

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Efecto genotóxico *in vitro* del extracto
hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium
brevicalix* Epl. “urqu muña” frente al ADN genómico
humano. Ayacucho, 2018.**

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

**Presentado por la:
Bach. ATAUCUSI ORÉ, Vanessa**

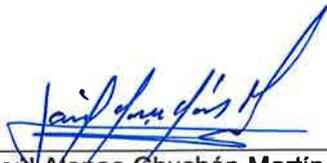
**AYACUCHO – PERÚ
2020**

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Bach. Vanessa Ataucusi Oré
R.D. No. 066-2020-UNSCH-FCB-D

A los cuatro días del mes de setiembre del año dos mil veinte, siendo las cinco de la tarde, se reunieron a través de la plataforma virtual Google Meet, los docentes miembros del jurado calificador conformado por: Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez (Presidente), Dr. Jesús De La Cruz Arango (Miembro jurado), Dr. Gilmar Peña Rojas (Miembro jurado), Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich (miembro asesor), Mg. Paula García Godos Alcázar (miembro 4to jurado), actuando como secretario docente el Mg. Rilder Nemesio Gastelú Quispe, para recepcionar la sustentación de tesis titulada: **“Efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña” frente a ADN genómico humano. Ayacucho 2018”**, presentada por la Bach. Vanessa Ataucusi Oré; 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 preguntas relacionadas al tema; el asesor se comprometió realizar las correcciones y sugerencias realizadas. Concluida esta etapa, el presidente invitó al sustentante y al público presente abandonar el auditorio a fin de proceder a la deliberación y calificación correspondiente, alcanzando los siguientes resultados:

MIEMBROS DEL JURADO EVALUADOR	EXPOSICIÓN	RESPUESTA A PREGUNTAS	PROMEDIO
Dr. Jesús De La Cruz Arango	17	17	17
Dr. Gilmar Peña Rojas	15	14	15
Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich	17	17	17
Mg. Paula García Godos Alcázar	16	13	15
		PROMEDIO	16

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



Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez
Presidente



Dr. Jesús De La Cruz Arango
Miembro – Jurado



Dr. Gilmar Peña Rojas
Miembro – Jurado



Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich
Miembro - Asesor



Mg. Paula García Godos Alcázar
Miembro – Cuarto jurado



Mg. Rilder Nemesio Gastelú Quispe
Secretario - Docente



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

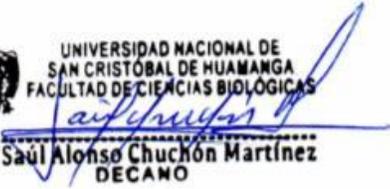
DECANATURA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS N° 006-
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: **“Efecto genotóxico in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña” frente al ADN genómico humano. Ayacucho, 2018”**, presentado por la Bach. VANESSA ATAUCUSI ORÉ; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 23%, 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-UNSCH-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, 17 de junio del 2021.


UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Dr. Saul Alonso Chuchón Martínez
DECANO

Efecto genotóxico in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña” frente al ADN genómico humano. Ayacucho, 2018.

por Vanessa Ataucusi Oré

Fecha de entrega: 17-jun-2021 01:16p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 1608143634

Nombre del archivo: 1A____ATAUCUSI_ORE_VANESSA____PRE_GRADO____2021____TURNITIN.docx (851.07K)

Total de palabras: 11958

Total de caracteres: 62411

Efecto genotóxico in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicalix* Epl. “urqu muña” frente al ADN genómico humano. Ayacucho, 2018.

INFORME DE ORIGINALIDAD

23 %

INDICE DESIMILITUD

23%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	16%
2	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	4%
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
4	rpmesp.ins.gob.pe Fuente de Internet	1%
5	alicia.concytec.gob.pe Fuente de Internet	1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

< 30 words

Excluir bibliografía

Activo

A mis padres Moisés y Sofía, por su amor, confianza y apoyo incondicional que me permitió forjarme como profesional.

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 solo como profesional sino también como mejor persona.

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

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Antecedentes	5
2.2. Marco conceptual	7
2.2.1. <i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña”	7
2.2.2. Ácido desoxirribonucleico (ADN o DNA) genómico humano	10
2.2.3. Extracción de ADN en sangre	11
2.2.4. Toxicidad y genotoxicidad	11
2.2.5. Electroforesis en gel	14
2.2.6. Espectrofotometría	15
2.2.7. Ensayo cometa (EC)	16
2.2.8. Evaluación de la genotoxicidad in vitro por el “Método Tomasevich”	18
III. MATERIALES Y METODOS	21
3.1. Lugar de ejecución	21
3.2. Población y muestra	21
3.2.1. Población	21
3.2.2. Muestra	21
3.2.3. Muestreo	21
3.3. Unidad experimental	21
3.4. Metodología y recolección de datos	22
3.4.1. Recolección de la muestra	22
3.4.2. Preparación del extracto hidroalcohólico de <i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña”	22
3.4.3. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña”	22
3.4.4. Extracción de ADN genómico a partir de sangre humana	23

3.4.5. Cuantificación y calidad de ADN genómico humano	25
3.4.6. Ensayos de la genotoxicidad in vitro	26
3.5. Tipo de investigación	29
3.6. Diseño de investigación	29
3.7. Análisis de datos estadísticos	29
IV. RESULTADOS	31
V. DISCUSIÓN	45
VI. CONCLUSIONES	53
VII. RECOMENDACIONES	55
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	61

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características producidas en los ensayos para la identificación de los metabolitos secundarios de plantas.	23
Tabla 2. Preparación de carga de ADN para visualización de banda en electroforesis.	25
Tabla 3. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> de extracto hidroalcohólico de <i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, frente al ADN genómico humano.	26
Tabla 4. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> de extracto hidroalcohólico de <i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña” a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente al ADN genómico humano.	27
Tabla 5. Preparación de las mezclas para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN genómico humano en el ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña” ” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, frente al ADN genómico humano.	27
Tabla 6. Preparación de las mezclas para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN genómico humano en el ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña” a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente al ADN genómico humano.	28
Tabla 7. Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual	29
Tabla 8. Diseño de investigación con pos-prueba únicamente y grupo de control	29
Tabla 9. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña”. Ayacucho, 2019	33
Tabla 10. Cuantificación por espectrofotometría ultra violeta marca	34

	Eppendorf Bio Photometer plus de ADN genómico humano obtenido mediante extracción orgánica. Ayacucho, 2018	
Tabla 11.	Valores numéricos del ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente, frente al ADN genómico humano incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019	38
Tabla 12.	Valores numéricos del ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de tallos de <i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente, frente al ADN genómico humano incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019	42

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña”.	9
Figura 2. Estructura química de ADN.	11
Figura 3. Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1 % del ADN genómico humano, obtenido de seis muestras y coloreado con bromuro de etidio. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2018.	35
Figura 4. Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña” 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 2018.	36
Figura 5. Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña” a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente a ADN genómico humano incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2018.	37
Figura 6. Prueba de Kruskal-Wallis (H=35,00, GL=8, P=0.000): para determinar el grado de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente, frente al ADN genómico humano, incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.	39
Figura 7. Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de tallos de <i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, frente al ADN genómico humano incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2018.	40
Figura 8. Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de tallos de <i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña” a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente al ADN genómico humano incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2018.	41

Figura 9. Prueba de Kruskal-Wallis ($H=35,00$, $GL=8$, $P=0.000$): para 43
determinar el grado de genotoxicidad *in vitro* del extracto
hidroalcohólico de tallos de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu
muña” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400
y 500 mg/mL, respectivamente, frente al ADN genómico
humano, incubado a 37 °C durante una hora. CIBMB-UNSCH.
Ayacucho 2019.

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Clasificación taxonómica de <i>Clinopodium brevicalix</i> Epl. “urqu muña”. Ayacucho 2018	63
Anexo 2. Herbarium de la planta de <i>Clinopodium brevicalix</i> Epl. “urqu muña”. Vinchos-Ayacucho 2018	64
Anexo 3. Formato de consentimiento informado individual. Ayacucho 2018	65
Anexo 4. Ubicación geográfica de la zona de muestreo de la planta de <i>Clinopodium brevicalix</i> Epl. “urqu muña”. Vinchos-Ayacucho 2018	66
Anexo 5. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Clinopodium brevicalix</i> Epl. “urqu muña”	67
Anexo 6. Screening fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Clinopodium brevicalix</i> Epl. “urqu muña”, Ayacucho 2018	68
Anexo 7. Protocolo de extracción de ADN genómico humano. Ayacucho 2018	69
Anexo 8. Preparación de soluciones digestivas de DNA genómico humano a diferentes concentraciones del Extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Clinopodium brevicalix</i> Epl. “urqu muña” Ayacucho 2018	70
Anexo 9. Extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Clinopodium brevicalix</i> Epl. “urqu muña” a diferentes concentraciones Ayacucho 2018	71
Anexo 10. Proceso para la determinación del Extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Clinopodium brevicalix</i> Epl. “urqu muña” a diferentes concentraciones. Ayacucho 2018	72
Anexo 11. Diagrama de equipo de electroforesis	73
Anexo 12. Matriz de consistencia	74

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo determinar el efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña” frente al ADN genómico humano, e identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos. Se desarrolló 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 de la planta en estudio “urqu muña”, se obtuvieron mediante maceración, luego se realizó el análisis fitoquímico y el efecto genotóxico *in vitro* que fue determinado con el “Método Tomasevich”, mediante electroforesis en gel de agarosa”. Los metabolitos secundarios identificados cualitativamente fueron: taninos y/o fenoles, en concentración abundante (++++) en hojas y tallos; flavonoides en concentración regular (+++) en hojas y trazas (+) en tallos; catequinas en regular (+++) concentración en hojas y poca (++) concentración en tallos; saponinas en regular (+++) concentración en hojas y ausente (-) en tallos y alcaloides en trazas (+) tanto en hojas como en tallos; mientras que, no se detectó la presencia de azúcares reductores, resinas ni mucílago. La cuantificación del ADN se realizó mediante espectrofotometría UV del ADN genómico humano, se tuvo dos personas donadoras voluntarias de sangre; las concentraciones de ADN obtenidas fue desde 1122,8 µg/mL hasta 3857,8 µg/mL, estas concentraciones fueron altas y el nivel de pureza fue aceptable. El resultado de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de la planta en estudio a diferentes concentraciones (5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL) frente a ADN genómico humano a 1500 ng/µL, muestran bandas de ADN ligeramente disminuida en su concentración respecto a la del “control”, debido a la fragmentación que ha sufrido por efecto del extracto, a partir de los 25 mg/mL, además la muestra tratada con la enzima proteinasa K, evidencia reducción de la intensidad y fragmentación del ADN, con respecto al control, que reafirma la acción de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico y no por las enzimas nucleasas que podrían proceder de las hojas del “urqu muña”. Del extracto hidroalcohólico de tallos de “urqu muña” a similares concentraciones, frente al ADN genómico humano a 1500 ng/µL, la degradación inicio a partir de 200 mg/mL. El análisis estadístico con la prueba de Kruskal – Wallis, demuestra que a diferentes concentraciones tienen efecto en la reducción de la intensidad de las bandas de ADN. En consecuencia, el grado de fragmentación del ADN genómico humano tratado, depende de la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de la planta en estudio. Se concluye que el efecto genotóxico de los extractos hidroalcohólicos de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña” frente a ADN genómico humano, depende de la concentración, manifestándose en hojas a partir de 25 mg/mL, sin embargo, en el tallo fue a partir de 200 mg/mL.

Palabras clave: Genotoxicidad, *Clinopodium brevicalex*, “urqu muña”.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son el principal remedio en los sistemas de medicina tradicional. La Organización Mundial de la Salud ha mostrado permanente interés en este tipo de producto para el mantenimiento de salud de muchos pueblos, especialmente en los que están en vía de desarrollo, por su vínculo fundamental con la atención primaria de salud, los que fueron avizorados desde la declaración de Alma-Ata en 1978. Cabe señalar que las plantas medicinales son, dentro de este tipo de medicina, las que más se usan y más cerca están a la medicina convencional.¹

Las plantas superiores son fuente de millones de productos naturales, con una variedad casi infinita de estructuras diferentes. Estas moléculas a menudo tienen funciones específicas y muchas de ellas tienen actividades biológicas que pueden ser útiles para los seres humanos. Estas también pueden constituirse en herramientas indispensables en la investigación médica para el desarrollo de nuevos fármacos. Dado que la naturaleza nos brinda una gama impredecible de estructuras y sustancias novedosas, resulta sumamente valioso evaluar tantos productos naturales como sea posible, con el fin de encontrar fuente de nuevos fármacos.²

Durante siglos las plantas constituyeron los únicos medicamentos con que contaban los seres humanos, con el desarrollo de la química médica a comienzos del siglo XIX, las plantas fueron también la primera fuente de sustancia para producir fármacos. En la actualidad a pesar del increíble desarrollo de la química farmacéutica sintética y de la fermentación microbiana, los fármacos derivados de plantas siguen teniendo una posición destacada.²

Entre las casi 400.000 plantas de la tierra, sólo una pequeña parte ha sido estudiada por fitoquímica y aún menos han sido seleccionadas por biología o farmacología. Además, los extractos de plantas pueden contener miles de

metabolitos secundarios, a diferencia de cualquier estudio fitoquímico de una planta determinada.²

En el Perú, *Clinopodium brevicalex* Epl. "urqu muña", crece en territorios alto andino mayormente entre los 3 500 y 3 800 msnm. Esta especie se desarrolla en la zona andina, su hábitat es de climas fríos y templados, creciendo de manera silvestre en las montañas, laderas secas y pedregosas, matorrales de terrenos calcáreos y faldas de cerros junto con los ichus. Crece y se desarrolla en las regiones de Cuzco, Apurímac, Huancavelica, Junín y en mayor cantidad por considerarse aborigen, en la región de Ayacucho.³ En medicina popular se usa como desinflamante de las amígdalas, como estimulantes, analgésicos, antibacterianos, digestivo contra gases tomando en infusión, como antigripales, antimicóticos, etc.⁴

Carhuapoma⁵ ha determinado que el aceite esencial de *Satureja brevicalex* (ahora *Clinopodium brevicalex* Epl. "Urqumuña") tiene efecto anti-*Helicobacter pylori*, con una concentración inhibitoria mínima de 1,00 µg / mL y una concentración bactericida mínima de 2,00 µg / mL. La citotoxicidad de los aceites esenciales confirma su alta actividad biológica, y su concentración letal promedio (CL50) es de 13,35 µg / mL. Su dosis letal media (DL50) es de 655,26 mg / kg, que se considera tóxica. Comparado con trolox⁵ el aceite esencial de *Satureja brevicalex* muestra un efecto antioxidante significativo. También reportaron 35 compuestos con un contenido del 97,1%. Incluso: Paracetamol, linalol, mentona, isomentona, cis isoflurona, trans isoflurona, carvacrol, timol, α-terpineol, macrogoldeno bicíclico, p-cariofileno, bicicloalquenos, p-isopropilo, limoneno, terpineno y espatulenol. Utilizando el método de difusión en disco, a una concentración de 10 µg / mL, en comparación con la amoxicilina, obtuvo un halo inhibitorio de 33,33%, CIM de 1 µg / mL y WBC de 2 µg / mL.⁵

Estudios para determinar la genotoxicidad que ejercen las plantas medicinales, han alcanzado gran importancia en los últimos años; Se hace para determinar el posible daño a los humano.⁶

La prueba que demuestra claramente la genotoxicidad causada por varios compuestos es la rotura del ADN genómico, la rotura de macromoléculas a nivel de enlaces fosfodiéster y / o enlaces de hidrógeno. Electroforesis en gel de agarosa. Cuando el ADN pasa a través de un gel de agarosa, los fragmentos de diferentes tamaños se separan equidistantemente entre sí, utilizando un patrón de escalera típico; o en otro caso, el tamaño de la banda del ADN disminuye

proporcionalmente a la fragmentación cuando se compara con una banda de ADN “control” que no haya recibido ningún tratamiento.^{6,7}

Por su conveniencia, la investigación permitirá incrementar los conocimientos respecto a las actividades de los diferentes metabolitos secundarios; los mismos que poseen efectos curativos a diversos males que también pueden ejercer una actividad genotóxica sobre el ADN.⁷

El propósito de la investigación está orientado a generar conocimientos de la actividad genotóxica *in vitro* de la planta de uso medicinal “urqu muña”.

Objetivo general

Determinar el efecto genotóxico *in vitro* de los extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña” frente al ADN genómico humano.

Objetivos específicos

1. Identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña”.
2. Evaluar el efecto genotóxico de los extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña” frente al ADN genómico humano.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Según Soto (1999).⁹ mencionó que la actividad antiinflamatoria y analgésica del extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* (ahora *Clinopodium brevicalyx* Epl. "Urqumuña"), con una actividad de alrededor de ácido acetilsalicílico a 400 miligramo / kilogramo. Más bajo que el ketorolaco.⁸

Inga y Guerra (2000).⁹ demostraron los efectos del aceite importante de *Minthostachys mollis* en *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* MC, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella Panasonic MC*, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae 10033* por medio de un análisis, además del impacto bacteriostático / fungicida sobre *Fusarium* y *Aspergillus niger*.⁹

Díaz (2002)¹⁰ señala que la actividad antiespasmódica de intestinos aislados de cobayo por medio de infusión acuosa al 5% de hojas y copas florales de *Satureja brevicalyx*, demostrando un ligero impacto antiespasmódico sobre la N-butilbromuro de hioscina.¹⁰

Díaz (2005).¹¹ muestra el impacto antibacteriano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* "muña" contra cepas estándar de ATCC de *Salmonella mutans*, *Lactobacillus sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actibimiceten comitans* y *Actinomices sp.*; teniendo a la Amoxicilina y agua como controles positivo y negativo, respectivamente Llegaron a la conclusión, el aceite importante de *Minthostachys mollis* "muña" tiene una actividad antibacteriana media de 16,75 mm. Halo de diámetro.¹¹

Palomino (2005).¹² concluyó que el extracto de agua liofilizado de hojas de *Satureja brevicalyx* tiene la función de atrapar radicales libres. Además, los niveles de peroxidación lipídica, glutatión y proteína hepática no fueron estadísticamente de manera significativa diferentes, usados para medir el estrés oxidativo.¹²

Carhuapoma (2007).⁵ muestra que el aceite esencial de *Satureja brevicalyx* (ahora *Clinopodium brevicalex* Epl. "Urqumuña") tiene impacto anti-*Helicobacter pylori*, con una concentración mínima inhibitoria de 1.00 µg / mL y una concentración mínima inhibitoria de 2.00 µg / mL fungicida. La citotoxicidad de los aceites fundamentales afirma su alta actividad biológica, y su concentración letal promedio (CL50) es de 13,35 µg / mL. Su dosis letal media (DL50) es de 655,26 mg / kg, Considerado tóxico. Comparado con trolox, además reportó 35 compuestos al 97,1%; entre estas tenemos a: pulegona, linalol, mentona, isomentona, cis-isopulegona, trans-isopulegona, carvacrol, timol, a-terpineol, biciclogermacreno, p-cariofileno, bicicloelemeno, p-cimeno, limoneno, terpineno, y el espatulenol. Utilizando el método de difusión de discos, consiguió una inhibición del halo del 33,33% a una concentración de 10 µg / ml, con una CIM de 1 µg / ml y leucocitos de 2 µg / ml. El aceite de *S. brevicalyx* demostró su actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante.⁵

Cano (2007).¹³ hizo un análisis para revisar la actividad antimicótica *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* "muña" de Huaccrapuquio, provincia de Tarma. Se observaron elevados efectos antifúngicos una vez que las concentraciones de cepas de *Candida albicans* y dermatofitos *Trichophyton surans*, *Trichophyton mentagrophytus* y *Microsporun canis* en concentraciones de 50% y 100%, también fueron de 5 y 50 mL, respectivamente. Los próximos elementos químicos contenidos en los aceites fundamentales: *Pulegone*, *mentona* y limoneno¹³

Mora y et al. (2009).¹⁴ se inspeccionó y analizó la estructura química del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (Kunth) Grisebvar Vaught. Fueron recolectados en Tuñame, Trujillo, Venezuela en el primer mes del año de 2008, y fueron separados e ubicados por cromatografía de gases y espectrometría de masas El aceite esencial se recibe por medio de hidrodestilación, y por medio de comparación se identifican trece elementos (98,5% de la muestra). Ambos elementos primordiales son pulegolona (55,2%) y trans-mentona (31,5%). Los aceites fundamentales mostraron un impacto inhibitorio importante sobre las bacterias Gram positivas y las bacterias Gram positivas, en especial *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi* (4 µg / ml) .¹⁴

Montes (2013)¹⁵ determino la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración Mínima de fungicida (CMF) del aceite sustancial *Satureja brevicalyx* Epl. Comparativamente con *Candida albicans* ATCC 10231, "wayra

muña" es 1,198 miligramo / mL y 2,396 miligramo / ml, respectivamente. frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Mientras que, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del extracto hidroalcohólico, fue de 0,046 mg/mL y 0,093 mg/mL, respectivamente, frente a la misma cepa de *Candida*. El extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" presentó mejor actividad antimicótica al 0,5 % a comparación de su aceite esencial.¹⁵

Marca P y et al. (2018) 16, valoraron la genotoxicidad *in vitro* del ajo y el jugo de ajo. Luego de 5 días de remojo, se recibe un extracto etanólico de 96°. Para *Staphylococcus sp.* Se analizaron diferentes concentraciones de ADN genómico para decidir su *genotoxicidad*. Y use el "procedimiento Tomasevich" para decidir el costo querido del mal *genotóxico in vitro*. Los metabolitos secundarios que identificaron en el extracto etanólico de los bulbos de "ajo" fueron monumentales porciones de fenoles y / o taninos. Jugo: varios fenoles y / o taninos y saponinas, así como enol lactonas. La concentración del extracto etanólico de bulbos de "ajo" ha sido de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 miligramo / mL, que no enseñó impacto genotóxico sobre el ADN genómico de *Staphylococcus. sp.* La prueba de Kruskal-Wallis (H = 0.53; GL = 3; mientras tanto que la concentración de jugo de bulbo de "ajo" es 5, 10, 50 y 100%, respectivamente) muestra un profundo impacto genotóxico, lo cual provoca que el ADN se fragmente en un 100%. p = 0,912). Concluyeron que el jugo de los bulbos de ajo es enormemente genotóxico para el ADN genómico de *Staphylococcus sp.*¹⁶

Se cuenta con pocas publicaciones de estudios con *Clinopodium brevicalyx* Epl. "urqu muña"; sin embargo, podemos citar investigaciones muy relacionados a ésta planta como el de Contreras¹⁷ que estudia la actividad antibacteriana del aceite importante de culantrillo (*Minthostachys mollis*), que muestra cualitativamente sus efectos antinicoticos frente a *Shigella*, *Salmonella typhimurium* y el impacto antibacteriano de *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* es el más sensible al aceite esencial de "muña".¹⁷

2.2. Marco conceptual

2.2.1. *Clinopodium brevicalyx* Epl. "urqu muña"

2.2.1.1. Clasificación Taxonómica

Mediante el sistema de clasificación de A. Cronquist (1981)^{18,19}, la especie en estudio se ubica en la categoría taxonómica detallada en el anexo N° 1, cuya identificación estuvo a cargo de la Blga. Aucasime²⁰ de la Facultad de Ciencias

Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y es como sigue:

División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Sub clase : Asteridae
Orden : Lamiales
Familia : Lamiaceae
Género : Clinopodium
Especie : *Clinopodium brevicalex* Epl.
Nombre vulgar : “urqu muña”.

Sinonimia: *Satureja brevicalyx* Epling^{18,19}

Nombre vulgar: “urqu muña”, “wayra muña”, “sacha muña”, “muña”, “inca muña”, “salqa muña” “cjunumuña”, “cjuña”, “konoc” y “orégano de los incas”.²⁰

2.2.1.2. Descripción botánica

La planta subfrútice o semileñosa, de aproximadamente 20 a 30 cm de tamaño; de tallos postrados bastante ramificados y achaparrados, tallos tiernos generalmente provistos de pelos blanquecinos, hojas numerosas, pequeñas, simples, enteras aovadas, obtusas, cortamente pecioladas, de disposición opuesta, algo festoneadas en los márgenes y se contraen en la base para formar un rabillo bien perceptible; tanto los tallos como las hojas están provistas de pelos glandulares llenas de aceites esenciales que le dan el aroma característico a mentol.²⁰

Inflorescencias dispuestas en cimas axilares, formadas por numerosas flores pequeñas de tres a cuatro mm que nacen en la axila de las hojas formando unos ramilletes; flores zigomorfas, heteroclamídeas, bisexuales y pentámeras; Cáliz formado por cinco sépalos verdosos, con nervios prominentes, tubulares, que terminan en cinco dientes; la corola bilabiada, formado por cinco pétalos blanquecinos, soldados en la base con el ápice bilabiado con 4 estambres adosados al labio superior, didínamos (dos grandes y dos ligeramente más cortos); ovario superior bicarpelar tetralocular con un estilo ginobásico y estigma bífido, con un óvulo en cada celda; fruto tetraquenio.²⁰ (Anexo N° 2).



Figura 1. *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña”.

2.2.1.3. Hábitat y distribución

En Perú *Clinopodium brevicalex* Epl. crece en territorios alto andinos mayormente entre los 3 500 y 3 800 msnm. Esta especie se desarrolla en la zona andina, su hábitat es de climas fríos y templados, creciendo de manera silvestre en las montañas, laderas secas y pedregosas, matorrales de terrenos calcáreos y faldas de cerros junto con los ichus. Se desarrolla y crece en Cuzco, Apurímac, Huancavelica, Junín y en su mayor cantidad y siendo vernácula y aborigen del departamento de Ayacucho.³

2.2.1.4. Propiedades y usos tradicionales

Se usa como fármaco antiinflamatorio para las amígdalas, estimulantes, analgésicos, antibacterianos, digestivo contra gases tomando en infusión, como antigripales, además es una medicina que se realiza en casa de manera económica y efectiva. , etc.²¹

Comúnmente se utiliza como infusión para combatir el dolor, los calambres del intestino, los cólicos y los inconvenientes estomacales. La infusión de hojas y flores se puede usar en sopas y abortos (dosis altas). Las preparaciones a modo de licores (al sumir las plantas en alcohol) se consumen constantemente gracias

a sus características medicinales, como los estomas y tónicos excitantes. Se propone usar decocciones botánicas para anemia, patologías infantiles y como expectorante (acompañado de miel). Además de características curativas, tiene insecticidas, para lo que se aplican raíces y hojas.²¹

Se tiene información de que esta planta tiene efecto curativo como *Euphorbia fischeriana*, ya se utiliza en medicina tradicional china por más de 2000 años, como droga anticancerígena; además, otras plantas de esta familia se han usado para el tratamiento de cáncer, tumores y verrugas.²²

2.2.1.5. Antecedentes etnobotánicas y etnofarmacológicas

De acuerdo con la información de etnobotánica y etnofarmacología, se usa para resolver inconvenientes gastrointestinales y arreglar trastornos menstruales. Tiene los efectos de la digestión, anti-digestión, anti-gastritis, flatulencia y efectos antiespasmódicos. En caso de dolor muscular y rigidez de cuello, además se puede usar como analgésico tostando las hojas.^{5,8}

2.2.1.6. Composición química

Su composición presenta los siguientes metabolitos: resinas, azúcares reductores, catequinas, lactonas sesquiterpénicas, triterpenos, esteroides, saponinas, taninos, flavonoides y aceites esenciales.^{5,22,22}

2.2.2. Ácido desoxirribonucleico (ADN o DNA) genómico humano

Es el primordial elemento químico de los cromosomas, y además es la sustancia que forma los genes, es propiedad de todos y tienen que hacer cada una de sus funcionalidades relevantes como almacén de información.^{23,24}

Las moléculas de ADN permanecen compuestas por largas cadenas de dinucleótidos unidas para conformar una composición de doble hélice. Las dos cadenas de nucleótidos que forman una molécula de ADN permanecen unidas entre las bases nitrogenadas de las dos cadenas opuestas.^{23,24}

En cuanto a los elementos del ADN (polímero) son nucleótidos (monómeros); cada nucleótido está compuesto de ácido fosfórico, desoxirribosa y bases nitrogenadas. Hay 4 bases: 2 purinas se denominan adenina (A) y guanina (G), y 2 pirimidinas se denominan citosina (C) y timina (T). La estructura de doble hélice del ADN tiene un apareamiento de bases reducido (adenina y timina y guanina y citosina), lo que significa la continuidad de bases o la delimitación automática del orden de una hebra de la otra hebra, razón por la cual Mencionó el motivo. Las cadenas son complementarias.^{23,24,25}

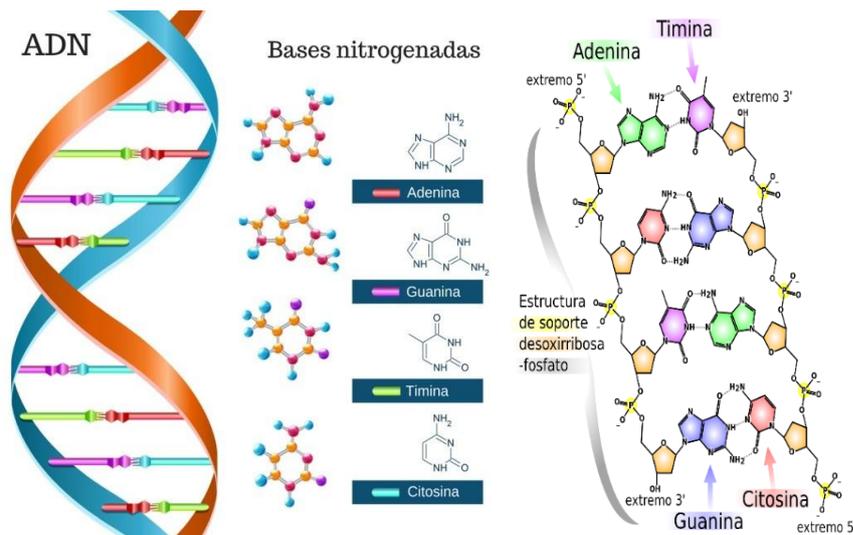


Figura 2. Estructura química de ADN.

Fuente: Wikimedia Commons. Imagen cortesía de Madeleine Price Ball.

2.2.3. Extracción de ADN en sangre

Según la obtención de ADN de una persona es esencial para incontables estudio para caracterizar el genotipo del individuo. Ya que la mayor parte de las células del cuerpo poseen copias enteras de ADN, tienen la posibilidad de usar tejidos de cualquier origen. Por consiguiente, obtener una muestra de ADN no provocará ningún tipo de mal al cuerpo, y esta clase de mal se puede obtener de forma simple y instantánea, por lo cual hay incontables maneras: la más común es la sangre entera. La sangre está formado de diversos tipos de células, los más relevantes son los glóbulos rojos y los glóbulos blancos. Los primeros carecen de núcleos pues se pierden a lo largo de la maduración, por lo cual no poseen ADN. Sin embargo, los glóbulos blancos poseen núcleos y, por consiguiente, ADN. Para obtener ADN de una muestra de sangre, únicamente se requieren glóbulos blancos. Aun cuando los glóbulos blancos tienen que purificarse primero y después extraerse el ADN de ellos, los desarrollos posteriores en esta tecnología hicieron viable en la actualidad sustraer ADN de sangre completa con la misma pureza, incrementando de esta forma la rapidez y la simplicidad.²⁶

2.2.4. Toxicidad y genotoxicidad

2.2.4.1. Toxicidad

Es la funcionalidad de una sustancia química de tener un impacto perjudicial sobre el organismo una vez que entra en contacto con ella. Además tiene interacción con esencia natural que sea tóxica (es mencionar, que la esencia tenga efectos perjudiciales una vez que entra en contacto con seres vivos).²⁷

2.2.4.2. Genotoxicidad

Tiene relación con la capacidad relativa de los agentes químicos y físicos que causan daño al material genético incluyendo todos los elementos celulares involucrados con la función y la conducta de los cromosomas en la célula. Como por ejemplos los últimos son las proteínas en relación en la reparación, condensación y descontracción del ADN en los cromosomas u otras construcciones (como los husos mitóticos), que son causantes del reparto de los cromosomas a lo largo de la separación celular. Este mal podría ser un tipo de cáncer mutagénico.^{27.28}

Las sustancias que tienen la posibilidad de provocar genotoxicidad se llaman genotóxicas o xenobióticas, y tienen la posibilidad de dividirse en 3 categorías según sus fuentes: químicas, físicas y biológicas. El primer grupo está formada por compuestos, el segundo grupo incluye la radiación a lo largo del espectro y el último incluye ciertos parásitos, bacterias, hongos, plantas e inclusive virus (aunque dichos grupos no se piensan como organismos, por lo cual se ordenan como biológicos). Una categoría separada). El impacto o capacidad de inducir mal a dichos organismos heterólogos se ve perjudicado por la dosis recibida, la época o vía de exposición y la estructura genética de un sujeto que puede definirse a él mismo o una susceptibilidad particular²⁹.

Las pruebas de genotoxicidad tienen la posibilidad de definirse como pruebas in vitro diseñadas para identificar compuestos que inducen directa o de forma indirecta mal genético por medio de diferentes mecanismos. Solicitado previo a la exposición a humanos³⁰.

2.2.4.3. Mecanismo de genotoxicidad

Pueden unirse directamente al ADN o actuar indirectamente al destruir las enzimas involucradas en la replicación del ADN, dando lugar a mutaciones que pueden o no causar cáncer.²⁸

Los mutágenos y carcinógenos genotóxicos son compuestos electrofílicos altamente reactivos con alta afinidad por el ADN, como derivados orgánicos halogenados o que contienen nitrógeno, epóxidos, lactonas o compuestos inorgánicos como níquel, cromo y uranio, etc.

Gracias a cambios en determinados nucleótidos, los agentes genotóxicos tienen la posibilidad de provocar mutaciones debido a:³¹

- Sustitución de bases: otra purina por purina, otra pirimidina por pirimidina o pirimidina por purina, y al revés.²⁶

- Sustitución de bases con sustancias semejantes, lo cual da como consecuencia repeticiones de nucleótidos no válidas.
- Cambios químicos en bases por oxidación y desaminación.
- Alquilación de moléculas de ADN con equipos químicos por medio de enlaces covalentes para conformar los denominados aductos.^{25,26}
- Defaces causada por la adición o delección de bases cambiará el modo de lectura.
- Además, tienen la posibilidad de provocar aberraciones cromosómicas, como:
- Mal cromosómico provocado por mal, delección, trueque o recombinación y translocación de material cromosómico.
- Cambios en la proporción de cromosomas.^{26, 27}
- Luego de perjudicar el ADN, las células tienen la posibilidad de pasar por 3 procesos:
- Los trastornos de la replicación conducen a la apoptosis y el deceso de las células.
- Se replican los cambios de nucleótidos o los errores de replicación del ADN (es mencionar, mutaciones). Tales mutaciones tienen la posibilidad de suceder en células somáticas, como cáncer o malformaciones congénitas en recién nacidos. o generan patologías hereditarias en las células germinales o son más propensos a determinadas patologías en las personas.
- Arreglar el mal de las moléculas de ADN y evadir mutaciones.^{30,31}
- Referente a los carcinógenos genotóxicos, son los iniciadores del proceso carcinogénico. Esto empieza con una mutación en una sola célula, que puede estar al grado metabólico de un organismo heterólogo, lo cual provoca que los carcinógenos se conviertan en carcinógenos. En la compostura del ADN, obstaculizarlo o prevenirlo y / o excitar la proliferación celular. Este proceso se denomina iniciación.³¹
- Suelen ser productos químicos como compuestos alquilados (mostaza nitrogenada), especies reactivas de oxígeno, aflatoxinas, productos de combustión, nitrosaminas, etc.²⁷ Su mecanismo de acción se basa en un enlace covalente (aducto) con el nitrógeno siete de guanina. Resultando en mutaciones irreversibles. Varias de sus propiedades son:
- Es eficaz en cada una de las dosis y no hay una dosis umbral mínima para ser eficaz.

- Presentan relevancia y actividad estructural, que tienen la posibilidad de detectarse por medio de pruebas experimentales.^{31,29}
- la mayor parte permanecen clasificados como carcinógenos, o sea, necesitan biotransformación para reaccionar con el ADN, lo cual puede pasar en la primera y segunda fases del metabolismo. Aquí tenemos la posibilidad de descubrir hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas, micotoxinas, etc.³²

2.2.5. Electroforesis en gel

Es un método que separa moléculas en una mezcla mediante la aplicación de un campo eléctrico. La rapidez de desplazamiento o migración de la molécula disuelta en el campo eléctrico es dependiente de su relación carga / masa. Si 2 moléculas poseen la misma masa y forma, que tenga la carga neta más alta se moverá más veloz hacia el electrodo.²³

Después de apuntar a la molécula de ADN con una enzima de restricción adecuada, se cortará en fragmentos específicos. Además dichos fragmentos se pueden dividir según su tamaño mediante electroforesis en gel. Para hacer esto, coloque el ADN escindido en un gel de agarosa o poliacrilamida. Una vez que la corriente pasa a través del gel, cada fragmento se moverá hacia abajo a una velocidad proporcional al logaritmo de su peso molecular. El movimiento genera una serie de bandas. Cada banda corresponde a un fragmento de cierto tamaño, y cuanto más bajo es el fragmento en el gel, más pequeño. La longitud de cualquier fragmento particular se puede determinar calibrando el gel. Para hacer esto, ejecute el control paralelo en otro carril del mismo gel. El control es una mezcla de fragmentos estándar, cuyo tamaño se conoce, y se denomina marcador. La migración del marcador define la interacción entre la longitud del fragmento y la distancia recorrida por el gel.²⁴

Por lo tanto una manera adecuada de medir el ADN y examinar su estado físico paralelamente, logrando mirar si hay contaminantes en la muestra de ADN o si está degradada. Se fundamenta en la aplicación de la tecnología de división de cargas de área y tamaño molecular en un campo eléctrico y se define como un procedimiento de división de sustancias cargadas por medio de la aplicación de un campo eléctrico para que se porten de forma distinta en un campo eléctrico. Estas partículas cargadas de manera positiva (cationes) migrarán hacia el cátodo, en lo que las cargadas de manera negativa (aniones) migrarán hacia el ánodo.²⁵

En medio de las macromoléculas, las proteínas son las más usadas, seguidas de los ácidos nucleicos, ya que dichos 2 tipos poseen una enorme proporción de carga y los lípidos no poseen esta carga y mucho menos son insolubles. El método se basa en fijar la muestra de averiguación en un material parecido a un gel (gel). El gel se somete a corriente a lo largo de un lapso de tiempo específico. Cada muestra empezará a migrar por medio de los poros del gel a una rapidez distinto, dependiendo de la carga y la magnitud molecular. Una vez completada la división, se interrumpe la corriente y la muestra separada se tiñe para su visualización. La distancia entre cada muestra y los principios va a ser distinto según su origen.²⁵

Los ácidos nucleicos permanecen cargados y son solubles pues poseen conjuntos fosfato (los restos que imparten carga) y, constantemente, permanecen presentes en la composición, poseen la función de su migración en un campo eléctrico, pueden dividirse por electroforesis. El gel se sumerge en un electrolito tamponado con ácido tribórico (no glicina) para asegurar que el ácido nucleico tenga carga negativa; por esta razón, la técnica se llama electroforesis de inmersión. Las moléculas migrarán hacia el electrodo positivo y así pasarán a través del gel. en esa dirección y se separarán por tamaño (número de nucleótidos). Al cargar, algunos marcadores se colocan al frente (tinte de carga 6X). De esta forma, podemos detener la electroforesis una vez que encontremos la situación adecuada. Para visualizar las bandas, el gel debe teñirse o las moléculas deben marcarse radiactivamente. El método más utilizado en gel de agarosa es el bromuro de etidio, que actúa como intercalador, por lo que también puede minimizar la densidad de moléculas y tiene la función de emitir luz bajo excitación ultravioleta. Tenga cuidado con este compuesto porque es altamente cancerígeno.^{23,24}

La electroforesis en gel se usa extensamente para la detección de moléculas y fragmentos de ADN y ARN, además el control de pureza, caracterización, cuantificación (comparado con controles) y preparación y purificación (restando bandas del gel). Tiene dos mecanismos de división: electroforesis, que se divide por la interacción carga / tamaño; tamiz de gel, que se divide principalmente por tamaño. Los geles más comunes son agarosa y poliacrilamida.²⁵

2.2.6. Espectrofotometría

Según el ADN absorber luz de una longitud de onda específica (260 nm) que permite calcular la concentración de ácido nucleico de la muestra. Si la densidad

óptica (DO) es 1, equivale cerca de a 50 µg / mL de ADN de doble hebra, entonces podemos calcular la concentración de ADN en la muestra simplemente midiendo su absorbancia en lugar de hacer la curva estándar.⁴² El costo mayor de absorción de la proteína es de 280 (primordialmente desde residuos de triptófano), por lo cual las lecturas a esta longitud tienen la posibilidad de indicar la existencia de contaminantes proteicos. El cálculo de la relación en medio de las lecturas de 260 nm y 280 nm es un método común para estimar la pureza o evaluar la contaminación de productos de ADN con proteínas de ácido nucleico. El número de colaboraciones debería estar entre 1, 8 y 2.0. Si la muestra es pura, este es el primer paso usualmente usado en espectrofotometría.^{24, 25}

2.2.7. Ensayo de cometa (EC)

Este método se usa para medir y examinar las roturas del ADN. Puede identificar casi cada una de las diferencias y perjuicios intracelulares a lo largo de la compostura celular. La capacidad del ADN para migrar es dependiente del número de roturas elaboradas por los reactivos usados, por lo cual cada célula lesionada tiene el aspecto de un cometa, con la cabeza y la cola brillantes y fluorescentes; las células intactas poseen un núcleo completo y no poseen cola.³³

Hay muchas variantes y siempre utilizadas en diferentes laboratorios de todo el planeta. Ostling y Johanson describieron el procedimiento mundial y estándar en 1984, que después ha sido reformado por Singh et al. No obstante, en 1988, según los intereses de averiguación de ciertos conjuntos de indagación, ahora se conocen diferentes modificaciones a la tecnología.³⁴

2.2.7.1. Ventajas del ensayo cometa

La detección de cometas o electroforesis unicelular tiene ciertas ventajas sobre otros procedimientos de detección que evalúan el mal genotóxico por medio de la efectividad. En esta prueba, los datos se recopilan a grado de células personales, lo cual da datos sobre el reparto del mal y la compostura en medio de las células. Además, solo es necesario una pequeña proporción de cultivo celular, y en el proceso se puede utilizar casi cualquier población de células eucariotas. Por medio de esta prueba, se puede evaluar el mal de las células no proliferativas, lo que además aporta gigantes beneficios sobre otras tecnologías que realmente se requieren.^{33, 34}

En la electroforesis unicelular, la detección de males es más sensible que otras pruebas citogenéticas clásicas. Los estudios comparativos que evaluar los

efectos genotóxicos de la radiación de rayos X en los linfocitos humanos han demostrado que, así sea en la prueba del micronúcleo o en la prueba del cometa, el mal a medida que aumenta la dosis de radiación administrada a la muestra, empero la sensibilidad de la prueba cometa es menor. todavía más grande, alta pues tienen la posibilidad de identificar perjuicios inclusive a niveles de exposición bajos.^{33,34}

Otros estudios comparativos de fármacos además piensan la utilización del ensayo cometa alcalino para evaluar nuevos fármacos y hacer pruebas de error cromosómica, que poseen un elevado costo predictivo.^{33,34}

Generalmente, esta prueba de genotoxicidad es bastante flexible, puede identificar diferentes males que se le tienen la posibilidad de provocar al ADN, y su proceso de detección es sencillo y veloz, por lo cual es viable obtener los resultados son el mismo día. La muestra ha sido extraída e implementado el programa.³⁴

2.2.7.2. Desventajas del ensayo cometa

Aun cuando esta tecnología fue extensamente usada y aceptada internacionalmente, su proceso de evaluación todavía muestra varias deficiencias. El primero se relaciona con el desempeño y preparación estricta de los reactivos, y la proporción de cambiantes que tienen la posibilidad de influir el desarrollo óptimo, gracias a la concentración de agarosa, el estado de las distintas resoluciones de trabajo, cualquier cambio de pH, temperatura y tiempo gracias a la alta sensibilidad. de la tecnología, cada La época de operación de los pasos cambiará en gran medida los resultados a examinar. La segunda deficiencia más notoria es la carencia de estandarización de los datos logrados en la investigación y la averiguación de muestras, debido a que aun cuando varios estudiosos cubren este asunto, continúan ofreciendo novedosas maneras de evaluación sin conceptualizar una exclusiva forma de evaluación. Un proceso de estudio que posibilita hacer comparaciones entre laboratorios^{33, 34}

2.2.7.3. Aplicación del ensayo cometas

Es una de las técnicas más usadas en el campo de la toxicología y la genética. Gracias a su procedimiento económico, veloz y eficaz, se usa en la averiguación para monitorear la exposición ambiental y ocupacional poblacional. Ejemplificando, en las ciencias del medio ambiente, se han usado diversos tipos de peces como modelos biológicos para aprender los efectos de las toxinas genéticas en el medio acuático. Asimismo, en el campo clínico se realizaron

estudios de seguimiento farmacológico de diferentes fármacos sobre la toxicidad genética de productos químicos, incluyendo estudios sobre la utilización de determinados tipos de resinas⁴⁰ y mutágenos de línea germinal en la atención de la salud.^{33, 34}

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

Miranda⁷ ha desarrollado un método para decidir los efectos genotóxicos *in vitro* de plantas medicinales y / o terapéuticas vegetales sobre el ADN genómico. ¿Es fundamental saber qué órgano de la planta? Los tallos, flores, hojas, frutos y / o semillas se aplican para llevar a cabo remedios caseros y obtener sus extractos. El extracto podría ser a base de agua, hidroalcohólico o mezclado con otros solventes orgánicos; si deseas aprender látex, se ofrece comprarlo de manera directa⁷

Prepare resoluciones de extracto de diferente densidad:

1 miligramo / mL, 2.5 miligramo / mL, 5 miligramo / mL, 10 miligramo / mL, 25 miligramo / mL, 50 miligramo / mL y 100 miligramo / mL; si es látex, la concentración debería ser 1%, 2.5%, Diluyente al 5%, 10%, 25%, 50% y 100%. Sin embargo, por medio de sustracción orgánica o kits accesibles comercialmente, se recibe ADN genómico del organismo (humano, animal o microorganismo) en análisis para afirmar que el ADN se encuentre intacto y independiente de fragmentación; después elaborar 200 μ L a una concentración de 1500 ng / μ L.⁷

Al evaluar la genotoxicidad *in vitro* por medio de la fragmentación del ADN, etiquete 10 baterías de tubos de ensayo de 500 μ L. Deposite 14 μ L de ADN de la solución en los tubos de ensayo 1 a 7, y después añada 6 μ L de cada concentración de extracto o látex en los tubos de ensayo que corresponden 1 a 7. El tubo N ° 8 se usa como tubo "blanco" y puede depositar 14 μ L de extracto o látex al 100% a 14 ° L Añada 6 μ L de agua bidestilada al 100%, utilice el tubo 9 como "control", coloque 14 μ L de ADN y 6 μ L de agua bidestilada. Use un tubo de ensayo n. ° 10 como "desecho de nucleasa", añada 14 μ L de ADN más 6 μ L de extracto 100% o látex 100%, más 6 μ L de enzima proteinasa K e incube en baño María 37°C a lo largo de una hora, hasta 4 si se necesita hora. Dichos productos de prueba, excepto los marcadores de tamaño molecular (50 pb), se sometieron a electroforesis en gel de agarosa que tenía dentro bromuro de etidio al 1% a 40 voltios a lo largo de 3 horas, y después se visualizaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta. grabación. Estas fotografías registran las 7 concentraciones

de fragmentos de ADN analizados, revelando. Revisar que no haya ADN contaminado en el extracto o el látex; "Control" se utiliza para equiparar la proporción de ADN sin intentar con en relación a los 7 tubos que fueron procesados; y "Descartar nucleasa" para revisar el papel de los metabolitos secundarios, y No es actividad nucleasa, pues van a ser destruidas por la acción de la proteinasa K a lo largo del lapso de incubación.

Por lo tanto, el nivel de fragmentación es comparable en porcentaje y el costo ha cambiado de cero a cuatro. La conclusión es que el "método Tomasevich" es un método eficaz que puede utilizarse para determinar la genotoxicidad de plantas medicinales por medio de la decisión de fragmentos de ADN.⁷

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

La indagación se hizo entre septiembre de 2018 y mayo de 2019, y Blga hizo una identificación taxonómica de la especie en análisis. Blga. Laura Aucasime Medina (Anexo 1 y 2); obtener el extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *clinopodium brevicalix*. Epl. de "Urqu muña", prueba de sustracción de ADN genómico humano y genotoxicidad en el interior de Indagación en Doctorado en Biología Molecular y Bioinformática (CIBMB), Facultad de Ciencias Biológicas; Se realizaron pruebas fitoquímicas en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacología y Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH).

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Plantas de *Clinopodium brevicalix* Epl. "urqu muña", que se desarrolla en climas frígidos y templados, en forma silvestre sobre los 3472 msnm, ubicado en el distrito de Vinchos de la provincia de Huamanga, región Ayacucho.

3.2.2. Muestra

Dos Kg de hojas y dos Kg de tallos de *Clinopodium brevicalix* Epl. "urqu muña". Las muestras fueron recolectadas de los campos de cultivo del distrito de Vinchos a una altura de 3472 msnm de la región de Ayacucho, luego fueron transportadas al Laboratorio del Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática, para su proceso.

3.2.3. Muestreo

El muestreo se realiza por conveniencia (muestreo aleatorio simple).³⁵

3.3. Unidad experimental

ADN genómico humano a una concentración de 1500 ng/ μ L por ensayo.⁷

3.4. Metodología y recolección de datos

3.4.1. Recolección de la muestra

Por lo tanto el *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña”, y las muestras fueron recolectadas de los campos de cultivo del distrito de Vinchos, 3472 msnm, latitud sur 13° 13 min 35, longitud oeste 74° 21 min 12, provincia de Huamanga, región Ayacucho (Anexo N° 4), en varias horas al día por la mañana, y luego transportado inmediatamente al laboratorio del Centro de Biología Molecular y Bioinformática (CIBMB) de la Facultad de Ciencias Biológicas, y secado a temperatura ambiente con una tonalidad preajustada. El papel kraft se basa en la muestra volteada la cual se realiza en constante cambio. Seque uniformemente, evite el deterioro de la humedad y separe la humedad que ha cambiado de color o muestra signos de cambio.

3.4.2. Preparación del extracto hidroalcohólico de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña”

Primero se seca la muestra, se tritura con un mortero preesterilizado para reducirla a un polvo fino y después se elabora el extracto hidroalcohólico. Remojar 100 gramo de muestras de polvo seco de plantas medicinales a aprender en un tarro de vidrio ámbar a lo largo de 7 días, para eso usar 1 L de solución alcohólica: agua (3: 1) y etanol 96°. Las muestras tienen que estar separadas por lo menos 1 centímetros; a lo largo de este proceso, agite la botella 2 veces al día a lo largo de 15 min para facilitar el alcohol se distribuye uniformemente en la muestra. Para mantener las mismas maceradas en un espacio fresco. Posteriormente se filtró mediante un papel de filtro, y al final se mandó a un evaporador rotatorio Buchi-3000 para minimizar la presión, y se concentró su sequedad en un horno Memmert. Desde los cuales se hizo el tamizaje fitoquímico^{36,37}

3.4.3. Cribado fitoquímico de extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos de *Platycladus orientalis*. "Urqumuña"

El tamizaje fitoquímico cualitativo del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña”, está en Farmacia y bioquímica, diseñada para identificar diferentes metabolitos secundarios, como por ejemplo: alcaloides, lactonas, cumarinas, flavonoides, quinonas, catequinas, saponinas, azúcares reductores, taninos, fenoles, aminos, enolatos y resinas se tienen que a la existencia de metabolitos, como por ejemplo la aparición o desaparición del color, la formación o dilución de precipitados o el huya de gas. La actitud de

identificación se llevó a cabo conforme el procedimiento postulado por Lock³⁶ y Miranda.³⁷ (Anexo 5).

La actitud de identificación se realiza conforme el procedimiento postulado por Lock³⁶

Tabla 1. Propiedades elaboradas en la prueba para detectar metabolitos secundarios de plantas.

Metabolitos secundarios	Ensayos con reactivos	Observación
Alcaloides	Dragendorff Mayer Hager Wagner	Hay formación de precipitado en todas las reacciones.
Lactonas y cumarinas	Baljet	Formación de precipitado de coloración naranja a roja.
Flavonoides	Shinoda	Hay coloración amarilla, naranja, carmelita o rojo en la fase amilica.
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	Si es positivo hay formación de precipitado rojo ladrillo.
Taninos y fenoles	Cloruro férrico	Formación de una coloración verde intenso, azul o negruzca.
Aminas (aminoácidos)	Ninhidrina	Se da coloración violeta.
Cardenólidos	Kedde	Coloración violácea.

3.4.4. Extracción de ADN genómico a partir de sangre humana

Se implementó en el Centro de Indagación de Biología Molecular y Bioinformática, contando con dos donantes voluntarios que previamente fueron sensibilizados y firmaron su consentimiento informado (Anexo N° 3), se obtuvo dos muestras de sangre de cinco mL cada uno, en tubo con anticoagulante EDTA; la obtención del ADN se ejecutó siguiendo los procedimientos descritos por Lodish.²⁵

Procedimiento

1. Transfiera 1 mL de sangre a un tubo de centrifuga con tapa y añada 9 mL de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,7) precalentado a 37 ° C.
2. Homogeneizar e incubar a 37°C a lo largo de 30 min, centrifugar a 2500 rpm a lo largo de 10 min para sedimentar los linfocitos.

3. Usar una pipeta Pasteur para aspirar el sobrenadante y dejar una centrifuga de 1 mL en la parte inferior del tubo.
4. Repita el paso 3 (esta vez utilice 5 mL de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.7), repita los pasos 4 y 5 hasta obtener una formulación transparente.
5. Añada 1 ml de centrifuga, homogeneice 9 ml de solución salina (NaCl al 0,85%) y centrifugue a 2500 rpm / 10 min.
6. Aspirar y desechar el sobrenadante dejando solo el sedimento y resuspender el precipitado en 0.5 mL de solución HIGH TE (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 100 mM). El sedimento se resuspendió y se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 2 ml.
7. Adicionar 0,5 ml de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 40 mM; SDS al 1%; NaCl 10 mM). Precalentar a 50°C.
8. Añadir 10 µL de solución de proteinasa K (20 miligramo / mL) e incubar a lo largo de la noche a 53°C.
9. Añada 1 mL de una solución de fenol (25: 24: 1) saturada con Tris: cloroformo: alcohol isoamílico e inviértala delicadamente a lo largo de 10 min.
10. Centrifugar a 12000 rpm a lo largo de 10 min para dividir las etapas, después aspirar la etapa acuosa preeminente que tiene ADN y transferirla a un nuevo tubo de microcentrifuga de 2 ml.
11. Aumentar 1 mL de solución de cloroformo y alcohol isoamílico (24: 1) a la etapa acuosa y homogeneizar invirtiendo a lo largo de 5 min. Centrifugar a 12000 rpm a lo largo de 10 min. aspire la etapa acuosa que tiene el ADN y transfírela a un nuevo tubo de microcentrifuga de 2 ml.
12. Repita los pasos anteriores hasta obtener una etapa de agua enteramente clara.
13. Añada una determinada proporción de isopropanol helado y déjelo reposar en hielo a lo largo de 1 hora. Después centrifugue a 12000 rpm a lo largo de 15 min.
14. Retire con cuidado el sobrenadante y enjuague el sedimento con 1 ml de etanol al 70%.
15. Centrifugar a 12000 rpm a lo largo de 10 min para borrar el alcohol y secar el sedimento en el medio ambiente.
16. Resuspenda el sedimento en 300 µL de solución Low TE (Tris HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 1 Mm) y guárdelo en el refrigerador.

3.4.5. Cuantificación y calidad de ADN genómico humano

3.4.5.1. Por espectrofotometría³⁸

Procedimiento

1. Según la muestra de ADN y vuelva a colocarla en el mismo tubo Eppendorf con una micropipeta de 100 μL para que la muestra se homogeneice poco a poco, repita este proceso 10 veces.
2. Espectrofotómetro UV de marca Eppendorf BioPhotometer Plus preparado, puede escoger cuantificar el ADN.
3. Para limpiar el área del adaptador del espectrofotómetro se depositan 2 μL de agua bidestilada estéril y el agua es absorbida por un pañuelo de papel, para obtener un mejor impacto de aseo repetir 2 veces.
4. Vuelva a situar 2 μL de agua bidestilada estéril sobre el área del adaptador, cierre la tapa con un coeficiente de 50-Lp 0.2 mm, y presione la elección en BLANK para calibrar y obtener "absorbancia cero" (0.000 A °).
5. Use papel de seda para absorber agua, después deposite 2 μL de muestra de ADN, cierre la tapa y después presione la alternativa MUESTRA para ver los resultados de la cuantificación y la pureza del ADN en la pantalla del dispositivo. Asimismo, la muestra es absorbida por el papel tisú.
6. Repita los pasos 4 y 5 para cuantificar cada muestra de ADN.
7. Luego de la cuantificación del ADN, coloque 2 μL de agua bidestilada estéril en el adaptador, séquelo con un pañuelo de papel y después apague el dispositivo.

3.4.5.2. Por electroforesis

Se puede mirar el ADN obtenido por electroforesis y hacer los próximos pasos:

1. Según la siguiente tabla, prepare el volumen de carga de la electroforesis en gel de agarosa al 1% desde la muestra de ADN:

Tabla 2. Preparaciones para cargar el ADN para visualización de bandas en electroforesis.²⁵

Nº de carril en gel de agarosa	ADN stock (μL)	Buffer Loading 6X (μL)	Volumen de agua ultrapura (μL)	Volumen final de carga (μL)
1	7	1	2	10

2. Cargue todo el contenido de la mezcla en cada pocillo del gel de agarosa al 1% en los carriles respectivos.
3. Después, conecte la cámara de electroforesis a una fuente de energía y déjela funcionar a 30 voltios a lo largo de una hora.

4. El gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio al 1% a lo largo de 15 min, se enjuagó delicadamente 2 veces con agua corriente y después se visualizó por medio de radiación UV en el sistema de registro de imágenes de la marca Biometra UV only TS. Además, se usó una cámara digital Canon 20x full HD de 12.1 megapíxeles para tomar fotos en un transiluminador ultravioleta de la marca Ultra Lum; en los dos casos tienen la posibilidad de mirar diferentes concentraciones de bandas de ADN.^{24, 25}

3.4.6. Ensayos de la genotoxicidad *in vitro*

Se ejecutó a partir del "método Tomasevich" propuesto por Miranda⁷ y se divide en las siguientes etapas:

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

Según el ADN genómico humano obtenido se cuantificó con un espectrofotómetro Eppendorf Bio Photometer más UV. Luego prepare una solución con una concentración de 1500 ng / μ L para cada determinación en este estudio, con un volumen final de 200 μ L.^{39, 40}

3.4.6.2. Fase de ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos, respectivamente, de *Clinopodium brevicalex* Epl. "urqu muña", sobre el ADN genómico humano

Extraído de los extractos hidroalcohólicos de las hojas y tallos (por separado) de *Clinopodium brevicalex* Epl. "urqu muña", las soluciones se prepararon en concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg / mL; luego se utilizó agua estéril bidestilada como solvente para el tratamiento en concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg. / mL, respectivamente.

Se acondiciono la mezcla utilizada para las pruebas de *genotoxicidad del* ADN genómico *in vitro* de acuerdo con los siguientes detalles:

Tabla 3. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad *in vitro* de extracto hidroalcohólico de *Clinopodium brevicalex* Epl. "urqu muña" a concentraciones de 5, 10,

Condiciones	Mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>							
Tubo (N°)	1	2	3	4	5	6	7	8
Stock de ADN (1 500 ng/ μ L)						Blanco	Control	PK
Volumen en μ L	14	14	14	14	14	-	14	14
Extracto hidroalcohólico de "urqu muña" (mg/mL)	5	10	25	50	100	100	-	100
(μ L)	6	6	6	6	6	20	-	3
Proteinasa K	-	-	-	-	-	-	-	3
Agua bidestilada estéril	-	-	-	-	-	-	6	3
Volumen total (μ L)	20	20	20	20	20	20	20	23
Incubación en baño María a 37°C	1 hora							

25, 50 y 100 mg/mL, frente al ADN genómico humano.^{39, 40}

Tabla 4. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad *in vitro* de extracto hidroalcohólico de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña” a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente al ADN genómico humano.^{39, 40}

Condiciones		Mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>							
Tubo (N°)		1	2	3	4	5	6 Blanco	7 Control	8 PK
Stock de ADN (1 500 ng/μL)		14	14	14	14	14	-	14	14
Volumen en μL									
Extracto	(mg/mL)	100	200	300	400	500	500	-	500
hidroalcohólico de “urqu muña”	(μL)	6	6	6	6	6	20	-	3
Proteinasa K		-	-	-	-	-	-	-	3
Agua bidestilada estéril		-	-	-	-	-	-	6	3
Volumen total (μL)		20	20	20	20	20	20	20	23
Incubación en baño María a 37°C		1 hora							

3.4.6.3. Fase de electroforesis

Procedimiento

- Se realizó un gel de agarosa al 1% y se colocó en la cámara de electroforesis Biometra.
- La cantidad de muestra cargada en los pocillos de gel de agarosa, se utilizó la cantidad descrita en la siguiente tabla:

Tabla 5. Preparación de las mezclas para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN genómico humano en el ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, frente al ADN genómico humano.^{39, 40}

Condiciones		Volúmenes de carga en el ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>								
Nº de carril del gel		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Solución de digestión con extractos	(mg/mL) (μL)	Marcador de tamaño molecular	5	10	25	50	100	Blanco	Control	PK
H ₂ O _d (μL)		4	7	7	7	7	7	7	7	7
Loading(μL)		2	2	2	2	2	2	2	2	2
Volumen total (μL)		1	1	1	1	1	1	1	1	1
		7	10	10	10	10	10	10	10	10

Tabla 6. Preparación de las mezclas para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN genómico humano en el ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Clinopodium brevicallix* Epl. “urqu muña” a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente al ADN genómico humano.^{39, 40}

Condiciones		Volúmenes de carga para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>								
Nº de carril del gel		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Solución de digestión con extractos	(mg/mL)	Marcador de tamaño molecular								
	(µL)	4	7	7	7	7	7	7	7	7
H ₂ O _d (µL)		2	2	2	2	2	2	2	2	2
Loading (µL)		1	1	1	1	1	1	1	1	1
Volumen total (µL)		7	10	10	10	10	10	10	10	10

- Luego instalo la cámara de electroforesis en la fuente de energía y se prográmo a 30 voltios (V). por tres horas seguidas.

3.4.6.4. Fase de lectura por radiación UV

Una vez finalizada la electroforesis, sumerja el gel de agarosa en una solución de bromuro de etidio al 1% durante unos 10 minutos y enjuague dos veces con una gran cantidad de agua corriente para observar las bandas genotóxicas y / o los productos de fragmentos de ADN. Ponga el gel de agarosa en ultravioleta radiación, solo dentro del sistema de grabación de imágenes Biometra UV TS.^{40,}

⁴¹

- Además, se utilizó una cámara digital Canon 20x full HD de 12,1 megapíxeles para tomar fotos en un transiluminador ultravioleta de la marca Ultra Lum; en ambos casos se pueden observar bandas de ADN de diferentes concentraciones.

3.4.6.5. Fase de interpretación y clasificación del registro visual de genotoxicidad

El rango numérico correspondiente al nivel de fragmentación del ADN (como producto genotóxico) visualizado en el registro fotográfico se basa en la clasificación de la “prueba cometa” propuesta por Speit (1995) y Collins (2004). En el trabajo, de Mónica Marisol Larrea Poma.⁴²

Tabla 7. Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.

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, 2007⁴²

3.5. Tipo de investigación

Ya que el análisis cumple ambos requisitos para poder hacer el control y la efectividad interna: a) conjunto de comparación (manipulación de cambiantes independientes), y b) equivalencia de conjunto.³⁵

3.6. Diseño de investigación

El análisis que realizamos ha sido un diseño siguiente a la prueba con solo un conjunto de control, que integró 2 conjuntos: un conjunto recibió procedimiento empírico y el otro conjunto no (grupo de control). O sea, el desempeño de cambiantes independientes solo alcanza 2 niveles: vida e inexistencia. Una vez finalizada la operación se miden las cambiantes dependientes del análisis para los dos grupos³⁵.

Tabla 8. Diseño de investigación con pos-prueba únicamente y grupo de control.

Grupos	Tratamiento	Observación
G ₁	X	O ₁
G ₂	-	O ₂

Se realizaron cuatro repeticiones de cada ensayo.

3.7. Análisis de datos estadístico

Los datos conseguidos se agrupan y muestran a modo de tabla, registrados con fotografías y números, que tienen la posibilidad de describir mejor los hallazgos. Se usó la prueba de Kruskal-Wallis de muestras no estándar y el paquete de programa estadístico SPSS 23 para evaluar el costo de expresión de mal genotóxico.

Un valor de $p < 0,05$ será considerado como el nivel estadísticamente significativo.³⁵

Para lo cual se plantea la siguiente hipótesis:

H^0 = No presenta efecto genotóxico.

H^i = Presenta efecto genotóxico.

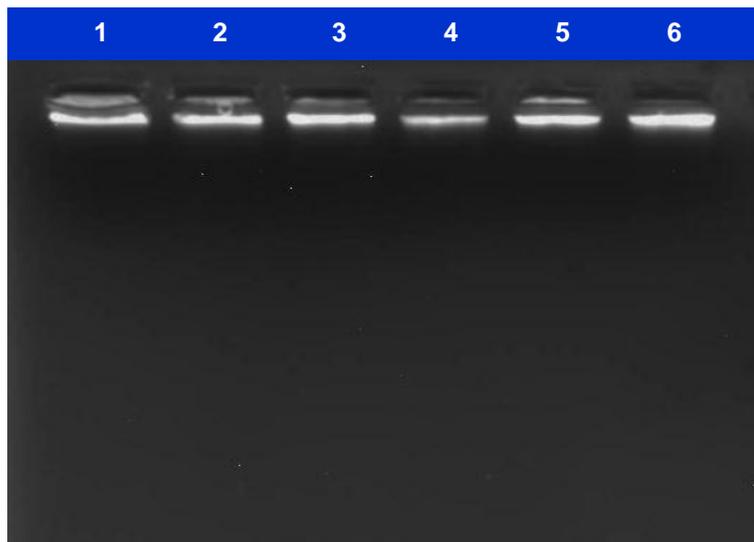
IV. RESULTADOS

Tabla 9. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicallix* Epl. “urqu muña”. Ayacucho, 2019.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados		Observaciones
		Extracto hidroalcohólico de hojas	Extracto hidroalcohólico de tallos	
Alcaloides	Dragendorff	+	+	Hay formación de precipitado en todas las reacciones.
	Mayer	+	+	
	Wagner	+	+	
Taninos y Fenoles	Cloruro Férrico	++++	++++	Formación de una coloración negruzca.
	Shinoda	+++	+	Hay una coloración amarilla, naranja, carmelita o rojo en la fase amilica.
Cardenolidos	Kedde	+	Negativo	No hay coloración violácea.
Catequinas	Catequinas	+++	++	Coloración verde carmelita a luz UV indica un ensayo positivo.
Saponinas	Espuma	+++	Negativo	Formación de espuma al superficie.
Azúcares reductoras	Benedict	Negativo	Negativo	Formación de precipitado rojo ladrillo.
Resinas		Negativo	Negativo	
Muscílagos		Negativo	Negativo	

Tabla 10. Cuantificación por espectrofotometría ultra violeta marca Eppendorf Bio Photometer plus de ADN genómico humano obtenido mediante extracción orgánica. Ayacucho, 2018.

Muestra	Concentración ADN (μg /ml)	ADN	Proteínas	Pureza de ADN
		A 260	A 280	A260/A280
1	1254,6	0,502	0,253	1,98
2	2083,5	0,833	0,452	1,85
3	2439,9	0,976	0,489	1,99
4	1122,8	0,449	0,242	1,85
5	3520,8	1,408	0,693	2,00
6	3857,8	1,543	0,878	1,76



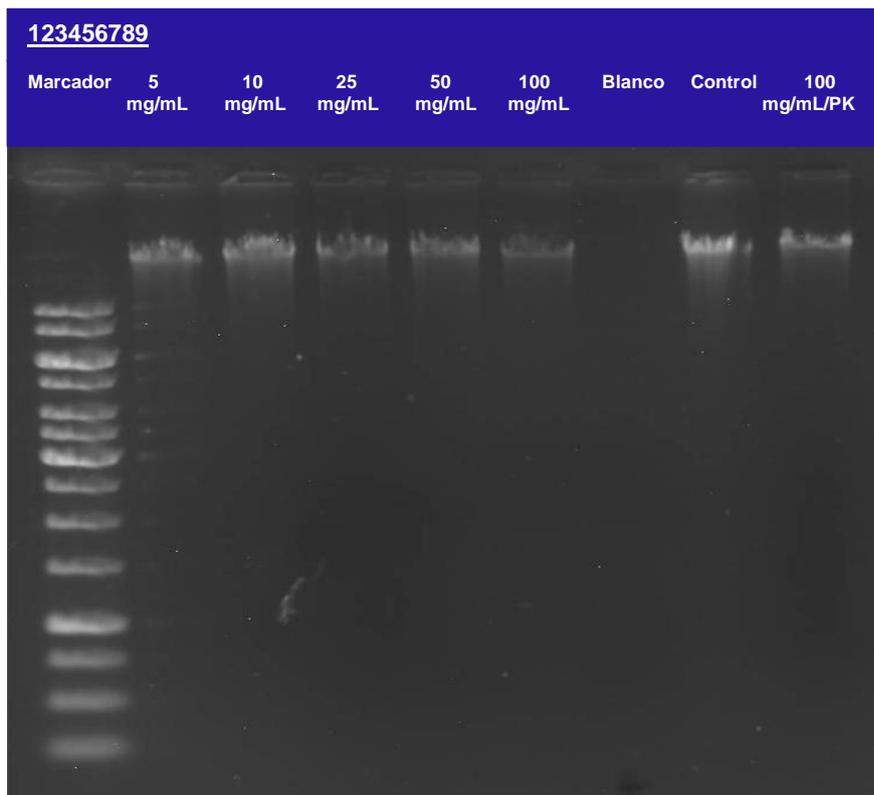
Leyenda:

Volumen de carga: Muestra 7 μ L + loading 6X 1 μ L + 2 μ L agua ultrapura.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante una hora.

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

Figura 3. Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1 % del ADN genómico humano, obtenido de seis muestras y coloreado con bromuro de etidio. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2018.



Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de tamaño molecular 1 kb.

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 de extracto hidroalcohólico (blanco).

Carril Nº 8: Con ADN puro (control).

Carril Nº 9: Con 100 mg/mL de extracto hidroalcohólico + proteinasa K.

Volumen de carga: Muestra (7 μ L) + loading (2 μ L) + agua ultrapura (1 μ L) = 10 μ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante 3 horas.

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

Figura 4. Ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Clinopodium brevicallix* Epl. "urqu muña" 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 2018.



Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de peso molecular 1 kb.

Carril Nº 2: Con 100 mg/mL.

Carril Nº 3: Con 200 mg/mL.

Carril Nº 4: Con 300 mg/mL.

Carril Nº 5: Con 400 mg/mL.

Carril Nº 6: Con 500 mg/mL.

Carril Nº 7: Con 500 mg/mL de extracto hidroalcohólico (blanco).

Carril Nº 8: Con ADN puro (control).

Carril Nº 9: Con 500 mg/mL extracto etanólico + proteinasa K.

Volumen de carga: Muestra (7 μ L) + loading (2 μ L) + agua ultrapura (1 μ L) = 10 μ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante 3 horas.

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

Figura 5. Ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña” a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente a ADN genómico humano incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2018.

Tabla 11. Valores numéricos del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de **hojas** de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente, frente al ADN genómico humano incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.

Condiciones de la incubación		<i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña”								
Temperatura °C	Tiempo Hora	Extracto hidroalcohólico de hojas								
		Concentración en mg/mL.								
		5	10	25	50	100	200	300	400	500
37	1	0	0	2	2	3	3	4	4	4
		0	0	2	2	3	3	4	4	4
		0	0	2	2	3	3	4	4	4
		0	0	2	2	3	3	4	4	4

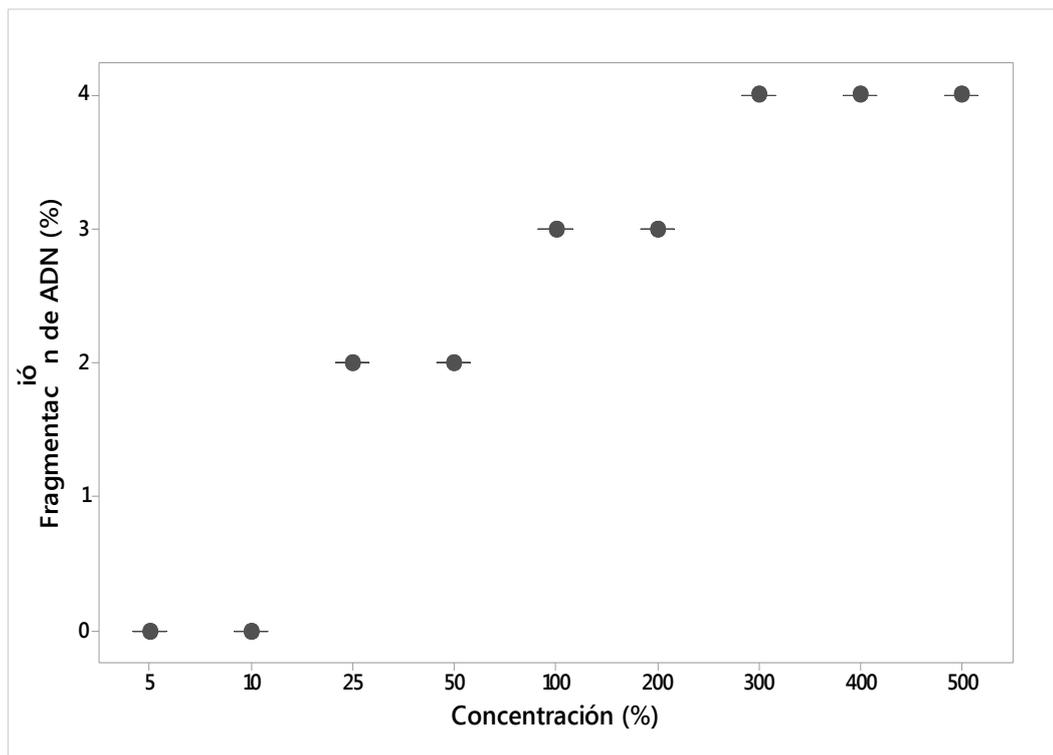
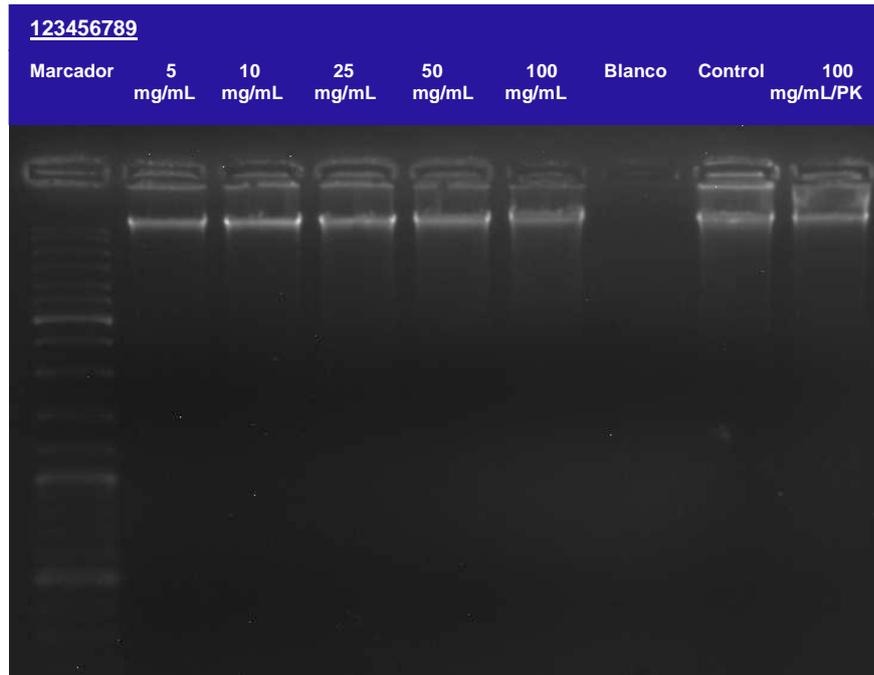


Figura 6. Prueba de Kruskal-Wallis ($H=35,00$, $GL=8$, $P=0.000$): para determinar el grado de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de **hojas** de *Clinopodium brevicallix* Epl. “urqu muña” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente, frente al ADN genómico humano, incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.



Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de peso molecular 1 kb.

Carril Nº 2: Con 5 mg/mL.

Carril Nº 3: Con 10 mg/mL.

Carril Nº 3: Con 25 mg/mL.

Carril Nº 4: Con 50 mg/mL.

Carril Nº 5: Con 100 mg/mL.

Carril Nº 6: Con 100 mg/mL de extracto hidroalcohólico (blanco).

Carril Nº 7: Con ADN puro (control).

Carril Nº 8: Con 100 mg/mL de extracto hidroalcohólico + proteinasa K.

Volumen de carga: Muestra (7 µL) + loading (2µL) + agua ultrapura (1 µL) = 10 µL.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante 3 horas.

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

Figura 7. Ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de tallos de *Clinopodium brevicelix* Epl. “urqu muña” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, frente al ADN genómico humano incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2018.



Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de peso molecular 1 kb.

Carril Nº 2: Con 100 mg/mL.

Carril Nº 3: Con 200 mg/mL.

Carril Nº 4: Con 300 mg/mL.

Carril Nº 5: Con 400 mg/mL.

Carril Nº 6: Con 500 mg/mL.

Carril Nº 7: Con 500 mg/mL de extracto etanólico (blanco).

Carril Nº 8: Con ADN puro (control).

Carril Nº 9: Con 500 mg/mL extracto etanólico + proteinasa K.

Volumen de carga: Muestra (7 µL) + loading (2µL) + agua ultrapura (1 µL) = 10 µL.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante 3 horas.

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

Figura 8. Ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de **tallos** de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña” a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente al ADN genómico humano incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2018.

Tabla 12. Valores numéricos del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de tallos de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente, frente al ADN genómico humano incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.

Condiciones de la incubación		<i>Clinopodium brevicalex</i> Epl. “urqu muña”								
Temperatura °C	Tiempo Hora	Extracto hidroalcohólico de tallos								
		Concentración en mg/mL.								
		5	10	25	50	100	200	300	400	500
37	1	0	0	0	0	0	1	1	1	2
		0	0	0	0	0	1	1	1	2
		0	0	0	0	0	1	1	1	2
		0	0	0	0	0	1	1	1	2

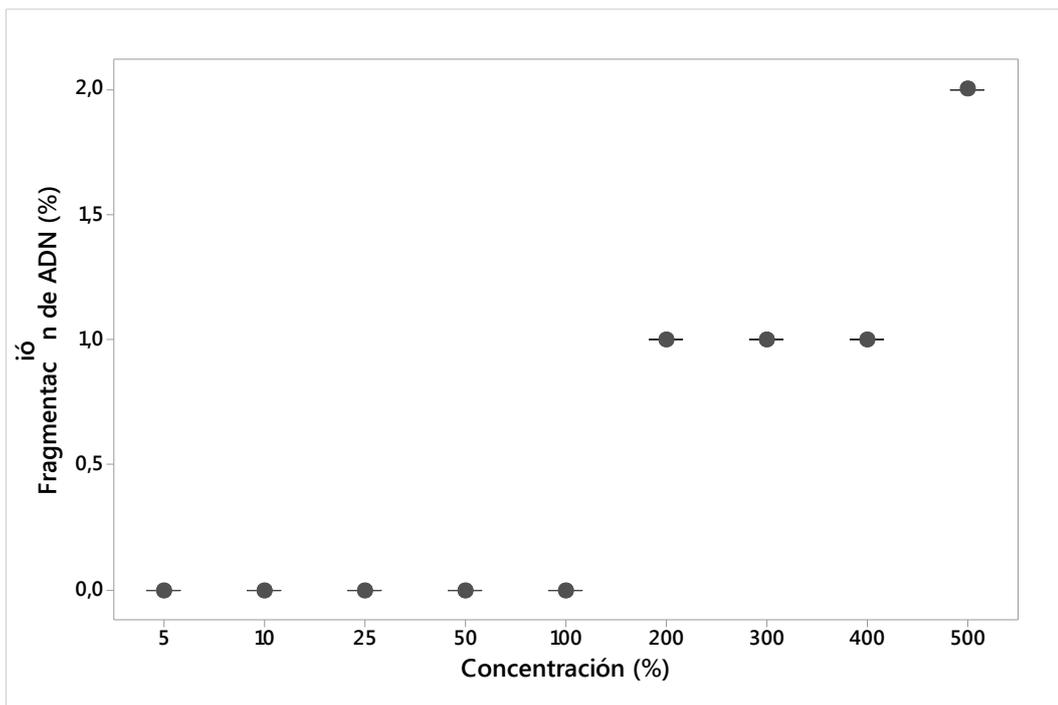


Figura 9. Prueba de Kruskal-Wallis ($H=35,00$, $GL=8$, $P=0.000$): para determinar el grado de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de tallos de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente, frente al ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.

V. DISCUSIÓN

La investigación realizada conduce a interpretar los resultados de los diferentes ensayos, con el designio de determinar el efecto genotóxico “*in vitro*” del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de la planta en estudio.

El tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de la planta *Clinopodium brevicalex* reportado en la tabla 8, detalla la presencia de taninos y/o fenoles, en concentración abundante en hojas y tallos; flavonoides en concentración abundante en hojas y regular en tallos; catequinas en regular concentración en hojas y poca concentración en tallos; saponinas en regular concentración en hojas y ausente en tallos; alcaloides en poca concentración en hojas y trazas en tallos; cardenólidos trazas en hojas y ausente en tallos; mientras que, no se detectaron la presencia de azúcares reductores, resinas ni mucílago.

Los taninos y/o fenoles se detectan por el fuerte verde, azul o negro que se produce al agregar 1% de cloruro férrico. Los flavonoides tienen reacción de Shinoda, mostrando un cambio de color de amarillo a rojo. Es de color marrón verdoso bajo luz ultravioleta, lo que indica positivo para las catequinas. Las saponinas presentes en la espuma; el propranolol se torna violeta con el reactivo de Kedde; en la identificación de alcaloides, se precipita con reactivos de Dragendorf, Meyer y Wagner.^{23,24}

Esta evaluación fue realizada por otros autores que han confirmado la existencia de estos metabolitos secundarios en las plantas medicinales, así tenemos:

Alarcón⁴³ realizó un estudio para establecer los efectos genotóxicos *in vitro* de la planta medicinal antiinflamatoria *Oenothera rosea* Ait “yawar suqu”, *Piper elongatum* Vahl “matico” y *Xanthium catharticum* HBK “amor seco

Además los metabolitos secundarios identificados en los extractos hidroalcohólicos de "yawar suqu" y "matico" son alcaloides, lactonas y/o cumarinas, fenoles y / o taninos, flavonoides, quinonas y glucósidos cardíacos.

En los extractos hidroalcohólicos de alcaloides de "amor seco", fenoles y / o taninos, flavonoides y quinonas, estas tres plantas tienen las mismas propiedades sensoriales y de solubilidad.⁴

Quiros⁴⁴ evaluó la actividad cicatrizante de un gel realizado con extractos de "nuez" (nuez), "ortiga" (*Urtica dioica* L) y "aloe vera" y causó una herida (pequeña) en el lomo de ratones. ratón).

Los resultados mostraron que gracias a la existencia de taninos de nogal, flavonoides de ortiga y mucilagos de aloe, el gel tiene actividad cicatrizante en las heridas de la dermis, y una vez que ambos se utilizan unidos, van a tener un impacto sinérgico.

De igual manera, Hurtado.⁴⁵ mostró que el extracto es efectivo como mánager gastroprotector en un modelo de úlcera gástrica inducida por etanol de 96 °. Además, sus hojas además tienen dentro sacarosa de madera de nogal, que tiene carbohidratos, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, antraquinonas, triterpenos, esteroides, saponinas y alcaloides.

Los resultados de la investigación, son similares a los reportados en estos tres trabajos citados, en el sentido de haber identificado taninos y fenoles en cantidad muy abundante, flavonoides en regular cantidad y alcaloides en cantidad escasa, siendo estos metabolitos secundarios, los probables responsables del efecto genotóxico sobre el ADN genómico humano ensayado.

La tabla 10, es referente a la cuantificación por espectrofotometría UV del ADN genómico humano, se procesaron seis tubos a partir de las dos muestras de sangre; para cuantificar DNA con A 260 y con A 280 proteínas, las concentraciones de ADN obtenidas va desde 1122,8 µg/mL hasta 3857,8 µg/mL. El grado de pureza debería estar entre 1.8 y 2.00, y se observa que 5 de ellos caen en este rango (excepto la muestra 6).³⁸

La Figura 3 por medio de un registro fotográfico que señalan los niveles de concentración de ADN conseguidos de 6 muestras de sangre humana usadas para el análisis. Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La concentración de los carriles 1, 2, 3, 5 y 6 ha sido bastante alta De igual manera, una vez que la concentración es baja en el carril 4, las propiedades de estas bandas son de forma directa consistentes con la concentración definida por espectrofotometría ultravioleta.

La figura 4, muestra el registro fotográfico que revela el resultado de genotoxicidad *in vitro* la preparación del extracto hidroalcohólico de las hojas del

árbol del té *Clinopodium brevicalex* Epl. "urqu muña" con concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 miligramo / mL en un baño de agua a 37°C a lo largo de 1 hora. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular de 1 kb; los carriles 2 a 6 son carriles para procesar el ADN genómico humano, con las concentraciones que corresponden de extractos hidroalcohólicos. Se puede ver que en los carriles 2 y 3, gracias a los extractos hidroalcohólicos, cada banda de ADN no padece de roturas obvias. Visto a las concentraciones de 5 y 10 miligramo / mL, respectivamente, era lo mismo que la banda de "control" de ADN genómico humano en el carril 8 sin procedimiento de extracto; el carril 5 muestra que la concentración de la banda de ADN es sutilmente menor que la del "control", lo cual se debería a la fragmentación provocada por los extractos de 25 y 50 miligramo / mL, respectivamente; mientras que, en el carril 6 la fragmentación del ADN es notoria, la banda es menor comparada con la del carril 8 (control), porque fue tratada con extracto a 100 mg/mL; el carril 7 corresponde a la corrida "blanca", o sea, el extracto hidroalcohólico de la hoja de *Spodoptera litura* Epl. 100 miligramo / mL de "Urqumuña", en el cual no se vio ADN de hojas de "urqumuña". La banda vista en el carril 8 es ADN genómico humano sin ningún procedimiento, que sirve como "control" para la comparación con diferentes concentraciones de extractos hidroalcohólicos con cada ADN de procedimiento. El carril 9 corresponde al proceso de electroforesis de procesamiento de ADN genómico humano a 1500 ng / μ L, que tiene 100 miligramo / mL de extracto hidroalcohólico de hoja de "urqumuña", más proteinasa K, lo cual sugiere que la magnitud del color de la banda es la misma que el del carril 6. Comparativamente, la proporción de ADN se disminuye. Se reitera que la fragmentación del ADN se debería a los efectos de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico, más que a las nucleasas que tienen la posibilidad de provenir de las hojas de la "urqumuña", debido a que estas enzimas son degradadas por la acción de la proteinasa K, en 37 Incubar a lo largo de una hora a °C.

La Figura 5 muestra los resultados de genotoxicidad in vitro de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Spodoptera litura* Epl. Comparado con el ADN genómico humano a una concentración de 1500 ng / μ L, "Urqumuña" a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 miligramo / mL se incubó en un baño de agua a 37°C a lo largo de una hora. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular de 1 kb; los carriles 2 a 6 son carriles para procesar el ADN genómico humano, con las concentraciones que corresponden de extractos

hidroalcohólicos. Se considera que debido al impacto de los extractos hidroalcohólicos en los carriles 2 y 3, cada ADN la banda tiene roturas obvias. Las concentraciones son 100 y 200 miligramo / mL, al comparar constantemente con la banda de "control" de ADN genómico humano en el carril 8 que no fue tratado con el extracto; los carriles 4, 5 y 6 por el momento no presentan bandas de ADN enteras, esto se debería a que los extractos permanecen en 300, 400 y 500, miligramo / mL ha sido provocado por fractura; el carril 7 corresponde al corrido "blanco", o sea, la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de la "urqu muña" ha sido de 500 miligramo / mL, y sin trazas de la "urqu muña" se observaron hojas ADN. La banda vista en el carril 8 es ADN genómico humano sin ningún tratamiento, que sirve como "control" para la comparación con diferentes concentraciones de extractos hidroalcohólicos con cada ADN de procedimiento.

Además el carril 9 corresponde al proceso de electroforesis de procesamiento de ADN genómico humano a 1500 ng/ μ L, que contiene 100 mg / mL de extracto hidroalcohólico de hoja de "urqu muña", más proteinasa K, lo que indica que la intensidad del color de la banda es la misma que el del carril 6. En comparación, la cantidad de ADN se reduce. Se reitera que la fragmentación del ADN se debe a los efectos de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico, más que a las nucleasas que pueden provenir de las hojas de la "urqu muña", ya que estas enzimas son degradadas por la acción de la proteinasa K, en 37°C incubar durante una hora.

Según con los resultados de la prueba de genotoxicidad del procedimiento in vitro, los resultados que se presentan en la Figura 4 y la Figura 5 se usan como escala de la Tabla 7 Metodológica como alusión, y el costo destinado como el nivel de fragmentación del ADN genómico humano se usa como Costo a la hoja *Clinopodium brevicalex* Epl. "urqu muña lo mismo que se reporta en la Tabla 11; especificar que los fragmentos son menos del 5% de ADN (valor = 0) a 5 y 10 miligramo / mL respectivamente; entre 25 y 50 miligramo / mL, entre 20 y Entre 40 % (valor = 2); las concentraciones son 100 y 200 miligramo / mL, entre 40% a 95% (valor = 3), y entre 300, 400 y 500 miligramo / mL, los fragmentos son más grandes al 95% de procesado humano ADN genómico (valor = 4).

Tomando estos datos, los valores numéricos consignados en la tabla 11, se realizaron los análisis estadísticos se usó la prueba de Kruskal-Wallis para confrontar el nivel de fragmentación del ADN genómico humano, expresado

como porcentaje (%) relativo a la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Spodoptera litura* Epl. "Urqu muña" se expresa en mg por mililitro (mg / mL). Como se muestra en la Figura 6, el porcentaje de fragmentación del ADN genómico humano expone el nivel de genotoxicidad. Expresado por la conjetura nula, cada una de las medianas son equivalentes y equivalentes a otra Esta conjetura (H1), por lo menos una mediana es distinto. Los resultados reportan que para $GL= 8$ y $H= 35,00$ el valor de $P= 0,000$; por tanto, se rechaza la H_0 y se acepta la H_1 , porque P resultó menor que $0,05$. En consecuencia, el nivel de fragmentación del ADN genómico humano procesado es dependiente de la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Clinopodium brevicalex* Epl. "urqu muña".

Estos resultados, no pueden ser contrastados con estudios similares de genotoxicidad de "urqu muña", porque no se ha encontrado reportes; sin embargo, podemos corroborar al estudio de actividad antimicrobiana de "urqu muña", cuya acción letal sobre las células microbianas se deba al efecto genotóxico, entre ellos podemos mencionar:

Carhuapoma⁵ ha definido que el aceite importante de *Satureja brevicalyx* (ahora *Clinopodium brevicalex* Epl. "Urqu muña") tiene impacto anti-*Helicobacter pylori*, con una concentración inhibitoria mínima de 1.00 ug / mL y una concentración bactericida mínima de 2.00 ug / mL . La citotoxicidad de los aceites fundamentales confirmó su alta actividad biológica y su concentración letal promedio (CL50) ha sido de $13,35 \text{ ug / mL}$. Su dosis letal media (DL50) es de $655,26 \text{ miligramo / kilogramo}$, que se estima tóxica.

Montes¹⁵ menciona que la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima de fungicida (CMF) del aceite importante *Satureja brevicalyx* Epl. "Wayramuña" es $1,198 \text{ miligramo / mL}$ y $2,396 \text{ miligramo / mL}$ respectivamente frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Mientras que, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del extracto hidroalcohólico, fue de $0,046 \text{ mg/mL}$ y $0,093 \text{ mg/mL}$, respectivamente, frente a la misma cepa de *Candida*.

Contreras¹⁷ investigo la actividad antibacteriana del aceite sustancial de *Minthostachys mollis* y enseñó cualitativamente su impacto antibacteriano ante la disentería de *Shigella*, *Salmonella typhi* y *E. coli*, en medio de las que la disentería de *Shigella* es la más sensible al aceite sustancial de "muña". Díaz11

concluyó el impacto antibacteriano del aceite sustancial de *Minthostachys mollis* "muña"

Díaz¹¹ contra la cepa estándar ATCC de *Salmonella*. *Proteobacteria*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium nuclear*, *Actinobacteria*, *Actinobacteriaceae* *Mitan* y *Actinomycetes*. Se usaron amoxicilina y agua como controles positivos y negativos, respectivamente. En conclusión, el aceite importante de *Minthostachys mollis* "muña" tiene una actividad antibacteriana media de 16,75 mm. El diámetro del halo.

La figura 7, revela el resultado de genotoxicidad in vitro y la preparación del extracto hidroalcohólico del tallo de la planta del té con mango corto. Para el ADN genómico humano a una concentración de 1500 ng / μ L, se incubó "Urqumuña" con concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 miligramo / mL en un baño de agua a 37°C a lo largo de 1 hora. El carril 1 corresponde a un marcador de tamaño molecular de 1 kb; los carriles 2 a 6 son carriles para procesar el ADN genómico humano, con las concentraciones que corresponden de extractos hidroalcohólicos. Se puede mirar que en los carriles 2, 3, 4, 5 y 6, gracias a la efectividad de los extractos hidroalcohólicos con concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 50 100 mg/mL, se observó la misma banda que el ADN genómico humano "control" en el carril 8, que no ha sido tratado con el extracto. El carril 7 corresponde al trazo "blanco", que es el extracto hidroalcohólico del tallo de *Spodoptera litura* Epl. 100 mg / mL de "Urqumuña", en los que no se observó ADN de hojas de "urqu muña". La banda observada en el carril 8 es ADN genómico humano sin ningún tratamiento, que sirve como "control" para la comparación con diferentes concentraciones de extractos hidroalcohólicos con cada ADN de tratamiento.

En el carril 9 corresponde a la operación de electroforesis de procesamiento de ADN genómico humano a 1500 ng / μ L, desarrollada con 100 miligramo / mL del extracto agua-alcohólico del tallo de "urqu muña" más enzima proteinasa K, mostrando que el ADN del cinturón no cayó como en el carril 6., compararlo con el "control", reiterar que la falta de 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 del tallo de la "urqu muña" pues dichos K se degradan por la acción de la proteasa y se incuban a 37°C a lo largo de 1 hora.

Igualmente, el registro fotográfico de la Figura 8 expone los resultados de genotoxicidad in vitro del extracto hidroalcohólico del tallo de *Spodoptera litura*

Epl. Comparado con el ADN genómico humano a una concentración de 1500 ng / μ L, "*Urqu muña*" a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 miligramo / mL se incubó en un baño de agua a 37 ° C a lo largo de una hora. El carril 1 corresponde a un marcador de tamaño molecular de 1 kb; los carriles 2 a 6 son carriles para procesar el ADN genómico humano, con las concentraciones que corresponden de extractos hidroalcohólicos. Se cree que en el carril 2, los extractos hidroalcohólicos se hallan en una determinada concentración. Como consecuencia, la banda de ADN no experimentó roturas obvias. Comparativamente con la banda de ADN genómico humano "control" en el carril 8 que no se ha tratado con el extracto, es de 100 miligramo / mL; los carriles 3, 4 y 5 presentan bandas de ADN a 200, 300 y 400 miligramo / mL, respectivamente. La banda de ADN en el carril 6 es más pequeña que la banda de ADN en el "control", el carril 7 corresponde al periodo "blanco", o sea, el extracto hidroalcohólico del tallo de "*urqu muña*" es de 500 miligramo / mL, en el cual el no se vio presencia de ADN del tallo "*urqu muña*". La banda vista en el carril 8 es ADN genómico humano sin ningún procedimiento, que sirve como "control" para la comparación con diferentes concentraciones de extractos hidroalcohólicos con cada ADN de procedimiento.

El carril 9 corresponde a la operación de electroforesis de 1500 ng / μ L de ADN genómico humano tratado con 500 ng / mL de extracto hidroalcohólico de tallo "*urqu muña*" más Enzima K. Comparativamente con el sexto carril, las bandas de ADN permanecen hacia abajo, comparativamente con el "control". Se reitera que la fragmentación del ADN se debería a los efectos de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico, más que a las nucleasas que tienen la posibilidad de provenir del tallo de la "*urqu muña*", debido a que estas enzimas se verán dañadas por la proteinasa K a lo largo de la hidrólisis enzimática. y degradación. Incubar a lo largo de 1 hora a 37°C.

Los resultados mostrados en la Figura 7 y Figura 8, y usando la escala de la Tabla 7 del procedimiento como alusión, se toman como el costo destinado como el nivel de fragmentación del ADN genómico humano, como el producto de la prueba de *genotoxicidad in vitro*, según a la concentración del extracto hidroalcohólico. "*Urqu muña*", la misma que se reporta en la Tabla 12; detalla que los fragmentos de 5, 10, 25, 50 y 100 miligramo / mL son menos del 5% del DNA (valor = 0); con 200; 300 y 400 mg/mL, entre el 5 al 20 % (valor = 1); mientras que con 500 mg/mL, entre 20 al 40 % del ADN genómico humano tratado (valor = 2).

Luego de tomar dichos datos, los valores se enumeran en la Tabla 12. Se usó la prueba de *Kruskal-Wallis* para la investigación estadística para equiparar el nivel de fragmentación del ADN genómico humano a intentar, expresado como un porcentaje (%) relativo a un porcentaje de la concentración. Extracto hidroalcohólico de los tallos de *Platycladus orientalis*. "Urqu muña" se expresa en mg por mililitro (mg / mL), como se muestra en la Figura 9. El porcentaje de fragmentación del ADN genómico humano expone el nivel de genotoxicidad. La premisa nula (H_0) se usa para indicar que cada una de las medianas son equivalentes a otra conjetura (H_1), y por lo menos una mediana es distinto. Los resultados informan que para $GL = 8$ y $H = 35,00$, el costo de P es $0,000$; para $GL = 8$ y $H = 35,00$, el costo de P es $0,000$. y entonces, como P es menor que 0.05 , se rechaza H_0 y se acepta H_1 . Por consiguiente, el nivel de fragmentación del ADN genómico humano procesado es dependiente de la concentración del extracto hidroalcohólico del tallo de *Spodoptera litura* Epl. "Urqu muña".

Del mismo modo, los resultados que obtuvimos fortalecen y secundan el procedimiento usado en el trabajo de hoy para aprender la genotoxicidad del ADN genómico; es consistente con los resultados conseguidos por Marca et al.¹⁷ quienes evaluaron la genética *in vitro* del extracto de ajo y toxicidad del jugo. Extracto de etanol de bulbos de "ajo" a una concentración de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 miligramo / mL contra *Staphylococcus* sp. El ADN genómico no es genotóxico. Aun cuando la concentración de jugo de bulbo de "ajo" de 5, 10, 50 y 100% enseñó un intenso impacto genotóxico y fragmentó el 100% del ADN, la prueba de *Kruskal-Wallis* reportó $H = 0.53$, $GL = 3$ y $p = 0.912$. Concluyeron que la savia de los bulbos de ajo es enormemente genotóxica para el ADN genómico de *Staphylococcus*. De igual manera, Moreno⁴⁰ informó la evaluación de la genotoxicidad *in vitro* de papaya fresca y cristalizada para el ADN genómico humano. Expone que las 7 concentraciones de látex fresco probadas fueron 1%, 2.5%, 5%, 10%, 25%, 50% y 100%, en el ADN genómico humano; la concentración de 10%, 25% y 50% de fragmentación de látex cristalino está entre el 20% y el 40% de ADN, y la concentración de látex cristalino degradado al 100% es del 40% de ADN genómico humano al 95%. La toxicidad genética del látex cristalino es dependiente de su concentración.

La toxicidad antibacteriana y genética de las plantas medicinales se atribuye primordialmente a la existencia de flavonoides, alcaloides y taninos.⁶

VI. CONCLUSIONES

1. Los extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicalix* Epl. “urqu muña” Ha mostrado efectos genotóxicos sobre el ADN genómico humano *in vitro*.
2. Los metabolitos secundarios presentes en los extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicalix* Epl. “urqu muña” fueron: taninos y/o fenoles, en concentración abundante en hojas y tallos; flavonoides en cantidad regular en hojas y trazas en tallos; catequinas en regular cantidad en hojas y poca cantidad en tallos; saponinas en regular cantidad en hojas y ausente en tallos y alcaloides en trazas tanto en hojas como en tallos; mientras que, no se detectaron la presencia de azúcares reductores, resinas ni mucílagos.
3. El efecto genotóxico de los extractos hidroalcohólico de *Clinopodium brevicalix* Epl. “urqu muña” frente al ADN genómico humano, depende de la concentración, mostrando en hojas a partir de 25 mg/mL y del tallo a partir de 200 mg/mL.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones de efecto genotóxico con metabolitos secundarios fraccionados, de extractos de *Clinopodium brevicalex Epl.* “urqu muña”.
2. Ampliar estudios genotóxicos de *Clinopodium brevicalex Epl.* “urqu muña”, en cultivos celulares.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hernández Rodríguez Alberto Inocente “Guía metodológica de investigación para el desarrollo de un fitomedicamento”. Edit ECIMED. La Habana, Cuba 2017.
2. Hostettmann Kurt, Gupta P. Mahabir, Marston Andrew, Ferreira Queiroz E, “Manual de estrategias para el aislamiento de productos naturales bioactivos” 1ra edición CYTED 2008.
3. Magallanes C. y otros. Estudio ecológico y etnobotánico de las plantas medicinales y alto andinas de Quinua y Chíara. Ayacucho: Facultad de Ciencias Biológicas. Área de Botánica. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga 1994.
4. Teodoro, A.F. Fitomedicina, 1100 plantas medicinales. Lima, 271. 2003. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1700/TAL%2015-124-TM.pdf?sequence=1>
5. Carhuapoma YM. Actividad anti – *Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling “urqu muña”. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; Lima – Perú 2007.
6. Carballo M, Cortada C, Gadano A. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. Revista teoría, historia y fundamentos de la Ciencia [revista en Internet] 2010 [acceso septiembre 2017]; 14(2): 95-108. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=29914211>.
7. Miranda T. “Método Tomasevich”: para determinar el Efecto Genotóxico *in vitro* de plantas medicinales y/o productos fitoterapéuticos. 2^{do} Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. Clave: TXG808. Durango, México 2017.
8. Soto V. M. Estudio fitoquímico y determinación de la actividad analgésica en diferentes extractos de la *Satureja brevicalyx* Epl “wayra muña” UNSCH, Ayacucho; 1999
9. Inga A y Guerra B. Efecto del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) contra algunas bacterias y hongos de interés en la salud. Tesis para obtener título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima, Perú 2000.
10. Diez MJ. Efecto antiespasmódico de la “wayra muña” *Satureja brevicalyx* Epl. sobre intestino aislado de “cobayo”. UNSCH, Ayacucho 2002.
11. Diaz K. Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de *Minthostachys mollis* Griseb “muña” frente a bacterias orales de importancia estomatológica. Tesis para obtener título de Cirujano Dentista. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú 2005.
12. Palomino PR. Efecto antioxidante del extracto acuoso liofilizado de las hojas de la *Satureja brevicalyx* Epl “wayra muña”. UNSCH; Ayacucho; 2005.
13. Cano Pérez, C. A. (2007). Actividad antimicótica *in vitro* y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña.” Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 25(3), 1–7, [revista en Internet] 2010 [acceso septiembre 2018] Disponible en: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
14. Mora F. et al. Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of the essential oil *Minthostachys mollis* from Venezuela Andes. Natural Product Communications, Mora F. et al, 2009; 4(7): 997-1000.
15. Ever Zenon MC. Actividad antimicótica del aceite esencial y el extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. “wayra muña” sobre una cepa de

- Candida albicans* ATCC10231, Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga. Ayacucho - Perú 2013.
16. Marca P, Miranda T, Moreno M, Galindo Y, Arenas J. Preliminary evaluation of the in vitro genotoxicity of the ethanolic extract and *allium sativum* L. "garlic" juice against the dna of *staphylococcus* SP. 5to Congreso Internacional sobre Farmacología de Productos Naturales. Cuba 2018.
 17. Contreras G. Actividad antimicrobiana del aceite Esencial de *Minthostachys mollis* "muña" frente a bacterias enteropatógenas. Tesis para obtener título de Biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.1983 [Revista en Internet] 2012 [acceso septiembre 2018]; Disponible en:
 18. Cronquist A. Anintegratedsystemof classification offloweringplants. Edit. Columbia University Press. New York 1981.
 19. Brako L, Zarucchi J. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Perú. Missouri Botanical Garden. Missouri 1993.
 20. Aucasime L. Plantas medicinales de la provincia de Huamanga- Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga 2007.
 21. Teodoro, A.F. Fitomedicina, 1100 plantas medicinales. Lima, 271. 2003, [revista en Internet] 2007 [acceso septiembre 2018] Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1700/TAL%2015-124-TM.pdf?sequence=1>.
 22. Oviedo F. Ensayos toxicológicos preliminares con aceite esencial de "muña". Tesis de bachiller. Cuzco: UNSAAC; 1979.
 23. Lehninger A, Nelson D, Cox M. Principios de Bioquímica. 6ª ed. Barcelona: Omega 2014.
 24. Voet, D. Bioquímica.3ª Edición. Argentina: Medica Panamericana, 2010.
 25. Lodish H, Berk A, Lawrence Z, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Biología celular y molecular. 4a ed. Madrid: Médica Panamericana S.A.; 2012.
 26. Daniel L, Elizabeth W. Genetics: Analysis of Genes and Genomes. 6th editionHartl 2003
 27. Repetto Jiménez M, Repetto Kuhn G. Toxicología fundamental. 4ª Edición. Madrid: Díaz de Santos 2009.
 28. Glosario de términos Toxicológicos. Asociación Española de Toxicología (AETOX).
 29. Hernández, Moreno, Zaragoza, Porres. Tratado de Medicina Farmacéutica. España: Médica panamericana, S.A. 2011.
 30. Bello J, López A. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Madrid: Díaz de Santos 2001.
 31. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD).Curso de Toxicología Ambiental. Bogotá (Colombia) 2011.
 32. Carballo M. Centro de Análisis Programas Sanitaris (CAPS). Biomarcadores de genotoxicidad. Barcelona Universidad de Buenos Aires, 2011.
 33. Arrebola D.; Fernández L. Actualización Sobre el ensayo cometa y de Micronúcleos *In vitro*, 2003.
 34. Fairbairn D, Olive P, O'Neill K. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*; 1995.
 35. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. Quinta edición. Perú. Editorial Mc Graw Hill; 2010.
 36. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2da Edición. Fondo editorial; 1994.

37. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad De La Habana Instituto de Farmacia y Alimentos. Cuba. 2000.
38. Arena I, López J. "Espectrofotometría de absorción." Métodos de laboratorio. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2004.
39. Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. Mutation Research; 2009
40. Moreno Miriam, Miranda Tomás, Quispe Carmen, Rivera Jime, Ango Homero. Evaluación de la genotoxicidad *in vitro* de látex fresco y cristalizado de *Carica papaya* L. "papaya", frente a ADN genómico humano. 2^{do} Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. Clave: TXG807. Durango, México. 2017.
41. 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.
42. Larrea Poma M. Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay [tesis de grado]. La Paz. Universidad Mayor de San Andrés; 2007.
43. Alarcón G. Efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antiinflamatorias *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Piper elongatum* Vahl "matico" y *Xanthium catharticum* HBK "amor seco". [Tesis para obtener título]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú. 2013.
44. Quiros R. Evaluación de la actividad cicatrizante de un gel elaborado a base de los extractos de nogal (*Juglans neotropica diels*), ortiga (*Urtica dioica* L.), sábila (Aloe vera), en ratones (*Mus musculus*). [tesis para obtener el título]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba – Ecuador. 2013. [revista en Internet] 2014 [acceso Julio 2016]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2568>.
45. Hurtado P. Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica diels* (nogal peruano). [tesis para optar título]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú. 2014.
46. Raquel P. Electroforesis: fundamento, técnica. [acceso septiembre 2020] Disponible en: <https://www.lifeder.com/electroforesis/>

ANEXOS

Anexo 1. Clasificación taxonómica de *Clinopodium brevicalex* Epl. "urqu muña".
Ayacucho 2018.



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. Vanessa, ATAUCUSI ORÉ**, 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	:	LAMIALES
FAMILIA	:	LAMIACEAE
GENERO	:	<i>Clinopodium</i>
ESPECIE	:	<i>Clinopodium brevicalex</i> Epl.
N.V.	:	" urqu muña"

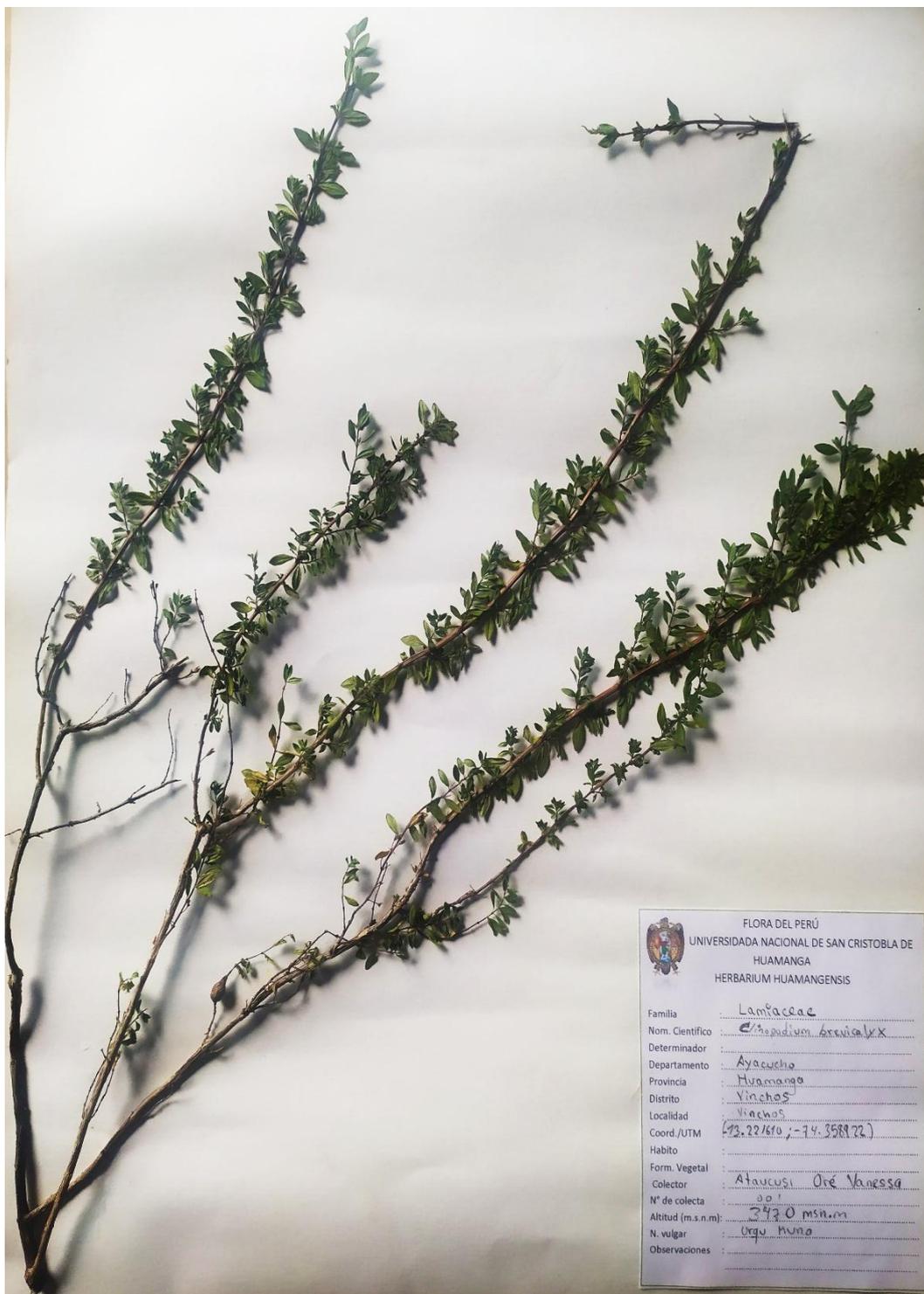
Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada
para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 2 de Enero del 2017

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

Dña. Laura Aucasi Medina
JEFE

Anexo 2. Herbarium de la planta de *Clinopodium brevicalex* Epl. "urqu muña".
Vinchos-Ayacucho 2018.



Anexo 3. Formato de consentimiento informado individual. Ayacucho 2018.

FORMATOS DE CONSENTIMIENTO INFORMADO INDIVIDUAL

Proyecto: Efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicallix* Epl. "urqu muña" frente a ADN genómico humano. Ayacucho, 2019.

Presentación

Mi nombre es Vanessa ATAUCUSI ORE, soy tesista en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, estoy realizando un estudio sobre el efecto genotóxico de las plantas medicinales de uso común en la región Ayacucho. El estudio se va realizar en los ambientes del Centro de Investigación en Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, usted tiene derecho a preguntar sobre cualquier riesgo o beneficio de este estudio para usted, su familiar y sobre cualquier otro punto que no esté claro. Cuando hayamos respondido todas sus dudas, usted tiene el derecho de decidir si usted puede participar o no.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por favor lea la siguiente información, medite su elección y firme si usted está de acuerdo:

Estoy de acuerdo:

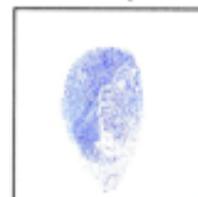
- En donar una muestra de sangre venosa en volumen aproximado de 5 mL.
- En que el ADN que se obtenga, se utilice solo en el estudio "Efecto genotóxico in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicallix* Epl. "urqu muña".
- En que toda la información científica que resulte de la citada investigación, no se publique tomando mi nombre.

He leído o escuchado toda la información, he hecho todas las preguntas que he tenido, y todas mis preguntas han sido respondidas satisfactoriamente. Soy consciente de que dar una muestra es mi decisión.

Nombre del participante: _____

Firma del participante: _____

Fecha _____

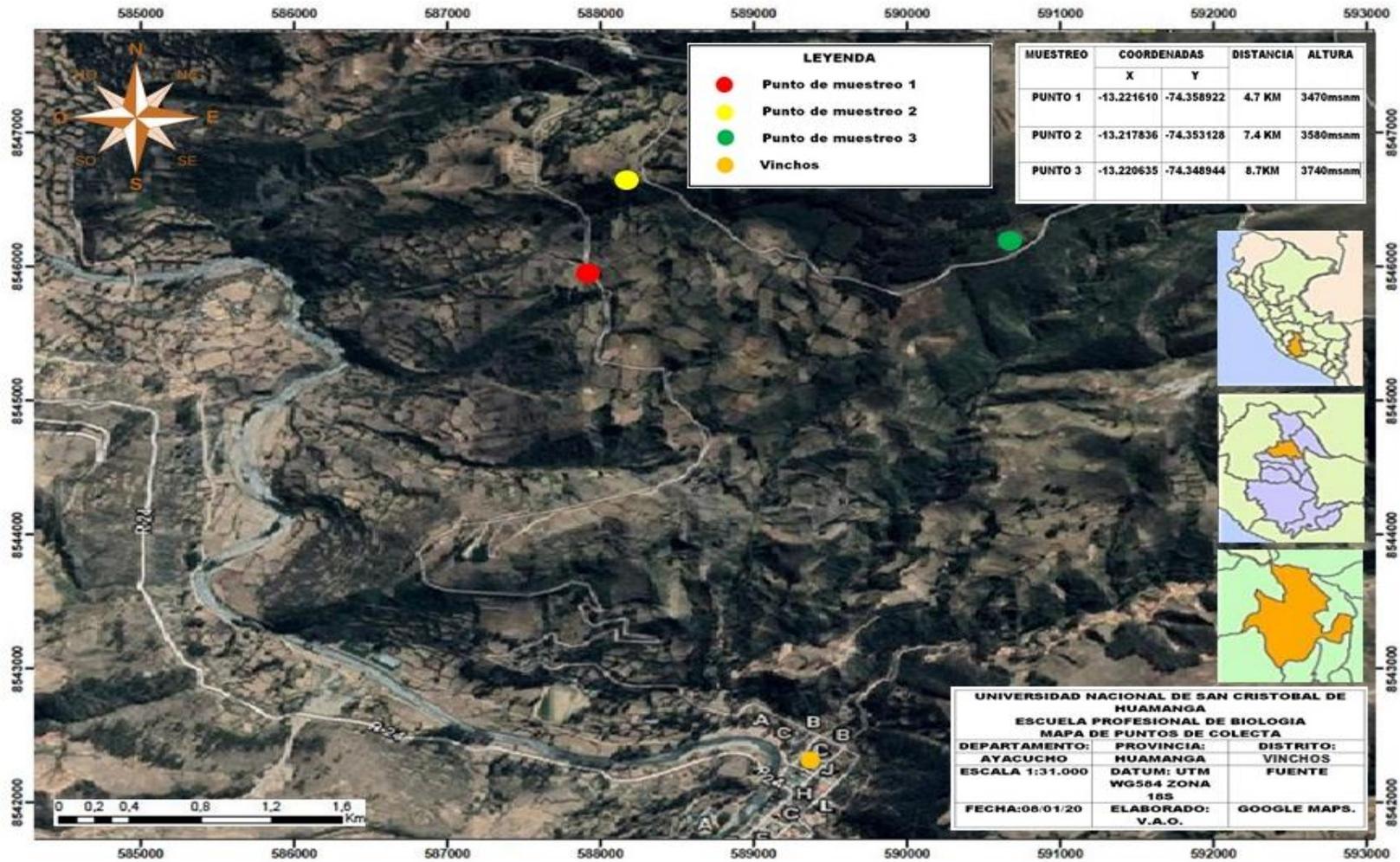


¿Se le otorgó copia al participante?: No

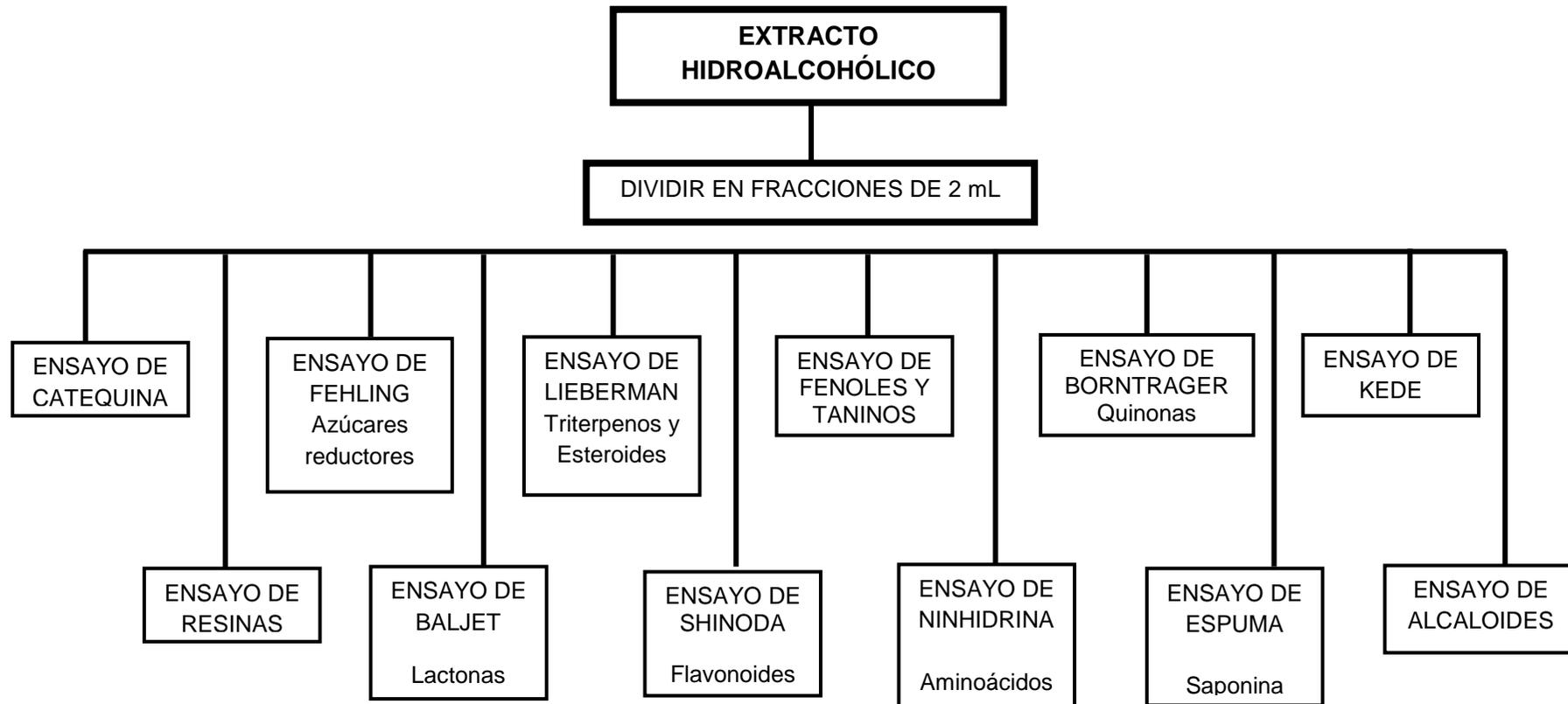
Huella digital

Nombre y firma del Investigador Vanessa Ataucusi Ore _____

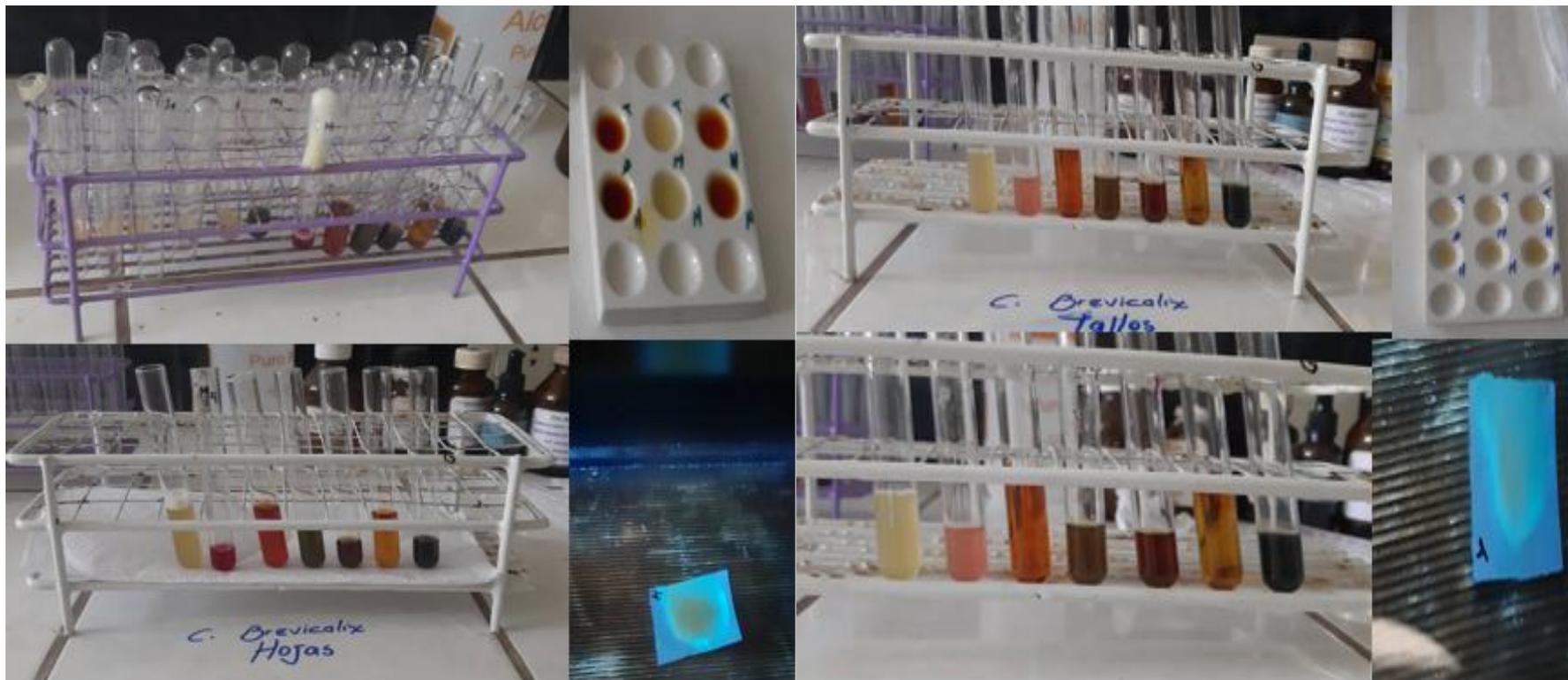
Anexo 4. Ubicación geográfica de la zona de muestreo de la planta de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña”. Vinchos-Ayacucho 2018.



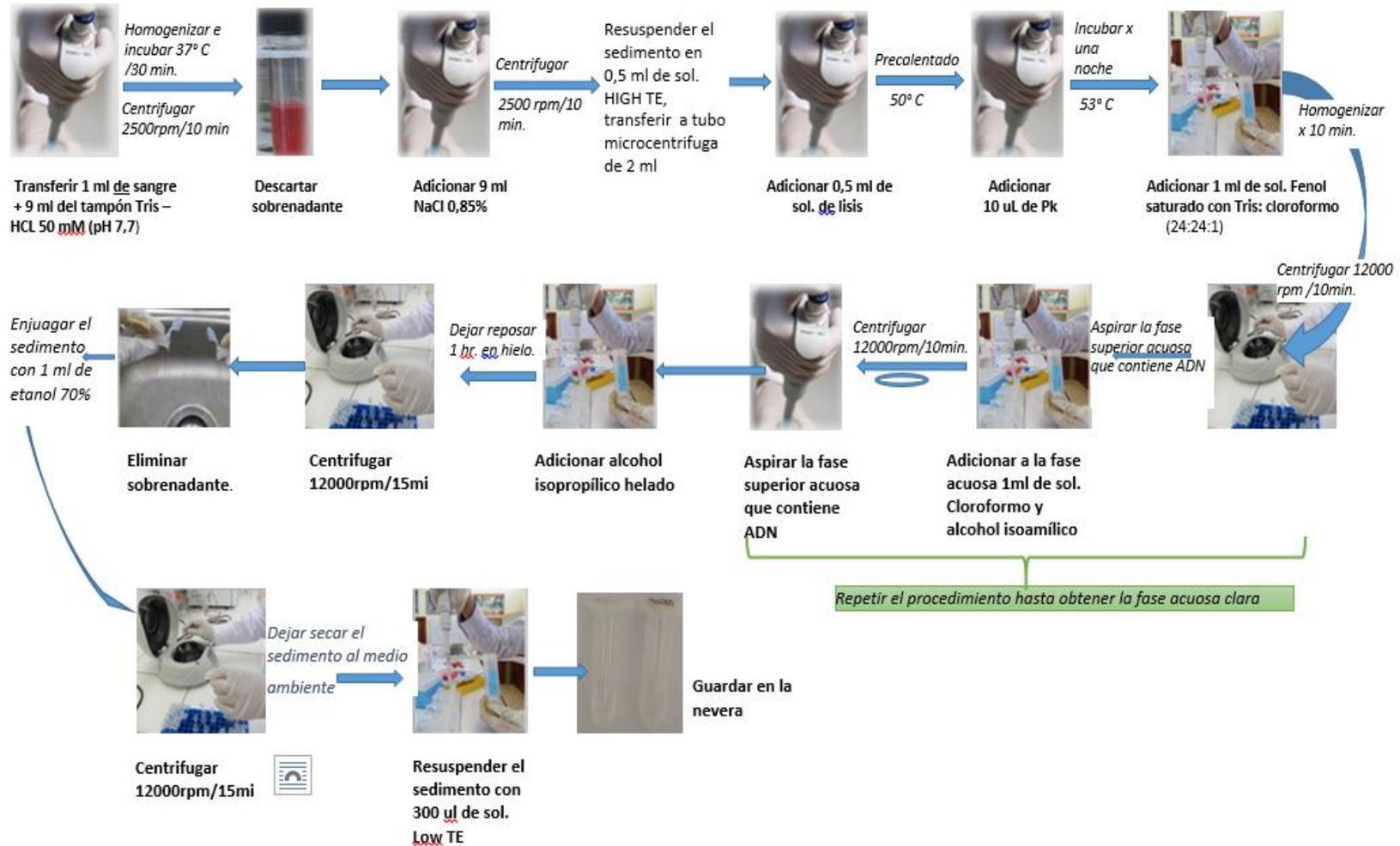
Anexo 5. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqumuña”.



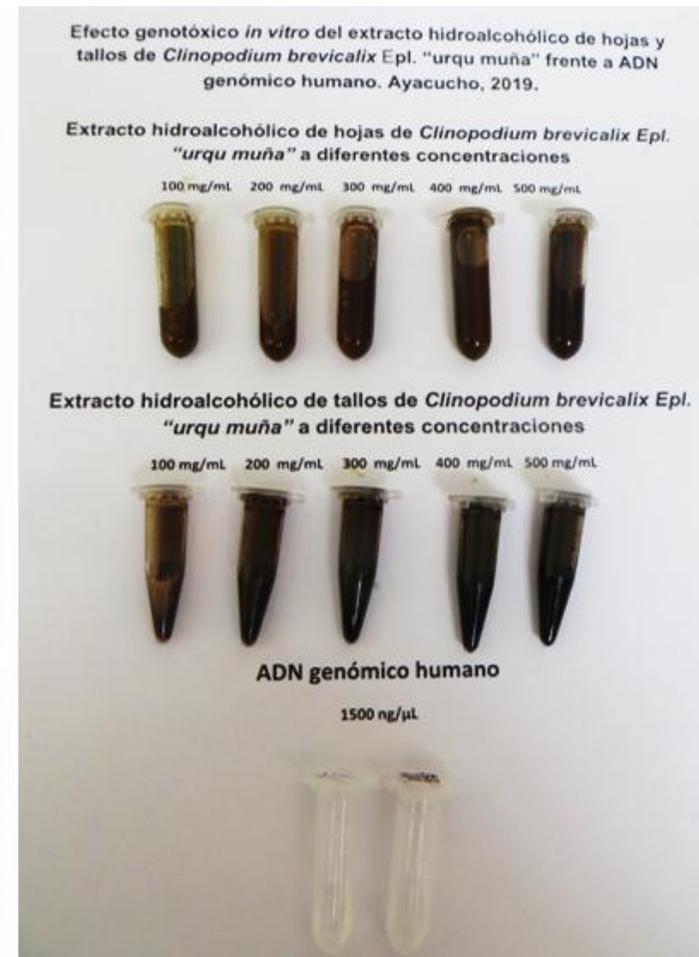
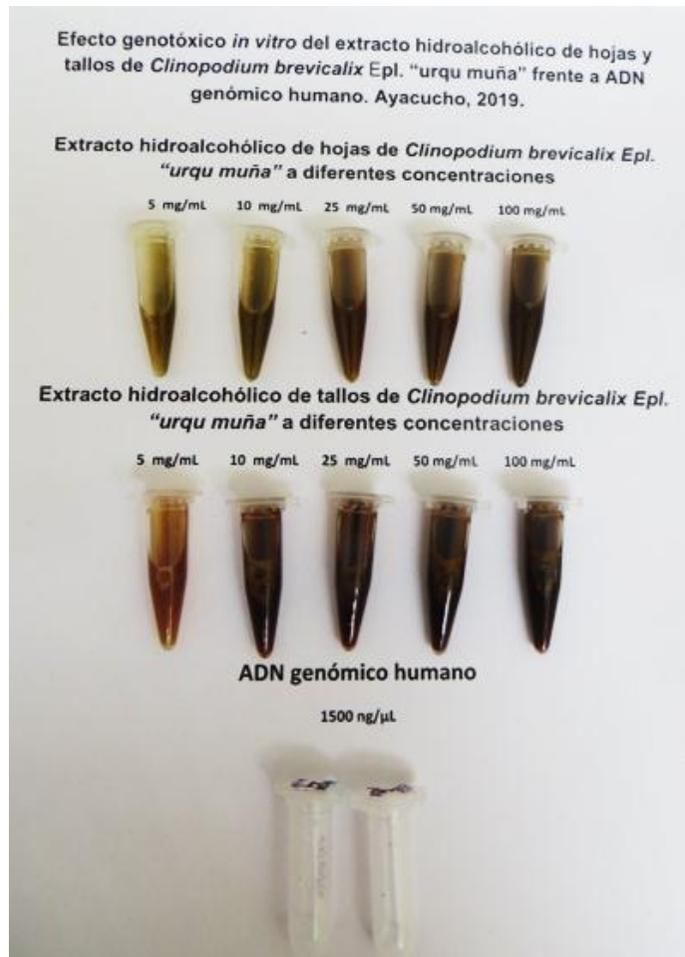
Anexo 6. Screening fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña”, Ayacucho 2018.



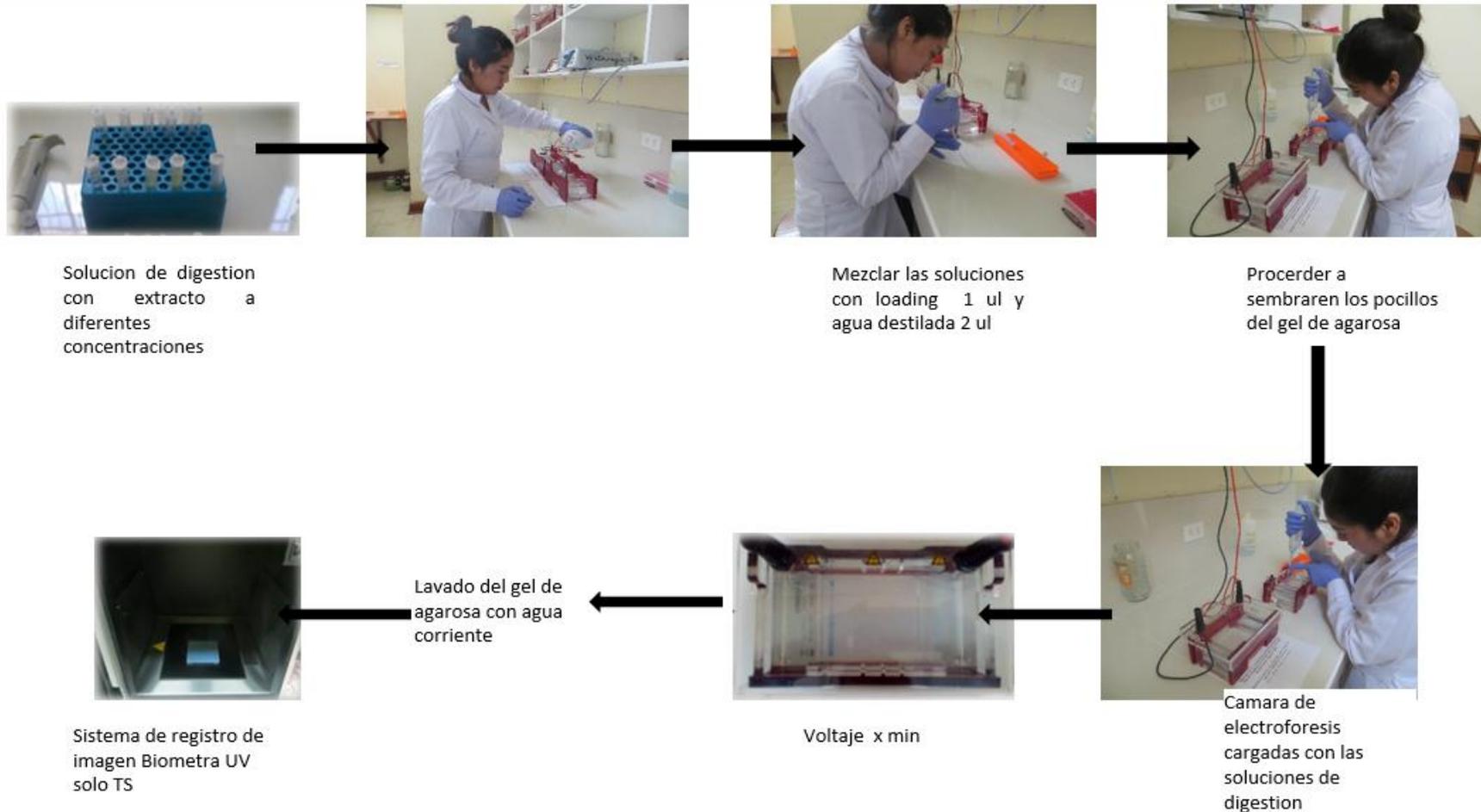
Anexo 7. Protocolo de extracción de ADN genómico humano. Ayacucho 2018.



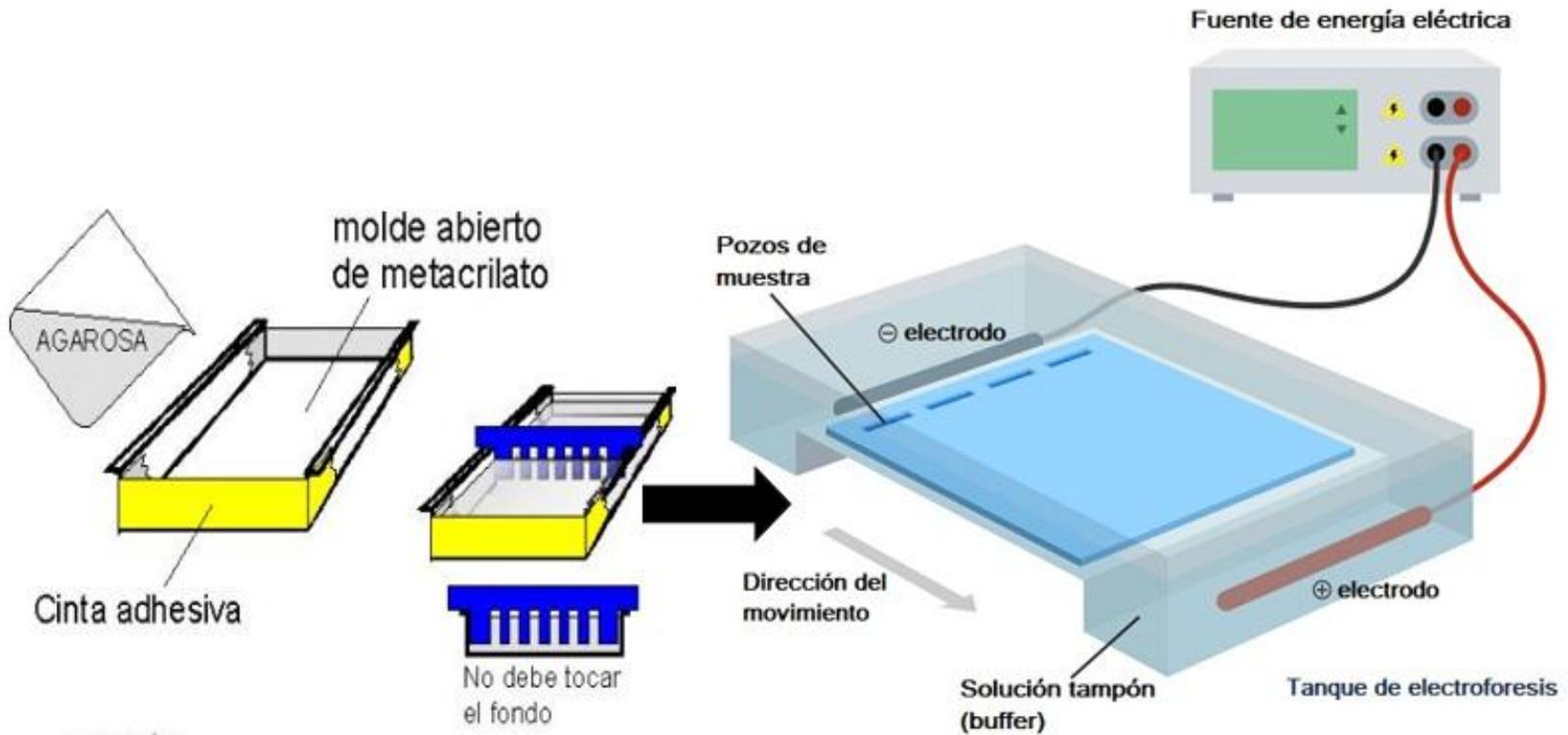
Anexo 9. Extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicalex* Epl. "urqu muña" a diferentes concentraciones Ayacucho 2018.



Anexo 10. Proceso para la determinación del Extracto hidroalcoholico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña” a diferentes concentraciones. Ayacucho 2018.



Anexo 11. Diagrama de equipo de electroforesis.



Fuente: <https://www.lifeder.com/electroforesis>. Imagen cortesía de Raquel Parada Puig46

Anexo 12. Matriz de consistencia.

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Efecto genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Clinopodium brevicalix</i> Epl. "urqu muña" frente a ADN genómico humano. Ayacucho, 2018.	¿Cuál será el efecto genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Clinopodium brevicalix</i> Epl. "urqu muña" frente a ADN genómico humano?	<p>GENERAL</p> <p>Determinar el efecto genotóxico <i>in vitro</i> de los extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Clinopodium brevicalix</i> Epl. "urqu muña" frente a ADN genómico humano.</p> <p>ESPECIFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> Identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Clinopodium brevicalix</i> Epl. "urqu muña". Evaluar el efecto genotóxico de los extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Clinopodium brevicalix</i> Epl. "urqu muña" frente a ADN genómico humano. 	<ul style="list-style-type: none"> Antecedentes del estudio. <i>Clinopodium brevicalix</i> Epl. "urqu muña" Clasificación taxonómica, descripción Botánica, Hábitat y distribución. Ácido desoxirribonucleico (ADN o DNA) genómico humano Extracción de ADN en sangre Toxicidad y genotoxicidad Electroforesis en gel. Evaluación de la genotoxicidad <i>in vitro</i> por el "Método Tomasevich". 	El extractos hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Clinopodium brevicalix</i> Epl. "urqu muña", a determinadas concentraciones, presentan genotoxicidad <i>in vitro</i> frente al ADN genómico humano.	<p>Variable independiente: Hojas y tallos de <i>Clinopodium brevicalix</i> Epl. "urqu muña".</p> <p>Indicador:</p> <ul style="list-style-type: none"> Concentración porcentual v/v del látex, en µL (microlitros). Concentración m/v del extracto hidroalcohólico de semilla, en mg/mL. <p>Variable dependiente: Efecto genotóxico <i>in vitro</i> frente al ADN genómico humano.</p> <p>Indicador: Grado de fragmentación del ADN genómico humano</p> <p>Escala de valoración numérica: 0, 1, 2, 3 y 4.</p>	<p>Tipo de investigación: Experimental.</p> <p>Nivel de investigación: Básico</p> <p>Definición de la población y muestra: Hojas y tallos <i>Clinopodium brevicalix</i> Epl. "urqu muña", que crece sobre los 3700 msnm, de la región de Ayacucho.</p> <p>Diseño Experimental: Los ensayos se realizarán con un modelo <i>in vitro</i> para estudiar la actividad genotóxica de tallos y hojas sobre el ADN genómico de linfocitos humanos, demostrándose por su fragmentación. Se aplicará prueba de Kruskal-Wallis para más de dos muestras independientes. El valor de $p \leq 0,05$.</p>