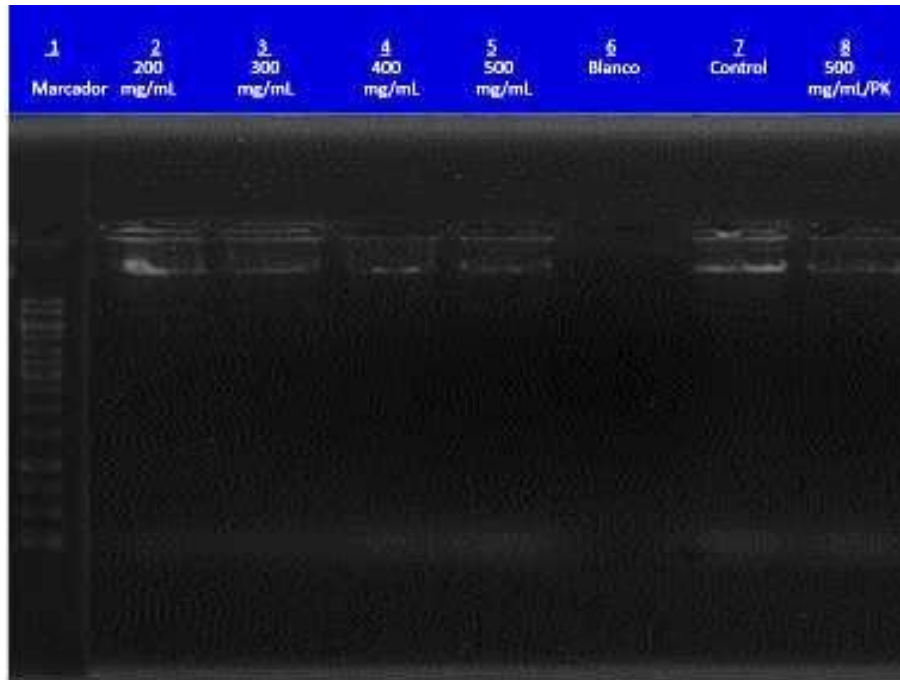
Carril Nº 6: Con 100 mg/ml

Carril Nº 7: Con 100 mg/ml del extracto hidroalcohólico (blanco).

Carril Nº 8: Con ADN puro (control).

Carril Nº 9: Con 100 mg/ml extracto hidroalcohólico + Proteinasa K Volumen de carga: Muestra (8 µL) + *loading* (2µL) = 10 µL. Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 150 minutos.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 15 minutos.



**Figura 8.** Registro fotográfico de la determinación *in vitro* de genotoxicidad del ADN genómico de *E. coli* a partir del extracto hidroalcohólico de hojas de *Artemisia absinthium* L. "ajeno" a concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg / mL, incubados a 37°C a lo largo de 1 h. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.

Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de tamaño molecular de 1Kb (Englandbiolabs)

Carril Nº 2: Con 200 mg/ml

Carril Nº 3: Con 300 mg/ml

Carril Nº 4: Con 400 mg/ml

Carril Nº 5: Con 500 mg/ml

Carril Nº 6: Con 500 mg/ml del extracto hidroalcohólico (blanco).

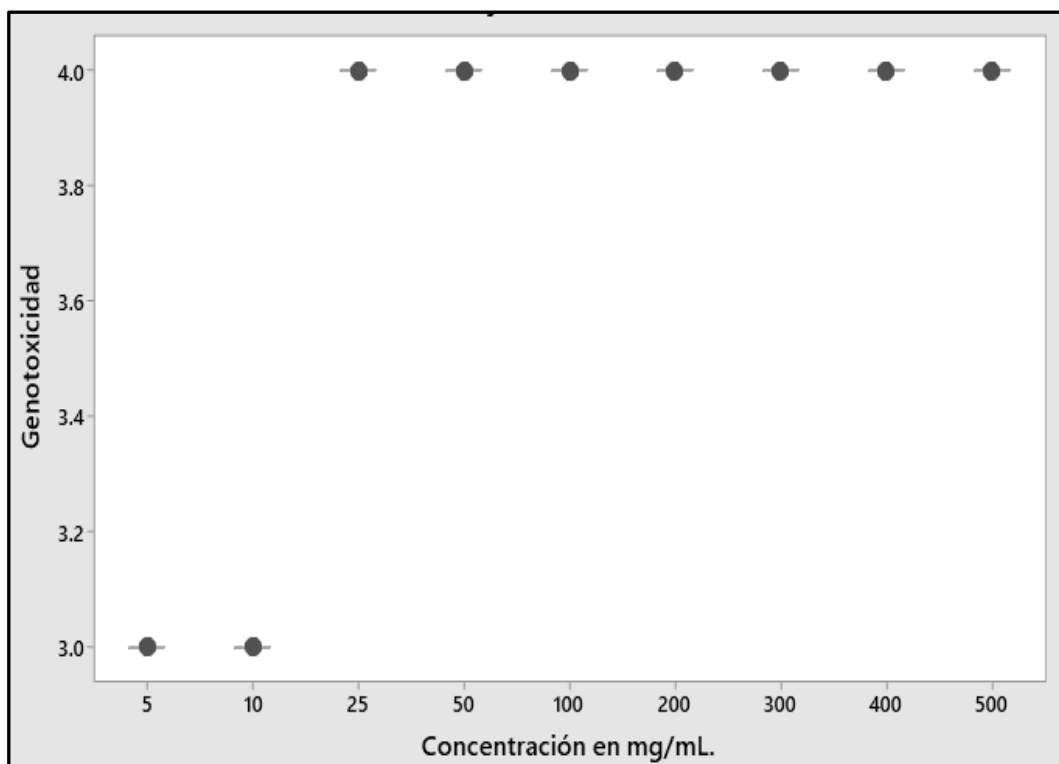
Carril Nº 7: Con ADN puro (control).

Carril Nº 8: Con 500 mg/ml del extracto hidroalcohólico + Proteinasa K.

Volumen de carga: Muestra (8  $\mu$ L) + *loading* (2 $\mu$ L) = 10  $\mu$ L. Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 150 minutos. Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 15 minutos.

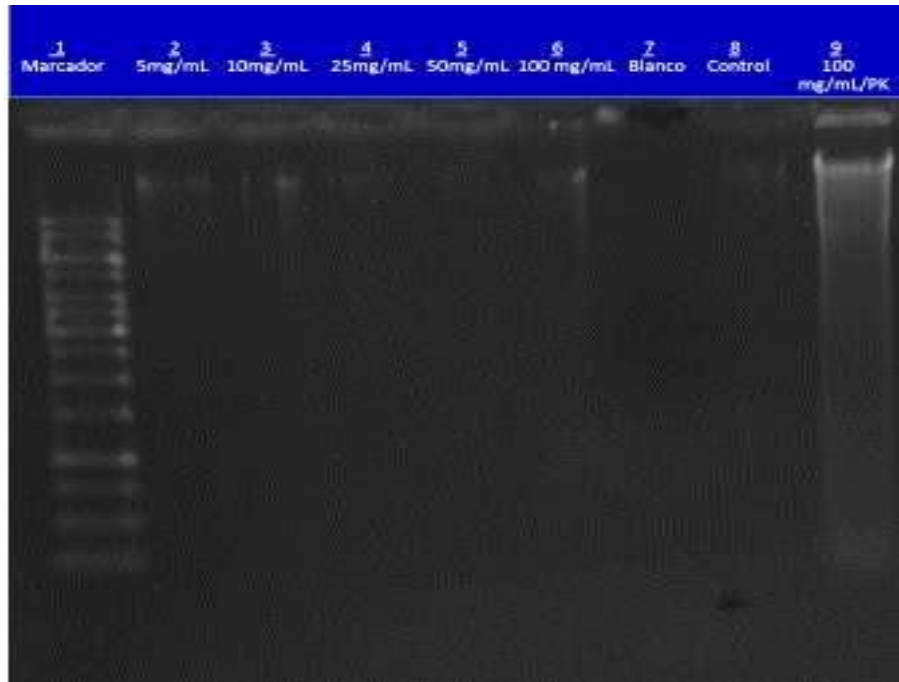
**Tabla 12.** Valores numéricos del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente, frente a ADN genómico de *Escherichia coli* incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.

Condiciones de la incubación		<i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo” Extracto hidroalcohólico de hojas									
Temperatura (°C)	Tiempo (hora)	Concentración en mg/mL									
		5	10	25	50	100	200	300	400	500	
		3	3	4	4	4	4	4	4	4	
37	1	3	3	4	4	4	4	4	4	4	
		3	3	4	4	4	4	4	4	4	
		3	3	4	4	4	4	4	4	4	



**Figura 9.** Nivel de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Artemisia absinthium* L. “ajeno” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente a ADN genómico de *Escherichia coli*, incubado a 37°C a lo largo de 1 h. CIBMB- UNSCH. Ayacucho 2019. Prueba de Kruskal-Wallis (H=35,0, GL=8, P=0.000).





**Figura 10.** Registro fotográfico del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de tallos de *Artemisia absinthium* L. “ajeno” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, frente a ADN genómico de *Escherichia coli*, incubado a 37°C durante una hora. CIBMB- UNSCH. Ayacucho 2019.

Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de tamaño molecular 1kb (England biolabs)

Carril Nº 2: Con 5 mg/mL

Carril Nº 3: Con 10 mg/mL

Carril Nº 4: Con 25 mg/mL

Carril Nº 5: Con 50 mg/mL

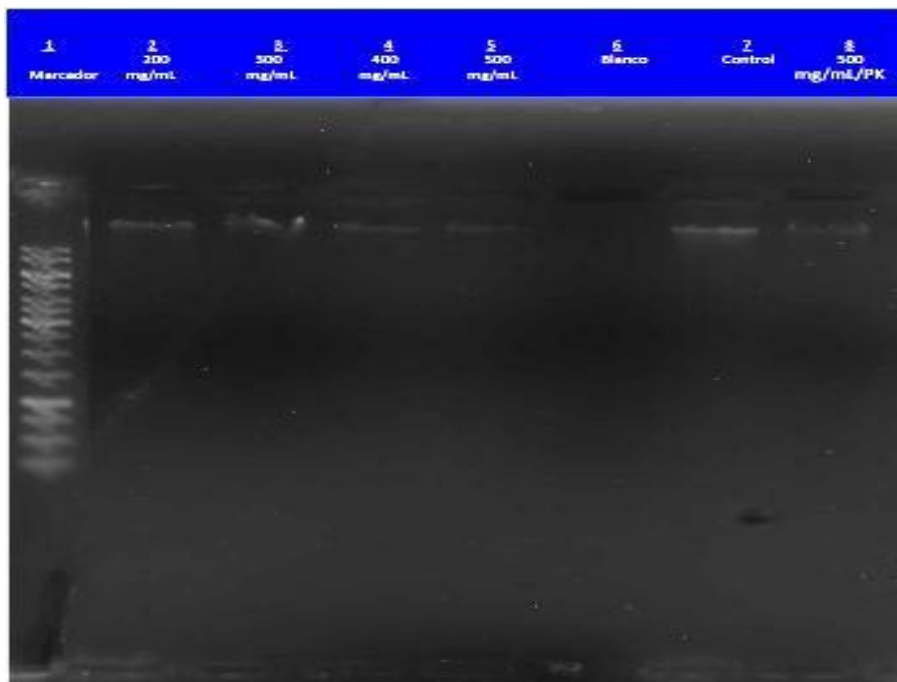
Carril Nº 6: Con 100 mg/mL

Carril Nº 7: Con 100 mg/mL del extracto hidroalcohólico (blanco).

Carril Nº 8: Con 100 mg/mL extracto hidroalcohólico + Proteínasa K

Carril Nº 9: Con ADN puro (control).

Volumen de carga: Muestra (8  $\mu$ L) + *loading* (2 $\mu$ L) = 10  $\mu$ L. Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 150 minutos. Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 15 minutos.



**Figura 11.** Registro fotográfico del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de tallos de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo” a concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg/mL frente a ADN genómico de *Escherichia coli*, incubado mientras pasa una hora a 37°C. CIBMB- UNSCH. Ayacucho 2019.

Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de tamaño molecular de 1Kb (England biolabs)

Carril Nº 2: Con 200 mg/mL

Carril Nº 3: Con 300 mg/mL

Carril Nº 4: Con 400 mg/mL

Carril Nº 5: Con 500 mg/mL

Carril Nº 6: Con 500 mg/mL del extracto hidroalcohólico (blanco).

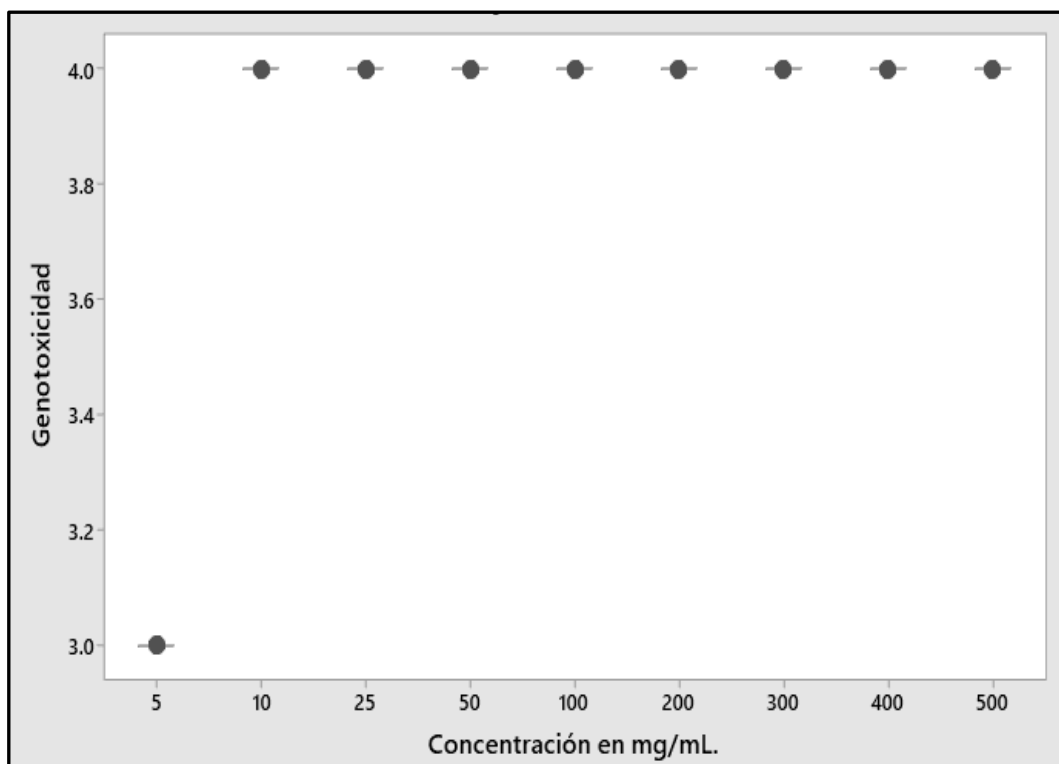
Carril Nº 7: Con ADN puro (control).

Carril Nº 8: Con 500 mg/mL del extracto hidroalcohólico + Proteinasa K Volumen de carga: Muestra (8 µL) + *loading* (2µL) = 10 µL. Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 150 minutos.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 15 minutos.

**Tabla 13.** Valores numéricos del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de tallos de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo” a concentrados de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente, frente a ADN genómico *Escherichia coli* incubado a 37°C en el tiempo de una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.

Condiciones de la incubación		<i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo” Extracto hidroalcohólico de tallos								
Temperatura (°C)	Tiempo (hora)	Concentración en mg/mL								
		5	10	25	50	100	200	300	400	500
		3	4	4	4	4	4	4	4	4
37	1	3	4	4	4	4	4	4	4	4
		3	4	4	4	4	4	4	4	4
		3	4	4	4	4	4	4	4	4



**Figura 12.** Nivel de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de tallos de *Artemisia absinthium* L. “ajeno” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente a ADN genómico de *Escherichia coli*, incubado a 37°C en el lapso de una hora. CIBMB- UNSCH. Ayacucho 2019. Prueba de Kruskal-Wallis (H=35,0, GL=8, P=0.000).

## V. DISCUSIÓN

Al realizarse los ensayos específicos para detectar los metabolitos secundarios presentes en los extractos hidroalcohólicos de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo", como se muestra en la Tabla 9, se evidencian entre ellos en concentraciones abundantes (++++) los fenoles y/o taninos y aminoácidos libres tanto en hojas como en tallos; flavonoides abundante concentración (++++) en tallos y concentración regular (+++) en hojas; alcaloides en concentración regular (+++) tanto en hojas como en tallos; catequinas regular concentración (+++) en tallos y poca concentración (++) en hojas; azúcares reductores concentración regular (+++) en tallos y ausente en hojas; ausencia de cardenólidos, sustancias reductoras y saponinas tanto en hojas como en tallos. Estos datos revelan que existe una relación muy parecida entre los metabolitos secundarios presentes en ambas partes de la planta, con la diferencia que en las hojas hay menos flavonoides y catequinas que en el tallo, y la ausencia de azúcares reductores en las hojas.

El informe de averiguación desarrollado por Pillaca, L.<sup>18</sup> y otros autores señaló que los metabolitos secundarios ubicados en el látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" son: lactonas y/o cumarinas, fenoles y/o taninos, alcaloides, flavonoides, astringentes, saponinas y principios amargos, y en látex de Banyan los alcaloides del "higo", las lactonas y/o cumarinas, los flavonoides y el principios de amargor. Montes Enciso, M.<sup>21</sup> informó que los metabolitos secundarios ubicados en el látex *Argemone mexicana* L. "Cardo santo" son: alcaloides, compuestos fenólicos y taninos (+++), mientras tanto que el "diente de león" en el látex de diente de león "Los metabolitos secundarios reconocidos son: compuestos fenólicos y taninos (+++), alcaloides (+) y lactonas cardíacas (+).

Nuestros resultados, son similares a los reportados en los trabajos citados, en el

sentido de haber identificado tanto en hojas como en tallos de "ajenjo" fenoles y/o taninos, aminoácidos libres, flavonoides, alcaloides, catequinas, azúcares reductores; siendo estos metabolitos secundarios, los probables responsables del efecto genotóxico sobre el ADN genómico humano y bacteriano ensayado.

Con la intención de analizar de la mejor manera posible nuestros resultados, procederemos en primera instancia interpretar las imágenes obtenidas:

En la Figura 1, el registro fotográfico del producto de prueba de hojas de "ajenjo" muestra que a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 miligramo/mL, incubación en 1500 ng/ $\mu$ L de ADN genómico humano a lo largo de una hora a 37°C, las lecturas son las próximas: El carril 1 incumbe al anotador de dimensión atómica de 1 kb; los carriles 2 a 6 son los que se refieren al ADN genómico humano con la concentración respectiva del extracto hidroalcohólico de las hojas, es posible mirar que en los carriles 2 y 3, cada banda de ADN tampoco padeció alguna fractura significativa. Se vio que la concentración del extracto, el hidroalcohol a concentraciones de 5 y 10 miligramo/ml, respectivamente, era la misma que la banda de ADN genómico humano sin intentar usada como "control" en el carril 8; los carriles 4, 5 y 6 presentan las bandas de ADN. La concentración se disminuye gradualmente relacionadas con la concentración del "control", lo cual se debería a la fragmentación provocada por los extractos a 25, 50 y 100 miligramo/ml proporcionalmente; carril 7, que corresponde al periodo del "blanco", o sea, el agua de la muestra de 100miligramo/mL de extracto de alcohol, en la que no se vio ADN de "ajenjo". La banda vista en el carril 8 es ADN genómico humano sin ningún procedimiento, que sirve como "control" para equiparar con cada ADN procesado de diferentes concentraciones de extractos hidroalcohólicos.

El carril 9 pertenece al periodo de electroforesis de 1500 ng/ $\mu$ L de ADN genómico humano, usando 100 miligramo/mL del extracto de agua-alcohol de hojas de "ajenjo" más proteinasa K, lo cual muestra que la magnitud de la banda de ADN ha disminuido, como se muestra en el carril 6. Haciendo distinción con el "control", reiterando que la fragmentación del ADN se debería a la acción de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico, no a las nucleasas que tienen la posibilidad de provenir de la muestra del "ajenjo", pues be proteasa Degradada por la acción de K, la proteasa K se incubó a 37°C a lo largo de horas.

Por otro lado, el registro fotográfico de la Figura 2 revela los resultados de

genotoxicidad de extractos de hojas de "ajeno" en concentrados de 200, 300, 400 y 500 mg/ml, mientras que la concentración de ADN genómico humano es de 1.500 ng/ $\mu$ l. El carril 1 concierne al anotador de tamaño atómico de 1 kb; los carriles 2 a 5 son carriles usados para procesar el ADN genómico humano. En la situación de la concentración que corresponde de extracto hidroalcohólico, se puede estimar que en dichos carriles, debido a la fragmentación, comparada con el "control", el índice de refracción de las bandas de ADN en dichos carriles reduce gradualmente gracias a la predominación de los extractos a 200, 300, 400 y 500 miligramo/ml; el carril 6 corresponde a la operación de "blanco", que es 500 miligramo/ml en el extracto hidroalcohólico de "Artemisa", no se vio la existencia de ADN de "Artemisa". La banda vista en el carril 7 es ADN genómico humano sin ningún procedimiento, que sirve como "control" para equiparar con cada ADN procesado de diferentes concentraciones de extractos hidroalcohólicos.

A continuación, la octava pista implica la ejecución de electroforesis del programa de ADN genómico humano de 1500 ng/ $\mu$ L, que contiene 500 mg / ml de extracto hidroalcohólico de hoja de "ajeno" y proteinasa K, mostrando que el color del ADN es del mismo tamaño que la quinta pista. Las bandas se han reducido, comparadas estas con el "control", se reitera que la fragmentación del ADN se debe a los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas, no a la nucleasa que puede provenir del "ajeno", porque serán degradados por la proteinasa K durante todo el proceso y se incubarán a 37°C durante una hora.

Además, los resultados que se presentan en la Figura 1 y la Figura 2 se fundamentan en la herencia de la Tabla Metodológica 7 como una referencia. Los valores se manifiestan a grado de fragmentos de ADN genómico humano. La concentración del extracto se probó para establecer la genotoxicidad *in vitro*, igual que en la Tabla 10; los detalles son 5 y 10 miligramo/ml respectivamente, la fragmentación del ADN es menor al 5% (valor = 0); 25 miligramo/ml, entre 5 y 20% (Valor = 1); 50 miligramo/ml, entre 20 y 40% (valor = 2); para 100 y 200 miligramo/mL, 40% a 95% (valor = 3) y 300, 400 y 500 miligramo/mL, la tasa de fragmentación de genómico humano procesado El ADN (valor = 4) ha superado el 95%.

Del mismo modo, tomando los valores enumerados en la Tabla 10 y hace uso del examen de Kruskal-Wallis para el análisis estadístico de comparación del

nivel de fragmentos del ADN genómico humano en análisis y tratos. El porcentaje (%) y la concentración del extracto hidroalcohólico se utilizan para expresar el "amargor" de las hojas de *Artemisia absinthium* L. "ajeno" se expresa en miligramos por mililitro (mg/mL), como se muestra en la Figura 3. El porcentaje de fragmentación del ADN genómico humano revela el nivel de genotoxicidad. Formulada como hipótesis nula ( $H_0$ ), todas las medianas son iguales, como hipótesis alternativa ( $H_1$ ), es decir, al menos una mediana es diferente. Los resultados muestran que para  $GL = 8$  y  $H = 35.0$ ,  $P = 0.000$  valores; por lo tanto, se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_1$  porque  $P$  es menor que  $0.05$ . Por lo tanto, el grado de fragmentación del ADN genómico humano procesado depende de la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de artemisa.

En otro logaritmo, la Figura 4, ilustra los registros fotográficos de electroforesis de  $1500 \text{ ng}/\mu\text{L}$  de ADN genómico humano con extractos de tallo de "ajeno" en concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 miligramo/mL. Los detalles de la lectura: El carril 1 concierne al índice de tamaño atómico; los carriles 2 a 6 son manipulaciones de ADN genómico humano. Con la diferencia en la concentración del extracto de agua-alcohol del tallo, se puede mirar que la concentración de bandas de ADN en los carriles 3, 4, 5, y 6 Reduce gradualmente. Para el "control" en el carril 8, el extracto se fragmentó bajo la predominación de 10, 25, 50 y 100 miligramo/mL; el carril 7 corresponde a la ejecución del "objetivo"; el carril 9 es el extracto de ADN procesado, más La enzima proteinasa K muestra que la reducción de las bandas de ADN es semejante a la de los carriles.

En el siguiente apartado, la figura 5 es el registro fotográfico del extracto de los tallos del "ajeno" frente a ADN genómico humano. El carril 1 es del marcador de tamaño molecular; los carriles de 2 al 5 son los tratamientos a concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg/mL de extracto frente al ADN genómico humano; se puede verificar que en todos los carriles las bandas del ADN, son muy tenues debido a la fragmentación que ha sufrido por efecto de los extractos; el carril 6, corresponde al corrido del "control"; el carril 7, es de tratamiento con extracto y proteinasa K, con la totalidad de ADN fragmentado.

Los resultados revelados en las figuras 4 y 5, tomando como referencia la escala de la tabla 7 de la metodología, fueron llevados a valores numéricos designados al grado de fragmentación del ADN genómico humano ensayados, los mismos que se reporta en tabla 11; detalla que con 10 mg/mL, la fragmentación del ADN



fue entre el 5 al 20% (valor = 1); con 25 mg/mL, entre 20 al 40% (valor = 2); con 50 y 100 mg/mL, entre 40 al 95% (valor = 3) , mientras que con 200, 300, 400 y 500 mg/mL, la fragmentación fue mayor al 95% del ADN genómico humano tratado (valor = 4).

Conjuntamente, utilizando los valores enumerados en la Tabla 11, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para el análisis estadístico para comparar el grado de fragmentación del ADN genómico humano en tratamiento. Los tallos de *Artemisia absinthium* L. se expresaron en porcentaje (%) y la concentración del extracto hidroalcohólico se expresa en miligramos por mililitro (mg/mL), como se muestra en la Figura 6. El porcentaje de fragmentación del ADN genómico humano revela el grado de genotoxicidad, formulado como hipótesis nula ( $H_0$ ) de que todas las medianas son iguales, y como hipótesis alternativa ( $H_1$ ), que al menos una mediana es diferente. Los resultados muestran que para  $GL = 8$  y  $H = 35.0$ ,  $P = 0.000$  valores; por lo tanto, se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_1$  porque  $P$  es menor que 0.05. Por lo tanto, el grado de fragmentación del ADN genómico humano procesado depende de la concentración del extracto hidroalcohólico de los tallos de Artemisia "ajenjo".

Además, con afinidad a los datos obtenidos de enfrentar los extractos de "ajenjo" frente al ADN de *Escherichia coli*, interpretamos en los siguientes términos:

En la figura 7, es el registro fotográfico de la electroforesis del extracto hidroalcohólico de hojas del "ajenjo", a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL frente al ADN genómico de *Escherichia coli* a 1500 ng/ $\mu$ L, cuya lectura es como sigue: El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular de 1 kb; los carriles de 2 al 6 son los del tratamiento al ADN genómico bacteriano, con los extractos hidroalcohólicos de las hojas, se puede discernir que en los carriles 2 y 3 las bandas del ADN han sufrido fragmentación notoria por efecto del extracto hidroalcohólico a concentración de 5 y 10 mg/mL, respectivamente, comparando con la banda del ADN genómico bacteriano "control" del carril 8; los carriles 4, 5 y 6 muestran bandas de ADN disminuidas casi en su totalidad respecto al "control", debido a la fragmentación que ha sufrido por efecto de los extractos a 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente; el carril 7, corresponde al carril del "blanco" el extracto hidroalcohólico de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo" a 100 mg/mL, en la que no se observa la presencia de ADN procedente del "ajenjo". El carril 9, corresponde al tratamiento del ADN genómico bacteriano con 100 mg/mL de extracto hidroalcohólico más la enzima proteinasa K, mostrando que

la intensidad de la banda del ADN ha disminuido al igual que la del carril 6.

La figura 8, revela el resultado de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo”, frente a ADN genómico bacteriano a 1,500 ng/μL. El carril 1 es del marcador de tamaño molecular de 1 kb; los carriles de 2 al 6 son los del tratamiento al ADN genómico bacteriano con extractos a concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg/mL, se puede verificar la ausencia de las bandas de ADN, porque en todos los casos han sido fragmentadas comparando su refringencia con el carril 9 de “control”; el carril 7, corresponde al “blanco” con extracto hidroalcohólico de “ajenjo” a 500 mg/mL. El carril 8, corresponde al tratamiento del ADN genómico bacteriano, con 500 mg/mL de extracto hidroalcohólico de hojas de “ajenjo” más la enzima proteinasa K, mostrando que todo el ADN ha sido fragmentado al igual que la del carril 5.

Los resultados explicados en la Figura 7 y la Figura 8 se fundamentan en la interacción de la Tabla Metodológica 7, y el valor se designa como el nivel de fragmentación del ADN genómico bacteriano como producto de la prueba de genotoxicidad *in vitro*. La concentración de la sustancia es la igual que se informa en la Tabla 12; la explicación descriptiva es de 5 y 10 miligramo/mL respectivamente, y la tasa de fragmentación está entre el 40% y el 95% (valor = 3), y para 25, 50, 100, 200, el porcentaje de bacterias ADN genómico tratado con 300, 400 y 500 miligramo/mL con una tasa de fragmentación mayor a 95 (valor = 4).

Tomando los valores numéricos consignados en la tabla 12, se realizaron los análisis estadísticos con la prueba de Kruskal – Wallis, confrontando el grado de fragmentación del ADN genómico bacteriano en tratamiento, expresado en porcentaje (%) versus la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo” expresado en miligramos por mililitro (mg/mL), expuesto en la figura 9. El porcentaje de fragmentación del ADN genómico bacteriano revelan el grado de genotoxicidad, formulándose, como hipótesis nula (H<sub>0</sub>) que todas las medianas son iguales y como hipótesis alterna (H<sub>1</sub>) que al menos una mediana es diferente. Los resultados reportan que para GL= 8 y H= 35,0 el valor de P= 0,000; por tanto, se rechaza la H<sub>0</sub> y se acepta la H<sub>1</sub>, porque P resultó menor que 0.05. En consecuencia, el grado de fragmentación el ADN genómico de *Escherichia coli* tratado, depende de la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo”.

En la figura 10, incumbe a la electroforesis del extracto hidroalcohólico de tallos del “ajenjo”, frente al ADN genómico de *Escherichia coli* a 1500 ng/μL, cuya lectura se detalla: El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular; los carriles de 2 al 6 son los del tratamiento al ADN genómico bacteriano, con extracto hidroalcohólico a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, se puede interpretar que el carril 2 muestra una banda de ADN muy tenue en su concentración respecto al “control” del carril 9; el carril 7, corresponde al corrido del “blanco”; el carril 8, es del tratamiento del ADN con extracto, más la enzima proteinasa K, mostrando que la banda del ADN ha disminuido similar al carril 6. Del mismo modo, la figura 11, refleja los siguientes resultados: el carril 1 es del marcador de tamaño molecular; los carriles de 2 al 6 son los tratamientos a concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg/mL del extracto frente al ADN genómico bacteriano; se puede verificar que en todos los carriles no hay presencia de banda del ADN, por la fragmentación que ha sufrido por efecto de los extractos; el carril 8, corresponde al corrido del “control” con banda de ADN muy tenue, probablemente por efecto de la degradación del extracto de alta concentración (500 mg/mL) que corrió en el carril cercano; el carril 9, es de tratamiento con extracto y proteinasa K, con la totalidad de ADN fragmentado. Los resultados revelados en las figuras 10 y 11, tomando como referencia la escala de la tabla 7 de la metodología, fueron llevados a valores numéricos designados al grado de fragmentación del ADN genómico humano ensayados, los mismos que se reporta en tabla 13; detalla que con 5 mg/mL, la fragmentación del ADN fue entre 40 al 95% (valor = 3); con 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, la fragmentación fue mayor al 95% del ADN genómico humano tratado (valor = 4).

Utilizando los valores numéricos consignados en la tabla 13, se realizaron los análisis estadísticos con la prueba de Kruskal – Wallis, confrontando el grado de fragmentación del ADN genómico humano en tratamiento, expresado en porcentaje (%) versus la concentración del extracto hidroalcohólico de tallos de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo” expresado en miligramos por mililitro (mg/mL), expuesto en la figura 12. El porcentaje de fragmentación del ADN genómico de *Escherichia coli* revelan el grado de genotoxicidad, formulándose, como hipótesis nula (H<sub>0</sub>) que todas las medianas son iguales y como hipótesis alterna (H<sub>1</sub>) que al menos una mediana es diferente. Los resultados reportan que para GL= 8 y H= 35,0 el valor de P= 0.000; por tanto, se rechaza la H<sub>0</sub> y se acepta la

H1, porque P resultó menor que 0.05. En consecuencia, el grado de fragmentación del ADN genómico de *Escherichia coli* tratado, depende de la concentración del extracto hidroalcohólico de tallos de *Artemisia absinthium* L. "ajeno". Dichos resultados son imposibles de equiparar con otros estudios semejantes de genotoxicidad de "ajeno" pues no se han encontrado reportes; no obstante, los resultados conseguidos se fortalecen y tienen la posibilidad de respaldar la utilización de procedimientos en la actualidad aplicados en el trabajo para hacer estudios de genotoxicidad en ADN genómico; y los resultados conseguidos son consistentes:

Pillaca, L.<sup>18</sup> concluyó que el látex de las plantas medicinales resistentes a las verrugas *Euphorbia pepius* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" tiene un impacto genotóxico "in vitro", que es dependiente de manera directa de la concentración de látex; sin embargo no es tiempo de eclosión.

Asimismo, Alarcón Gómez, G.<sup>19</sup> informó que el extracto hidroalcohólico tiene una fundamental actividad genotóxica sobre el ADN genómico humano. Como extracto de "Amor Seco" y "Yarwar suqu", está a 50 miligramo/ml y 100 miligramo. La concentración de miligramo/ml tiene más grande genotoxicidad comparativamente con "matico". La conclusión es que el daño genotóxico es dependiente de manera directa de la concentración del extracto hidroalcohólico, sin embargo no del tiempo de incubación.

Sin embargo, Martínez Fernández, J.<sup>20</sup> En su indagación concluyó que el extracto hidroalcohólico de hojas de *Datura* causa daño genotóxico proporcional a la concentración y tiempo de incubación. Montes Enciso, M.<sup>21</sup> informó que la concentración de látex de *Argemone mexicana* L. "Cardo santo" está entre el 10% y el 100%, lo cual tiene un intenso impacto genotóxico sobre el ADN genómico humano y lo fragmenta en un 100%. El látex muestra que 50% de las concentraciones de látex y 100% de ellas presentan 100% de fragmentación de ADN, en lo que las concentraciones de 10% y 25% presentan 40% a 95% de fragmentación de ADN genómico humano, o sea, una diferencia estadísticamente significativa.

Por tanto, podemos corroborar a que los estudios de actividad antimicrobiana de *Origanum vulgare* L. "orégano", que tiene la propiedad de matar a las células microbianas, podría deberse al su efecto genotóxico.

Gutiérrez y col<sup>13</sup>, evaluaron la actividad biocida, citotóxica y genotóxica de extractos de tres plantas medicinales de la familia *Euphorbiaceae*. El único

extracto que presentó actividad inhibitoria *in vitro* significativo contra bacterias y hongos fue *Euphorbia lancifolia* con una CIM de 1 mg/mL contra *Bacillus subtilis* y *Trichophyton mentagrophytes* ( $p=0,0312$ ).

Por consiguiente, diversos experimentos e indagaciones sobre plántulas de uso medicinal de otras estirpes informan que la actividad antibacteriana y la actividad genotóxica se atribuyen a la existencia de metabolitos secundarios compuestos primordialmente por flavonoides, alcaloides y taninos. Entre ellos: Mahmoudl, et.al<sup>10</sup>. Su impacto puede estar referente con la existencia de compuestos antioxidantes. Asimismo, la Agencia Europea de Medicamentos afirma que el ajenojo debería evitarse a lo largo del embarazo y la lactación; está contraindicada en chicos y jóvenes menores de 18 años y pacientes con obstrucción biliar, colangitis o patología hepática.

Rodríguez Pérez, M. además realizó un análisis; et al.<sup>12</sup>, donde evaluaron la actividad antipalúdica del ajenojo, entre los cuales sus resultados mostraron el potencial antimalárico de varias plantas medicinales usadas en Cuba, y para el análisis de seguimiento de su activo químico los elementos otorgan el camino. Saban K., Irían A., Onder C., Ahmet C.<sup>13</sup> estudiaron los aceites esenciales de 3 especies de piezas aéreas de *Artemisia absinthium*, *Artemisia santonicum* y *Artemisia spicigera*. Todos los aceites esenciales probados son tóxicos para los adultos de *S. granarius*. El aceite sugiere que la tasa de mortalidad del gorgojo del establo es del 80 al 90%. Luego de 48 horas de exposición, la dosis de *S. granarius* ha sido de 9 ul/L. Ciertos compuestos purificados (alcanfor, 1,8-cineol, terpinen-4-ol, borneol, acetato de borneol y  $\alpha$ -terpineol) se identificaron como los elementos primordiales del aceite a una dosis de 0,5-0,75 y 1 ul/L se probó contra *S. granarius*.

## VI. CONCLUSIONES

1. Los metabolitos secundarios identificados en el extracto hidroalcohólico de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo” fueron: fenoles y/o taninos, flavonoides y aminoácidos libres en concentraciones abundantes (++++); seguido de alcaloides y catequinas en regular concentración (+++); y azúcares reductores también en regular concentración, pero solo en tallos.
2. Se evaluó la genotoxicidad *in vitro* de los extractos hidroalcohólico de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo”, demostrando que: el extracto de hojas frente al ADN genómico humano con 100 y 200 mg/ml, la fragmentación fue entre 40 al 95 % del ADN y con 300, 400 y 500 mg/mL fue mayor al 95% del ADN genómico humano tratado; mientras que, con el extracto de tallos frente al ADN genómico humano con 50 y 100 mg/mL, la fragmentación fue entre 40 al 95 % del ADN y con 200, 300, 400 y 500 mg/mL fue mayor al 95% del ADN genómico humano. En tanto, el extracto de hojas frente al ADN genómico de *Escherichia coli* con 5 y 10 mg/mL, la fragmentación fue entre 40 al 95 % del ADN y con 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL fue mayor al 95% del ADN genómico bacteriano; mientras que, con el extracto de tallos frente al ADN genómico de *Escherichia coli* solo con 5 mg/mL, mostró fragmentación entre 40 al 95% del ADN y con las concentraciones de 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL fue mayor al 95% del ADN genómico bacteriano.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Impulsar la tarea de indagación de la toxicidad genética de las plantas medicinales en la Facultad de Ciencias Biológicas, y descubrir novedosas construcciones biológicamente activas para el procedimiento de patologías.
2. Expandir el análisis de toxicidad genética *in vitro* de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo" usando extractos logrados con otros disolventes, extractos de división y otras técnicas.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Miranda Tomás, Moreno Miriam, Pillaca Lizbeth, Aguilar Enrique, Rivera Jime. Efecto genotóxico *in vitro* del látex de una planta medicinal antiverrucosa *Euphorbia peplus* L. "leche leche" frente a ADN genómico humano. En: 2do Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. [Artículo]. Octubre 25 al 28 de 2017. Durango, Dgo. México.
2. Díaz H. Actividad antiinflamatoria y antioxidante del extracto hidroalcohólico del látex de *Argemone mexicana* "cardo santo". [Tesis Pregrado]. Lima, 2016.
3. Rodríguez Daniel. Cadena alimentaria 7: Plantas Medicinales. Edit. Soluciones Prácticas. Julio 2002.
4. Fonnegra Ramiro, Jiménez Silvia. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Edit. Universidad de Antioquia. Segunda edición. Colombia 2007.
5. Miranda T. Método Tomasevich: para determinar el efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales y/o productos fitoterapéuticos. En: 2do Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. Octubre 25 al 28 de 2017. Durango, Dgo. México.
6. Moreno Miriam, Miranda Tomás, Pillaca Lizbeth, Aguilar Enrique, Infante Guadalupe. Efecto genotóxico *in vitro* del látex de *Ficus carica* L. "higo" frente a ADN genómico humano. En: 2do Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. [Artículo]. Octubre 25 al 28 de 2017. Durango, Dgo. México.
7. Sánchez A. Efecto inhibitorio de *Allium cepa* y *Allium sativum* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*. [Tesis para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista]. Universidad de Veracruz, 2013.
8. González Fanny, Trelles Verónica. Determinación de la actividad antihelmíntico de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo". [Tesis para obtener el título de Bioquímico- Farmacéutico]. Universidad de Cuenca. Ecuador. 2007.
9. Vega R. Efecto citostático del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" en el meristemo radicular de *Allium cepa* L. "cebolla". [Tesis Pregrado]. Ayacucho, Perú. 2006
10. Mahmoudi, M., Ebrahimzadeh, M. A., Ansaroudi, F., Nabavi, S. F. And Nabavi, S. M. (2009) "Actividad Antidepresiva y Antioxidante De Artemisia absinthium L. En Etapa De Florecimiento" African Journal of Biotechnology. Vol. 8 (24), pp. 7170-7175. 2009.
11. COMMITTEE ON HERBAL MEDICINAL PRODUCTS (HMPC) (2009) "Reporte Científico Sobre *Artemisia absinthium* L., Hierba" Agencia de Medicina Europea, Evaluación de Medicinas para Consumo Humano.
12. Rodríguez-Pérez, M.; y col. (2006) "Evaluación de la actividad antimalárica de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional cubana." Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", La Habana, Cuba. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, Revista Ciencias Farmacéuticas. Básica y Aplicada., v. 27, n.3, p.197-205, 2006 ISSN 1808-4532 La Habana Cuba.
13. Saban K., Irían A., Onder C., Ahmet C. "Toxicidad Del Aceite Esencial Aislado de tres Especies de *Artemisia* y de Algunos de sus Principales Componentes Frente A Gorgojo Del Granero, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleóptera: Curculionidae)". Industrial Crops and Products 23; 162-170. 2006.
14. Bezerra G. Estudio Fitoquímico e Biológico *in Vitro* de Especies do Género *Euphorbia*: *Euphorbia hirta*, *Euphorbia hyssopifolia* y *Euphorbia. thymifolia* L. (Tesis de Maestría). Petrolina: Universidad Federal do Vale do Sao



- Francisco, 2015.
15. Craig D, Parsons P. *Euphorbia peplusuna* planta con posibles propiedades anticancerígenas. Wildcrafted Herbal Products [revista en internet]. 2002 enero. [acceso 27 de agosto del 2018]; 10(2). Disponible en: [http://www.wildcrafted.com.au/Articles/Scientific\\_Research/Milkweed\\_for\\_skin\\_cancer.html](http://www.wildcrafted.com.au/Articles/Scientific_Research/Milkweed_for_skin_cancer.html)
  16. Mena-Huertas J. y col. Ausencia de efecto citotóxico, mutagénico y genotóxico de extracto acuoso y aceite esencial de *Carica candamarcensis* Hook. (plantae: *caricaceae*). ActaBiol vol.33 [Artículo] N° 95 Medellín July/Dec. 2011.
  17. Vega R. Efecto citostático del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" en el meristemo radicular de *Allium cepa* L. "cebolla". [Tesis Pregrado]. Ayacucho, Perú. 2006.
  18. Pillaca Untiveros, Lizbeth. Efecto genotóxico in vitro del látex de plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo". Ayacucho, 2013. CONCYTEC 2014.
  19. Alarcón Gómez, G. Efecto genotóxico in vitro de plantas medicinales antiinflamatorias *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". Ayacucho, 2013. CONCYTEC. 2014.
  20. Martínez Fernández, J. Genotoxicidad in vitro de hojas de *Datura stramonium* L. "chamico". Ayacucho, 2016. CONCYTEC 2017.
  21. Montes Enciso, M. Efecto genotóxico in vitro del látex de plantas medicinales de uso dérmico *Argemone mexicana* L. "cardo santo" y *Taraxacum officinale* "diente de león". Ayacucho, 2017. CONCYTEC.2017.
  22. Cosquillo Martha, Placencia Maritza, Miranda Tomás, Moreno Miriam, Retuerto Mónica. Efecto citotóxico y genotóxico *in vitro* del extracto crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública. 2020; 37(3):454-61.
  23. Laguna Emilio. Inventario Español de los Conocimientos Tradicionales relativos a la biodiversidad. 2015.
  24. Aucasime L. Plantas medicinales de la provincia de Huamanga- Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2017.
  25. Achahui Susan, Quispe Patricia. Evaluación del Efecto Antiespasmódico del Extracto Hidroalcohólico y del Aceite Esencial de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) In Vivo y Ex InVivo". Cusco. 2011.
  26. Gonzalez Fany, Trelles Verónica. Determinación de la actividad antihelmíntica de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo). Ecuador. 2007.
  27. Jiménez, Luis. Merchant, Horacio. Biología Celular y Molecular. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 2003.
  28. Fernández-Donoso, R. & Bem'os, S. 1985. La arquitectura nuclear y su inherencia en la variabilidad del cariotipo. En: Fernández-Donoso, R. (Ed), "El núcleo, los cromosomas y la evolución", Impresiones AlfaBeta, U.N.E.S.C.O., Chile, 193 pp.
  29. Rodríguez, Guadalupe. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Edit. Salud Pública. Cuernavaca. 2002.
  30. Madigan M, Martinko J, Parker J. Biología de los Microorganismos. 12<sup>a</sup> ed. Madrid: Printice Hall Iberia; 2012.
  31. Sánchez A. Efecto inhibitorio de *Allium cepa* y *Allium sativum* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*. [Tesis para obtener el título de

- Médico Veterinario Zootecnista]. Universidad de Veracruz, 2013.
32. Repetto Jiménez M, Repetto Kuhn G. Toxicología fundamental. 4<sup>ta</sup> Edición. Madrid: Díaz de Santos; 2009.
  33. Aguilar, Franco, Módulo 3. "Toxicología Laboral Básica", Curso de formación para el desempeño de funciones de nivel superior en prevención de riesgos laborales en la administración general del Estado. I.N.S.H.T. España. 2001.
  34. Repetto, M. SANZ, P. Glosario de términos Toxicológicos. Asociación Española de Toxicología (AETOX). España. 1995.
  35. Du Four, V. Van Larebeke, N. Janssen, R. Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples in Flanders, Belgium. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 558 (1), 155-167. 2004.
  36. Azqueta, A., Gutzkow, K. B., Brunborg, G., & Collins, A. R. (2011). Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 724(1-2), 41–45.
  37. Paduch, R., et. al. Terpenos: sustancias útiles en la asistencia sanitaria humana. Lublin-Polonia. *Immunología y Tratamientos Experimentales*. 2007, pp. 315-327 Hernández, Moreno, Zaragoza, Porres. *Tratado de Medicina Farmacéutica*. España: Médica panamericana, S.A. 2011.
  38. Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J. R. K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P& Drets, M.E. (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation. Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504 (1), 17-36.
  39. Betancur Alejandra. Evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad del material químico en filtro PM2.5 de las estaciones de monitoreo de la red de calidad del aire del Valle de Aburrá. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín Facultad de Minas Departamento de Geociencias y Medio Ambiente Medellín, Colombia. 2016.
  40. Vázquez Alejandro, Kremenutzky, Eduardo. Guía de Genética: Mutaciones. España. Revisión. 2015.
  41. Wall M, Wani M (1993) Antimutagenic agents from natural products of terrestrial and marine origin. En: *Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms*, III Edited by G Bronzetti et al, Plenum press, New York, p 87-97.
  42. Alice C, Vargas V, Silva G, de Siqueira N, Schapoval E, Gleve J, Henriques A (1991) Screening of plants used in South Brazilian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 35 p 165-171.
  43. Hoffmann G. Genetic toxicology. En: *Toxicology: the basic science of poisons*. 5 ed. New York: Cassarett and Doull's; 1996: 269-300.
  44. Romero Magdalena. "Estudio antigenoticológico y de citotóxicidad de plantas medicinales de uso cotidiano y de sus fenoles más característicos". Tesis Doctoral. Córdoba-Colombia. 2013.
  45. Puerta Concepción, Urueña Claudia. *Prácticas de Biología Molecular*. Edit. Pontificia Universidad Javeriana.
  46. Voet Donald, Voet Judith. *Bioquímica*. 3era edición. Edit. Panamericana. Argentina. 2004.
  47. Zavala Jorge. *Manual de Técnicas Básicas DE Biología Molecular*. Edit. De la Universidad Autónoma de Yucatán. México..2005.
  48. Díaz Nieves y col. *Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Córdoba.
  49. Zúñiga L. Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación

- en biomonitorización humana. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Departamento de genética y microbiología. Grupo de Mutagénesis; 2009
50. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2da Edición. Fondo editorial; 1994.
  51. Lodish H, Berk A, Lawrence Z, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Biología celular y molecular. 4a ed. Madrid: Médica Panamericana S.A.; 2012.
  52. Yoc A, Soto E, Gutiérrez J y Arriola M. Estudios de actividad biocida, citotóxica y genotóxica de tres plantas medicinales de la familia Euphorbiaceae: *Euphorbia lancifolia*, *Cnidoscolus aconitifolius* var. "mansa" y *Cnidoscolus aconitifolius* var. "estrella". [Tesis para optar título]. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2012
  53. Larrea-Poma M. Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay. La Paz. Universidad Mayor de San Andrés; 2007
  54. Miranda T, Valer G. Protocolos de Biología Molecular. Editorial Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2013.
  55. Taiz, L. Zeiger, E. Fisiología vegetal. Vol. 1. Universidad de California. Los Ángeles. Edit. Universitat Jaume. 2006.
  56. Repositorio Institucional de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Identificación de Principios Activos en seis especies del Género *Baccharis*. Disponible en: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/1226/1/T-ESPE-025146.pdf>
  57. Céspedes, C. Salazar, J. Química de la flora mexicana. Instituto de Química Universidad Nacional Autónoma de México. México. 2006.
  58. Bonilla, M. estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Colombia. 2005.
  59. Shahidi, F. y Naczki, M. Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press. Londres. pp.1-16. 2004.
  60. Peñarrieta, J. Tejeda, L. Mollinedo, P. Vila, J. Bravo, J. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. Revista boliviana de Química. pp. 68-81. Universidad Mayor de San Andrés Bolivia. La Paz-Bolivia. 2014.

## **ANEXOS**

**Anexo 1.** Clasificación taxonómica de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo".  
Ayacucho 2019.



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

**C E R T I F I C A**

Que, la Bach. En Biología, **Srta. Giulia Katherine, BEIZAGA BAUTISTA**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	ASTERALES
FAMILIA	:	ASTERACEAE
GENERO	:	Artemisia
ESPECIE	:	<b><i>Artemisia absinthium</i> L.</b>
N.V.	:	"ajenjo"

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

Ayacucho, 8 de Setiembre del 2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM HUAMANGENSIS  
  
Elga Laura Aucasime Medina  
JEFE

**Anexo 2. Descripción Botánica de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo”. Ayacucho 2019.**

**DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE AJENJO**

Nombre científico : ***Artemisia absinthium* L.**  
Nombre vulgar : “ajenjo”  
Familia : Asteraceae

**CARACTERÍSTICAS :**

Es una planta herbácea perenne, de tallos erguidos o decumbentes bastante ramificados, de aproximadamente 1 metro de alto; tanto tallos y hojas presentan un color blanco cenizo debido a la presencia de pelos glandulares blanquecinos y sedosos, las hojas son pecioladas, bipinnadas, con los foliolulos alargados muy aromáticas que despiden un olor fuerte desagradable y persistente. Las flores se presentan formando numerosas cabezuelas pequeñas y amarillentas.

**HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN:**

Es una especie originaria de Europa, crece en forma cultivada en huertos y jardines, o en forma silvestre, en costa, sierra y selva generalmente en zonas húmedas. Se encuentra en todas las estaciones del año, de preferencia en época lluviosa donde florece y fructifica. Se propaga mediante esquejes.


**USOS:**

Se usa como planta medicinal utilizando la infusión de las hojas en pequeñas cantidades para cólicos hepáticos y renales, como depurativo de la sangre, como antiespasmódico, digestivo, como regulador de la menstruación, para combatir la obesidad, diabetes y otras.

El ajeno es tóxico en dosis elevada, produce intoxicaciones del sistema nervioso manifestándose con dolor de cabeza, náuseas, mareos y pérdida del conocimiento; como abortivo utilizando la decocción de las ramas tiernas y hojas. También se usa como insecticida utilizando el extracto de la planta como repelente de pulgones, polillas y otros insectos.


La planta presenta un aceite esencial conteniendo entre otros, un glucósido (la absintina) y una cantidad importante de principio amargo. (Brack. A. Diccionario enciclopédico de Planas útiles del Perú).

Ayacucho, 8 de Setiembre del 2017.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HUAMANGA  
  
Dña. Lucina Rocasime Medina  
JEFE



**Anexo 3.** Constancia de tamizaje fitoquímico de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo".  
Ayacucho 2019.



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MEDICINA HUMANA**  
**Q.F Roxana León Aronés**  
**Laboratorio de Farmacognosia**

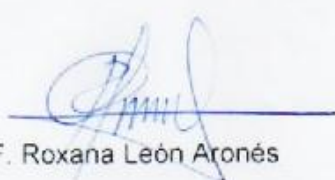
---

### CONSTANCIA

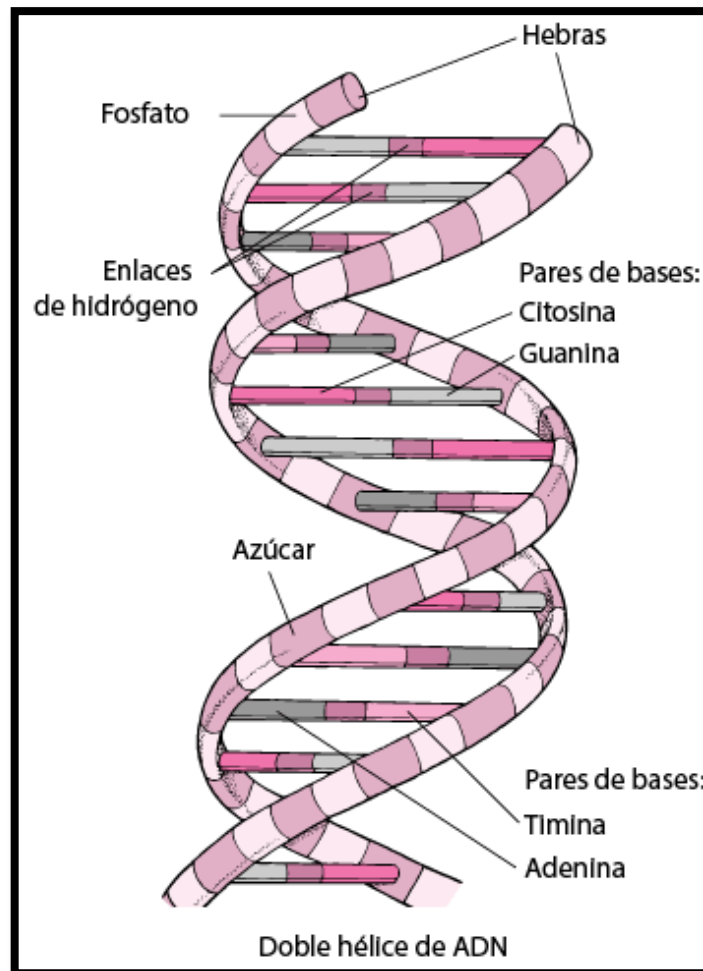
Se realizó el Screening Fitoquímico del extracto hidroalcohólico de los tallos y hojas de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo" realizado por la Bachiller en Ciencias Biológicas Giulia Katherine Beizaga Bautista, luego del tamizaje se obtuvo lo siguiente:

Ensayo	Metabolito Secundario	MUESTRA	
		Hojas	Tallos
Cloruro Ferrico	Fenoles y/o taninos	++++	++++
Dragendorff	Alcaloides	+++	+++
Mayer	Alcaloides	+++	+++
Shinoda	Flavonoides	+++	++++
Kedde	Cardenolidos	--	--
KMnO <sub>4</sub>	Sustancias reductoras	--	--
Benedict	Azucares reductores	--	+++
Ninhydrina	Aminoacidos libres	++++	++++
Espuma	Saponinas	--	--
Catequinas	Catequinas	++	+++

Ayacucho 19 de julio del 2019

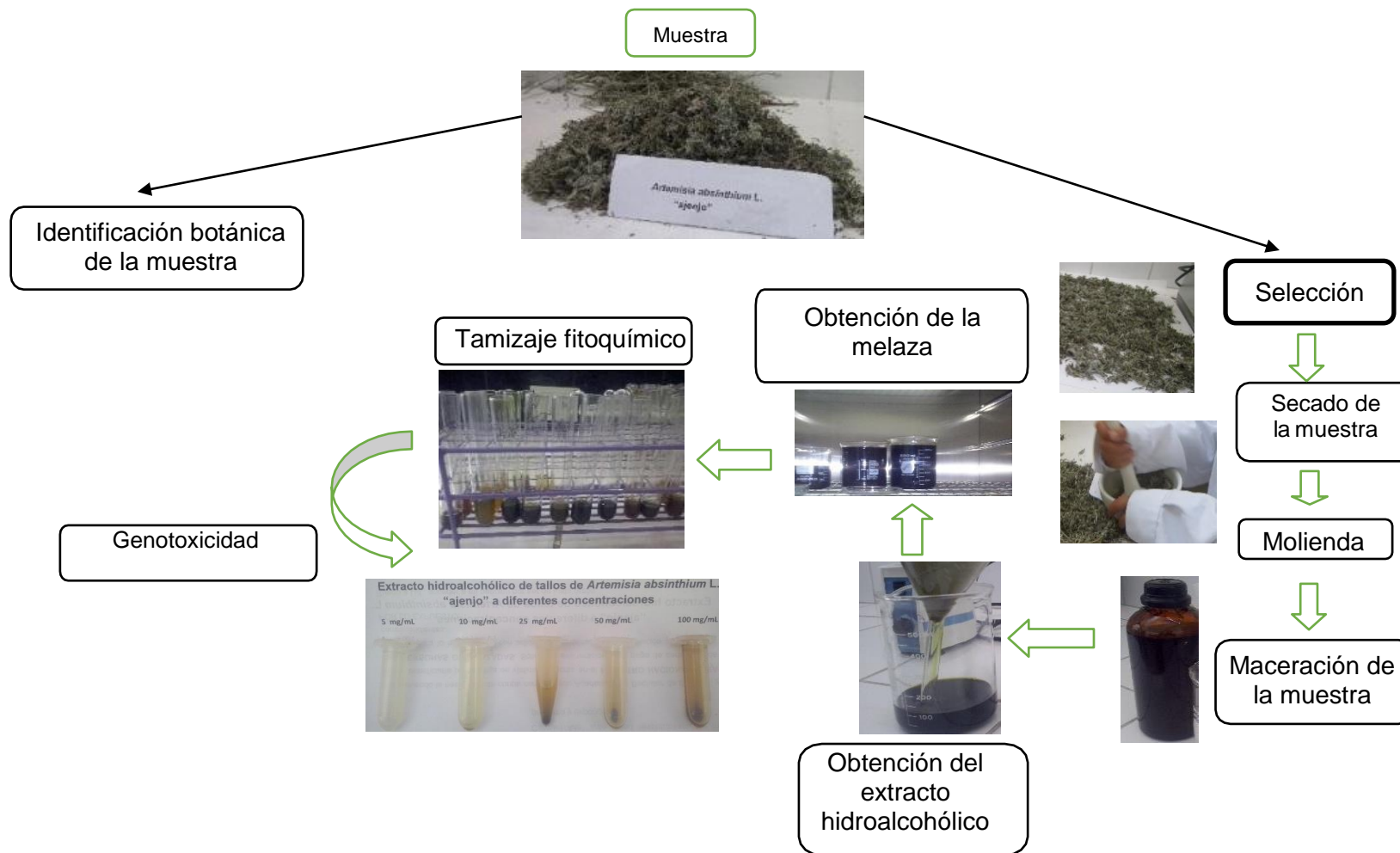
  
 Q.F. Roxana León Aronés

#### Anexo 4. Estructura del ADN

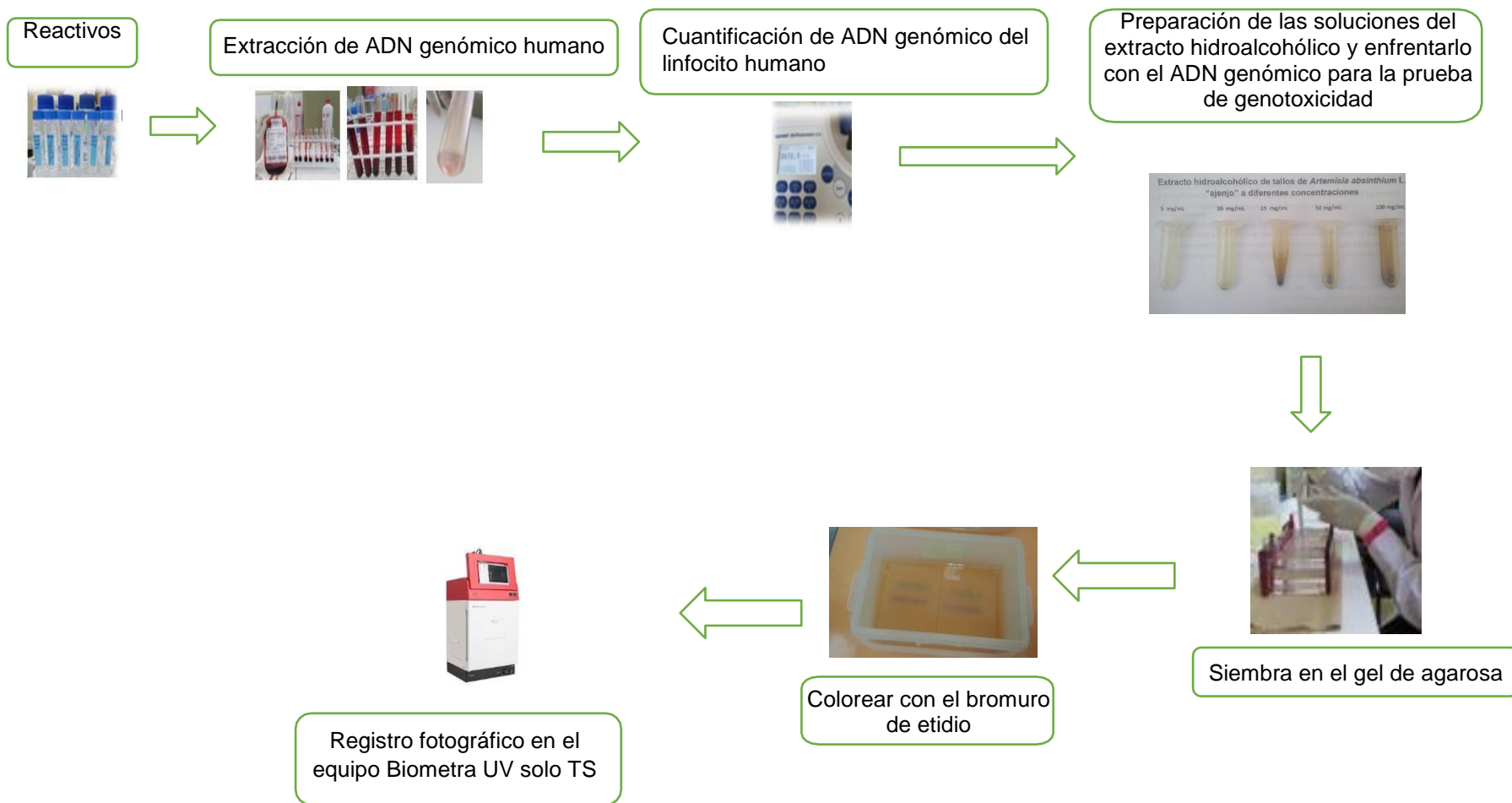




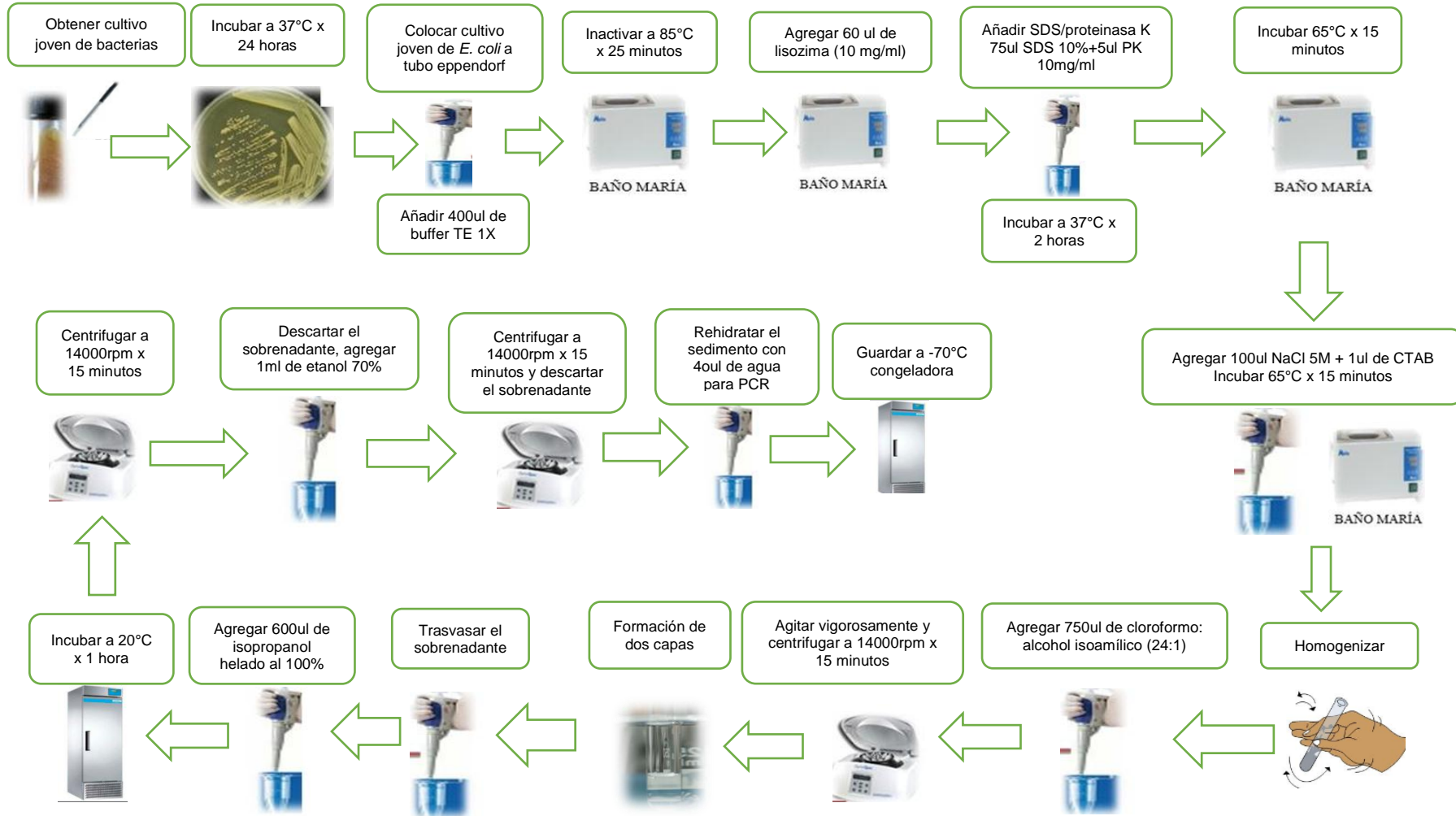
**Anexo 5.** Esquema de obtención de extracto hidroalcohólico, tamizaje fitoquímico y determinación del efecto genotóxico.



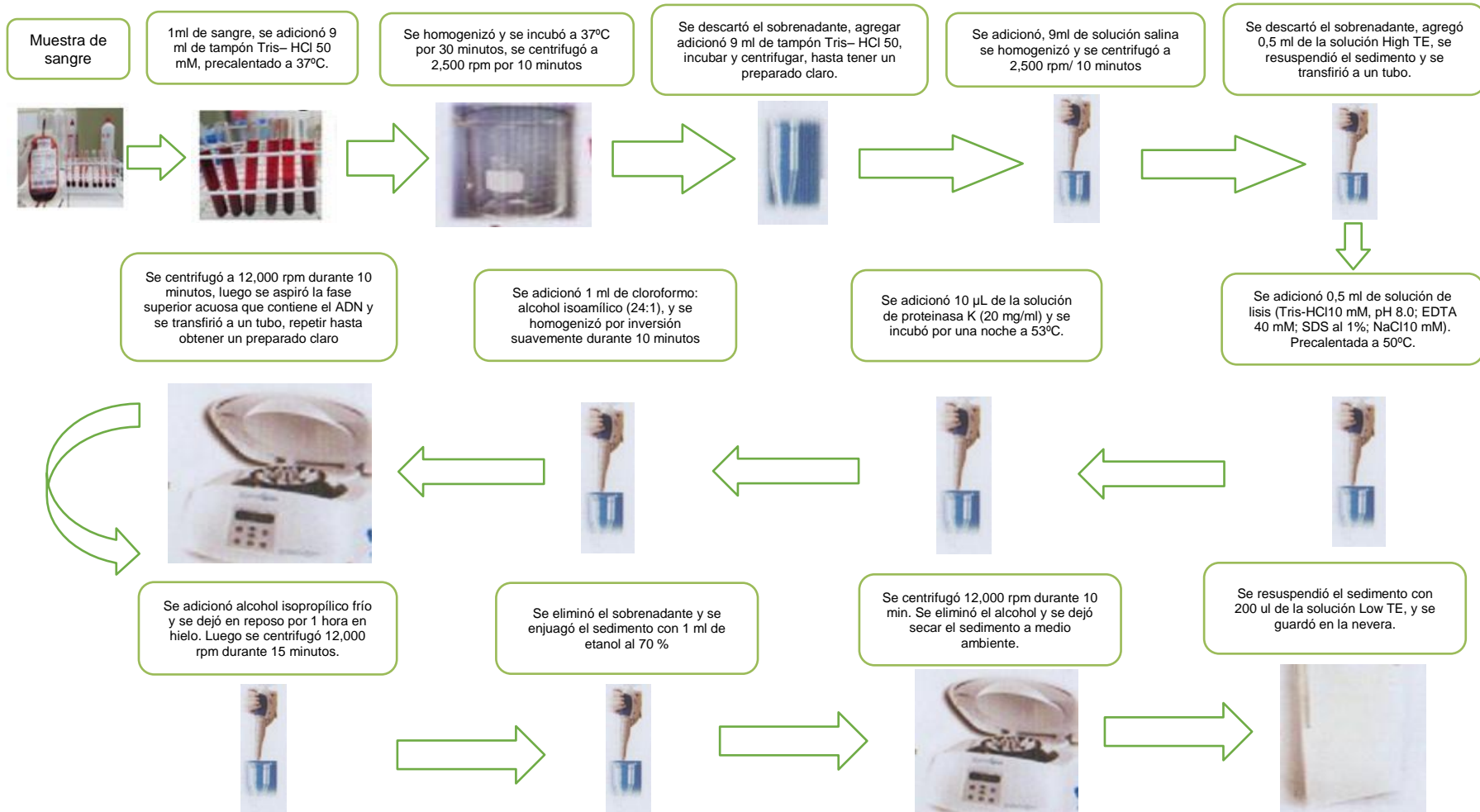
**Anexo 6.** Protocolo para la determinación del efecto genotóxico in vitro mediante electroforesis, propuesto por Miranda T.



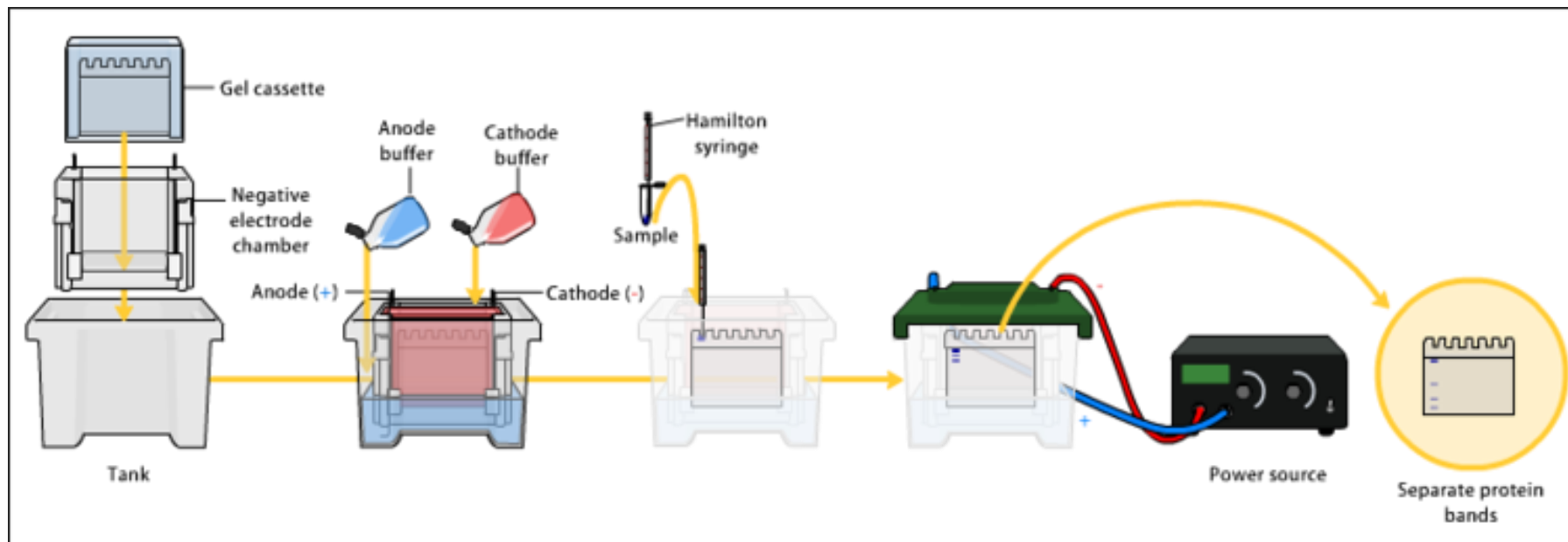
## Anexo 7. Protocolo extracción de ADN genómico de *Escherichia coli*. Ayacucho 2019



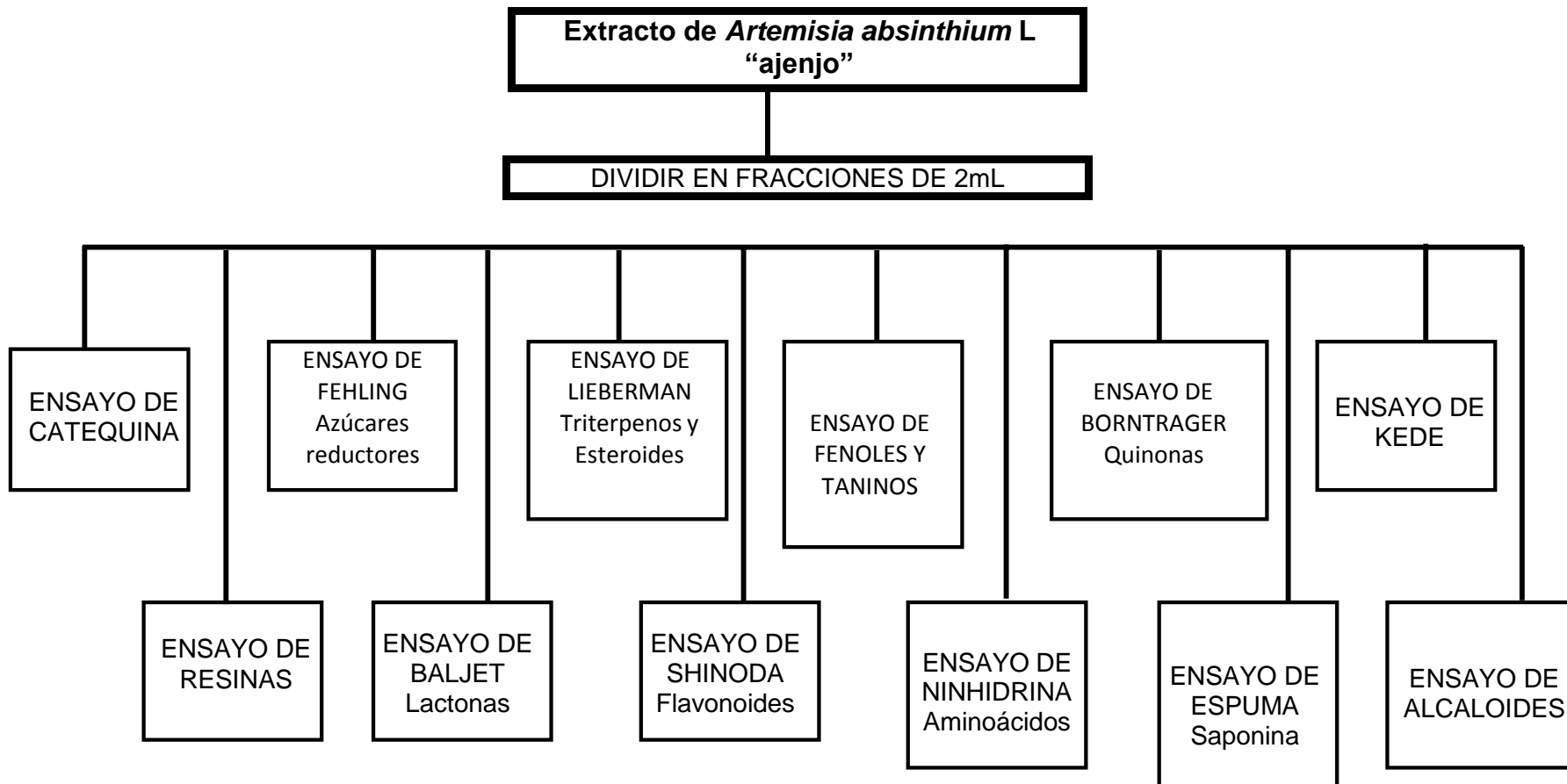
## Anexo 8. Protocolo de extracción de ADN genómico de muestra de sangre humana. Ayacucho 2019



### Anexo 9. Esquema de la electroforesis



Anexo 10. Diagrama de la Marcha fitoquímica del extracto de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo". Ayacucho 2019.



## Anexo 11. Matriz de consistencia

**Título:** Genotoxicidad in vitro del extracto hidroalcohólico de *Artemisia absinthium* L. “ajenjo” frente a ADN genómico humano y *Escherichia coli*. Ayacucho, 2019.

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	MARCO TEÓRICO	VARIABLES	METODOLOGÍA
¿Tendrá efecto genotóxico los extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo” frente a ADN genómico humano y de <i>Escherichia coli</i> ?	<p><b>Objetivo General:</b> Determinar el efecto genotóxico <i>in vitro</i> de los extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo”, frente a ADN genómico humano y de <i>Escherichia coli</i>.</p> <p><b>Objetivos Específicos:</b> Identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo”. Evaluar el efecto genotóxico de los extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo”, frente a ADN genómico humano y <i>Escherichia coli</i>.</p>	Los extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo”, presenta genotoxicidad frente a ADN genómico humano y de <i>Escherichia coli</i> .	<p><b>Aspectos Botánicos</b> <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo”</p> <p><b>Genotoxicidad</b> Las pruebas de genotoxicidad se pueden definir como ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>, diseñadas para detectar compuestos que induzcan daño genético, directa o indirectamente, por diversos mecanismos.</p>	<p><b>Variable Independiente:</b> Extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo”</p> <p><b>Indicador:</b> Metabolitos secundarios Concentración (mg/ml) del extracto hidroalcohólico.</p> <p><b>Variables Dependientes:</b> Efecto genotóxico frente a ADN genómico humano y de <i>Escherichia coli</i>.</p> <p><b>Indicador:</b> Grado de fragmentación del Ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico humano y de <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p><b>Tipo de investigación:</b> Básica – experimental.</p> <p><b>Diseño Experimental:</b> El experimento se realizará bajo la guía del modelo <i>in vitro</i> para estudiar la actividad genotóxica.</p> <p><b>Población:</b> <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo” que crecen en el distrito de Huanta, provincia de Huanta, región Ayacucho.</p> <p><b>Muestra:</b> Hojas y tallos de <i>Artemisia absinthium</i> L. “ajenjo”, en cantidad de dos Kg, obtenidos en la ciudad de Huanta.</p> <p><b>Unidad experimental:</b> ADN genómico humano y de <i>Escherichia coli</i> a concentración de 1500 ng/ <math>\mu</math>L, respectivamente, por cada ensayo.</p> <p><b>Análisis estadístico:</b> Paquete estadístico SPSS, Pruebas de Kruskal-Wallis.</p>