

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Genotoxicidad *in vitro* del zumo de las flores y extracto
hidroalcohólico de hojas de *Brugmansia arborea* (L)
Lager “floripondio” frente a ADN genómico humano.

Ayacucho, 2017

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA

PRESENTADO POR LA:

Bach. GARCIA SOTO, Zinquia Vaneza

AYACUCHO – PERÚ

2018

A mis padres Marcelina Soto Arroyo y Esteban García Castilla y queridos hermanos que confiaron en mí, agradezco por el apoyo y confianza incondicional que me brindan, quienes me enseñaron el mejor camino a seguir para culminar mi carrera profesional.

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial a nuestra *Alma Mater* la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga forjador de excelentes profesionales al servicio de la comunidad Ayacuchana, dentro y fuera del país.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, así mismo a todos los docentes que me impartieron sus conocimientos y experiencias en el transcurso de mi vida estudiantil, gracias por prepararnos para un futuro competitivo no solo como los mejores profesionales sino también como mejores personas.

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

A mis padres y hermanas por su apoyo incondicional y confianza brindada en todo momento, a mis amigos que siempre estuvieron conmigo apoyándome.

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	3
2.1 Antecedentes.	3
2.2 Marco conceptual	6
2.2.1 <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”	6
2.2.2 Descripción botánica	6
2.2.3 Toxicidad y genotoxicidad	9
2.2.4 Evaluación genotóxica	11
2.2.5 Electroforesis en gel	13
2.2.6 Ácido nucleico	14
2.2.7 Ácido desoxirribonucleico (ADN)	15
2.2.8 Extracción de ADN en sangre	15
2.2.9 Espectrofotometria	16
2.2.10 Evaluación de la genotoxicidad <i>in vitro</i> por el Método Tomasevich	16
2.2.11 Ensayo cometa	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Lugar de ejecución	21
3.2 Población y muestra	21
3.3 Unidad experimental	21
3.4 Metodología y recolección de datos	21
3.4.1 Recolección de la muestra	21
3.4.2 Obtención del zumo de las flores frescas y extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”.	22

3.4.3	Tamizaje fitoquímico de zumo de la flores y extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”.	23
3.4.4	Extracción de ADN genómico	23
3.4.5	Ensayo de genotoxicidad in vitro	24
3.4.6	Fase de electroforesis	26
3.4.7	Fase de lectura por radiación UV	28
3.4.8	Fase de interpretación y clasificación del registro visual de genotoxicidad	28
3.5	Tipo de investigación	29
3.5.1	Diseño de investigación	29
3.6	Análisis de datos estadísticos	29
IV.	RESULTADOS	31
V.	DISCUSIÓN	43
VI.	CONCLUSIONES	49
VII.	RECOMENDACIONES	51
VIII.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	53
XI	ANEXO	57

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.	
Tabla 1	Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> de zumo de la flor fresca de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio” sobre ADN genómico humano.	25
Tabla 2	Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> de extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio” sobre ADN genómico humano.	25
Tabla 3	Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> de extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio” sobre ADN genómico humano.	26
Tabla 4	Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN genómico humano, con el zumo de las flores frescas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”, para el ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> . Ayacucho 2017.	26
Tabla 5	Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN de grupo 1 para el ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico del <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”. Ayacucho 2017.	27
Tabla 6	Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN genómico humano, con el extracto hidroalcohólico del <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”, para el ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> . Ayacucho 2017.	27
Tabla 7	Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.	28
Tabla 8	Diseño de investigación	28
Tabla 9	Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas y zumo de las flores de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”. Ayacucho, 2018.	32
Tabla 10	Valores numéricos del ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del zumo de las flores frescas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”	38

a concentraciones de 5%, 10%, 25%, 50% y 100%, frente a ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante una a dos hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.

Tabla 11	Valores numéricos del ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente a ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante dos a tres horas. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.	40
----------	---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”	7
Figura 2 Estructura química del ADN	15
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. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.	33
Figura 4 Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del zumo de la flor fresca de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 5%, 10%,25%, 50% y 100%, frente a ADN genómico de <i>Staphylococcus sp.</i> incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.	34
Figura 5 Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto extracto hidroalcohólico de hojas del <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, frente a ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante tres horas. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.	35
Figura 6 Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto extracto hidroalcohólico de hojas del <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, frente a ADN genómico humano. incubado a 37 °C durante tres hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.	36
Figura 7 Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto extracto hidroalcohólico de hojas del <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente a ADN genómico humano incubado a 37 °C durante dos horas. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.	37
Figura 8 Prueba de Kruskal-Wallis (H = 18,4, GL = 4, P = 0.001): para determinar el grado de genotoxicidad <i>in vitro</i> del zumo de las flores frescas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 5%, 10%, 25%, 50% y 100%, frente a ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante una a dos hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.	39
Figura 9 Prueba de Kruskal-Wallis (H = 33.84, GL = 8, P = 0.000): para	41

determinar el grado de genotoxicidad *in vitro* del extracto extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brugmansia arborea* (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente a ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante dos a tres horas. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.

ÍNDICE DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1	Clasificación taxonómica de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio” .Ayacucho 2017.	58
Anexo2	Descripción Botánica de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio” .Ayacucho 2017.	59
Anexo 3	Diagrama para la obtención del zumo de las flores frescas y extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio. Ayacucho 2017.	60
Anexo 4	Obtención del Zumo de las flores frescas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”. Ayacucho 2018.	61
Anexo 5	Recolección, molienda y obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”. Ayacucho 2018.	62
Anexo 6	Ensayo de identificación fotoquímico del Zumo de las flores y extractos hidroalcohólico de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”. Ayacucho 2017.	63
Anexo 7	Proceso de preparación a diferentes concentraciones del zumo de las flores frescas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”. Ayacucho 2018.	64
Anexo 8	Proceso de preparación a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”. Ayacucho 2018.	65
Anexo 9	Preparación de solución de digestión de ADN genómico humano (con las concentraciones de zumo de flores y de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”. E incubación en baño maría por 1 hora a 37 C°. Ayacucho 2018.	66
Anexo 10	Preparación de solución de digestión de ADN genómico humano (con las concentraciones de extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio” e incubación en baño maría por 1 hora a 37 C°. Ayacucho 2018.	67
Anexo 11	Fase de electroforesis en gel de agarosa (se repite el mismo procedimiento con las concentraciones de Zumo de flores y Extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”. Ayacucho 2018.	68

Anexo 12	Fase de coloración con bromuro de etidio.	69
Anexo 13	Diagrama de equipo de electroforesis	70
Anexo 14	Matriz de consistencia	71

RESUMEN

Esta planta tiene propiedades somníferas, analgésicas, alucinógenas y tóxicas, también reportan actividad antimicrobiana contra cepas patógenas. Objetivo: determinar la genotoxicidad del zumo de la flor y extracto hidroalcohólico de hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager "floripondio". Este trabajo se realizó entre los meses de setiembre de 2017 a febrero de 2018 en el laboratorio de Farmacognosia de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y en el Centro de Investigación de Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en la ciudad de Ayacucho. El zumo se obtuvo previa molienda en mortero estéril. Las hojas secas y molidas fueron maceradas en etanol:agua (3:1), luego filtradas y evaporadas hasta obtener el extracto; el efecto genotóxico *in vitro*, fue determinado con el "método Tomasevich": preparándose soluciones del extracto a 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, 6 μ L de cada uno de éstos se enfrentó sobre 14 μ L de DNA genómico humano (1,500 ng/ μ L), se tuvo como "blanco" el extracto (500 mg/mL), como "control" 14 μ L de ADN y como "descarte de nucleasas", un tubo con 14 μ L de DNA más 6 μ L extracto (500 mg/mL) y 6 μ L proteinasa K. Se incubaron en baño María a 37°C durante una hora. Estos productos, además de un marcador de tamaño molecular, se sometieron a electroforesis (40 voltios durante tres horas) en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1%, luego se visualizó con radiación de luz ultra violeta y se tomó el registro fotográfico.

El extracto hidroalcohólico de "floripondio" a concentración de 50 mg/mL, fragmenta entre 40 a 95% de DNA, y de 100 a 500mg/mL, fragmentó a mayor de 95% de DNA, prueba de Kruskal Wallis (H=33.84, GL=8, P=0.000). El zumo de flores de "floripondio" a concentraciones de 10% fragmenta entre 5 a 20% de DNA, y de 25 al 100%, fragmentó a mayor del 95% de DNA, prueba de Kruskal-Wallis (H=18.4, GL=4, p=0.001). Conclusión: Frente al DNA genómico humano, el zumo de la flor, presenta mayor efecto genotóxico que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager "floripondio".

Palabras clave: Genotoxicidad, *Brugmansia arbórea*.

I. INTRODUCCIÓN

La utilización de las plantas como agentes terapéuticos en la atención primaria de la salud, se ha mantenido a lo largo del tiempo y puede afirmarse que aproximadamente el 60-80% de la población mundial todavía depende en gran parte de los tratamientos tradicionales que implican el uso de extractos de plantas o de sus principios activos. En algunas comunidades, donde grupos étnicos utilizan la fitoterapia popular entre sus terapéuticas ancestrales, las plantas medicinales forman parte de su acervo cultural. Asimismo, en aquellos contextos culturales, donde la población de escasos recursos económicos, tiene dificultad para recibir atención médica y a tener acceso a medicamentos, también se recurre a la medicina tradicional.¹ Generalmente la actividad farmacológica de las hierbas medicinales se asocia con la toxicidad de las mismas y el efecto tóxico inducido depende de la dosis consumida. Los compuestos químicos presentes en las plantas medicinales pueden interactuar directa o indirectamente con el ADN, produciendo cambios que afectan el funcionamiento celular y que a largo plazo causan trastornos en la salud. De ahí la importancia de detectar en sus etapas iniciales la acción sobre el material genético.²

Las hojas de *Brugmansia arborea* (L) Lager “floripondio” se utilizan vulgarmente para combatir los dolores, sobre todo los cólicos intestinales, también se usan como emolientes aplicadas en cataplasmas; también se usa por sus propiedades narcóticas, colocando flores debajo de la almohada para inducir el sueño, o alucinógenas tomando infusión de las flores.³

La genotoxicidad de los agentes químicos es una característica intrínseca, basada en el potencial electrofílico del agente para unirse a los campos nucleofílicos de macromoléculas presentes en las células, tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN) el portador de la información hereditaria. La genotoxicidad, por tanto, es la toxicidad que se manifiesta en el material genético

de las células, estos incluyen efectos tanto directos como indirectos sobre el ADN.⁴

En el presente estudio, la estimación del daño genotóxico *in vitro* fue determinado con el “método Tomasevich”, que consiste en exponer al ADN genómico humano a diferentes concentraciones del zumo y/o extracto hidroalcohólico de la planta medicinal, luego sometido a electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio y visualizado en radiación de luz ultra violeta; constituyendo un método eficaz y eficiente para determinar la genotoxicidad de las plantas medicinales.⁵

Se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Determinar la genotoxicidad del zumo de la flor y extracto hidroalcohólico de hojas de *Brugmansia arborea* (L) Lager “floripondio”, en un ensayo preliminar *in vitro*, frente a ADN genómico humano.

Objetivos Específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el zumo de la flor y extracto hidroalcohólico de hojas de *Brugmansia arborea* (L) Lager “floripondio”.
- Evaluar la genotoxicidad *in vitro* del zumo de la flor y extracto hidroalcohólico de hojas de *Brugmansia arborea* (L) Lager “floripondio”, mediante la fragmentación de ADN genómico humano.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio.

Piñeros y col.⁶ evaluó la Actividad antimicrobiana del extracto etanólico e hidrolato obtenido de las hojas de *Brugmansia arbórea* “borrachero” sobre diferentes cepas patógenas, un estudio experimental que consistió en la recolección del material vegetal (hojas) en el Jardín Botánico Jorge Piñeros Corpas. Para la obtención del extracto etanólico realizó una extracción continua tipo Soxhlet con etanol al 96% y el hidrolato lo obtuvo por hidrodestilación. La actividad antimicrobiana lo realizó por el método de difusión de disco en agar (Kirby-Bauer) con sensidiscos a concentración de 10mg/mL, sobre diferentes cepas microbianas ATCC (*Escherichia coli*, *Pseudomona aeuroginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Streptococcus faecalis*, *Aspergillus brasilensis*), realizando mediciones de los halos de inhibición a las 24 y 48 horas, los cuales fueron comparados con los controles positivos (gentamicina, ampicilina y fluconazol). Los extractos: etanólico y de hidrolato no presentaron actividad antimicrobiana sobre las cepas microbianas evaluadas. Sin embargo, frente a *Candida albicans* el extracto etanólico presentó halos de inhibición (7.39 mm), lo que sugiere una posible actividad antimicótica sobre levaduras.

Espinoza .⁷ determinó la actividad insecticida de los aceites esenciales y extracto hidroalcohólico de tres especies vegetales “altamisa” (*Ambrosia arborescens*), “floripondio” (*Brugmansia arborea*) y “Khoa” (*Clinopodium bolivianum*) sobre el modelo *Drosophila melanogaster*. Realizó dos pruebas de actividad insecticida: la aguda que realizó en moscas adultas, y la crónica durante su ciclo vital desde que eran huevos hasta adultos de una segunda generación. Los resultados de la toxicidad crónica muestran una aparente actividad en las tres especies vegetales estudiadas. Respecto al aceite esencial en toxicidad crónica, los resultados son muy prometedores a partir de los 500 ppm, de la especie vegetal *Clinopodium*

bolivianum, considerando además que esta sería la cantidad necesaria mínima para causar toxicidad crónica, estadísticamente significativa.

Ramírez y col.⁸ evaluaron el efecto insecticida de los extractos etanólicos de cinco plantas medicinales *Nicotiana tabacum*, *Brugmansia arborea*, *Sambucus eHaematobia irritans* L., un estudio experimental *in vitro* y utilizaron dos grupos de moscas de diez individuos cada uno; la aplicación de los extractos, lo realizaron por aspersion utilizando un atomizador comercial del mismo calibre, para todos los grupos, aplicando un disparo completo. Trabajaron un grupo control positivo, enfrentando a un insecticida piretroide comercial a base de cipermetrina, al 15%, preparado según las indicaciones de la etiqueta (dilución 1:1000 en agua corriente). Consideraron como valor mínimo de eficacia insecticida, una mortalidad de 60%. Concluyeron que *Brugmansia arborea* “borrachero” evaluado en cuatro diluciones 5:10, 2,5:10, 1,2:10 y 0,6:10; mostró efecto satisfactorio contra la *Haematobia irritans* hasta la dilución 1,2:10.

Pino y col.⁹ Evaluó efecto de *Brugmansia arborea* (L) Lagerheim (solanaceae) en el sistema reproductor masculino de ratón. Estudio experimental que consistió en la recolección de hoja y posteriormente fueron secadas en una estufa a 70 °C por 72 horas, pesadas y pulverizadas y se dejó reposar en agua destilada por 24 horas a 55 °C y posteriormente se filtró y se guardó a 20 °C. Se utilizó 10 ratones albinas swiss Rockefeller de 6 a 10 semanas por cada grupo: grupo con tratamiento 70mg de extracto acuoso por vía intraperitoneal durante 7 días, grupo control que recibió agua destilada vía intraperitoneal por 7 días, grupo control positivo con ciclofosfamida 150mg/kg vía ip por 7 días. Al séptimo día los ratones fueron eutanizados por dislocación cervical, los testículos y la cola del epidídimo fueron pesados luego de homogenizar la cola del epidídimo en solución PBS (PH 7.2) se realizó el conteo espermático en la cámara de Neu Bauer. Se realizó dos frotices por cada ratón coloreándolos en una solución acuosa de Eosina 0.5% y se observó en un microscopio óptico de campo claro. Llegaron a la conclusión que existe diferencia entre los pesos del testículo y la cola del epidídimo con respecto al control negativo, no se encontró diferencia entre el peso del epidídimo y el control negativo.

Marca y col.¹⁰ evaluaron la genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum* L. “ajo”. El extracto etanólico a 96° lo obtuvieron luego de la maceración durante 5 días; la determinación genotóxica a diferentes concentraciones, frente al DNA genómico de *Staphylococcus sp.* y la estimación

del daño genotóxico *in vitro*, lo determinaron con el “método Tomasevich” . Los metabolitos secundarios que identificaron en el extracto etanólico del bulbo de “ajo”, fueron fenoles y/o taninos en cantidad abundante; y en el zumo: fenoles y/o taninos y saponinas en cantidad abundante, y los cardenólidos en escasa cantidad. El extracto etanólico del bulbo de “ajo” a concentraciones de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente, no presentaron efecto genotóxico frente al DNA genómico de *Staphylococcus sp.*; mientras que el zumo del bulbo de “ajo”, a concentraciones de 5, 10, 50 y 100%, si presentaron un potente efecto genotóxico, fragmentando el 100% del DNA, prueba de Kruskal-Wallis (H=0.53, GL=3, p=0.912). Llegaron a la conclusión, que el zumo del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”, presenta una potente actividad genotóxica frente al DNA genómico de *Staphylococcus sp.*

Pillaca.¹¹ determinó el efecto genotóxico “*in vitro*” del látex de plantas medicinales antiverrucosas: *Euphorbia peplus* L. “leche leche” y *Ficus carica* L. “higo”. El látex fue obtenido directamente de la planta, realizándose el tamizaje fitoquímico y la determinación genotóxica a diferentes concentraciones, exponiéndose éstos sobre el ADN genómico humano; la estimación del daño genotóxico “*in vitro*” fue determinado mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% y visualizado en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra *UVsolo TS*. Los metabolitos secundarios identificados fueron: alcaloides, lactonas y/o cumarinas, taninos, flavonoides y quinonas. Ambos látex, de *Euphorbia peplus* L. “leche leche” y *Ficus carica* L. “higo”, presentaron una importante actividad genotóxica sobre el ADN genómico humano, siendo a concentraciones de 100% y 50% con mayor efecto genotóxico respecto a 25% y 10%. Concluyó que el daño genotóxico depende directamente de la concentración del látex; más no así del tiempo de incubación.

Quispe.¹² determinó el efecto genotóxico *in vitro* de látex y extracto hidroalcohólico de semilla de *Carica papaya* L. “papaya” frente a ADN genómico humano e identificó los metabolitos secundarios presentes. El látex fue obtenido directamente de la planta y las semillas fueron secadas a temperatura ambiente, luego pulverizadas, para macerar en solución hidroalcohólica etanol : agua (3 :1), en frasco de vidrio color ámbar, se llevó a evaporación del solvente hasta obtener el producto con textura de “pasta/melaza”, a partir de éste extracto se realizó el tamizaje fitoquímico y ensayos de genotoxicidad a diferentes

concentraciones, exponiéndose éstos sobre el ADN genómico de linfocito humano; la estimación del daño genotóxico “*in vitro*” fue determinado mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% y visualizado en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra UVsolo TS. El látex de “papaya” desde 5% al 100% de concentración, presenta un potente efecto genotóxico frente al ADN genómico humano; mientras que el extracto hidroalcohólico manifiesta una tendencia inversa, a mayor concentración del extracto la fragmentación del ADN es menor; y a menor concentración del extracto (5 mg/mL y 10 mg/mL), la fragmentación del ADN es mayor. Concluyó que el látex y el extracto hidroalcohólico de semilla, presentan efecto genotóxico *in vitro* frente a ADN genómico humano.

2.2 Marco conceptual

2.2.1 *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio”.

2.2.1.1 Clasificación Taxonómica

La identificación botánica se realizó según el sistema de clasificación de Cronquist A 1988 a cargo de la Blg. Laura AUCASIME MEDINA (Anexo N° 01), de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga:

División	: MAGNOLIOPHYTA
Clase	: MAGNOLIOPSIDA
Sub clase	: ASTERIDAE
Orden	: SOLANALES
Familia	: SOLANACEAE
Género	: <i>Brugmansia</i>
Especie	: <i>Brugmansia arborea</i> (L) Lager.
Nombre Vulgar	: Floripondio”

2.2.2 Descripción botánica

Planta arbustiva de 2.5 a 3 metros de alto, tallos ramificados desde la base, hojas grandes, simples, densamente pubescentes por ambas caras, largamente pecioladas, aovada-lanceoladas de borde entero y penninervias.

Flores grandes o agrupadas formando inflorescencias cimosas, generalmente axilares, cortamente pedunculadas; heteroclamídeas, pentámeras y bisexuales; cáliz formado por 5 sépalos soldados en la base formando una sola pieza bilobada , corola formado por 5 pétalos fusionados en forma de una campana, con 5 lóbulos en el ápice, de color blanco-amarillento; 5 estambres libres que

nacen de la cara interna del tubo de la corola, gineceo de ovario súpero de placentación marginal bicarpelar y bilocular conteniendo numerosos óvulos.; fruto cápsula. La planta despidе un olor desagradable.(ANEXO N° 02)



Figura 1. *Brugmansia arborea* (L) Lager "floripondio"

2.2.2.1 Habitat y distribución

Es una planta cultivada, originaria de la región andina, crece en zonas templadas y cálidas, también se le encuentra en forma silvestre en borde de riachuelos y zonas húmedas, formando la vegetación ribereña en la costa sierra y selva.(ANEXO N°02)

Brugmansia arborea (L) Lager "floripondio" es una de las especies más comunes en Colombia, con registros en Venezuela, Ecuador, Perú y Bolivia.

Es nativa de la cordillera de América del Sur y crece entre los 2500 y 3000 metros sobre el nivel del mar.¹³

2.2.2.2 Usos tradicionales

Se cultivan en parques y jardines con fines ornamentales por sus flores grandes, colgantes y vistosas. Esta planta tiene propiedades somníferas, alucinógenas y tóxicas por el contenido del alcaloide atropina. Los lugareños acostumbran colocar las hojas del floripondio debajo de la almohada de los niños para hacer dormir. No se recomienda el uso interno por ser tóxica. (ANEXO N°02)

Las hojas del floripondio se utilizan vulgarmente para combatir los dolores, sobre todo los cólicos intestinales, también se usa para calmar el dolor corporal, Se le emplea también contra diversos padecimientos en los que se hace uso de las hojas. Cuando se tiene dolor de cabeza, se aplican en las sienes, cataplasmas pequeños de hojas frescas untadas con ungüento o grasa; para aliviar las

postemillas o úlceras de las encías, se cuecen las hojas y machacadas se aplican en la parte afectada. Para desinflamar las paperas se usan las hojas solas o asadas ligeramente en aceite, se aplican tópicamente; contra el asma fuman el humo de las hojas. Para aliviar la tos y para curar los bronquios se untan en la espalda las flores maceradas.¹⁴

Se aplica externamente como un emplaste caliente para aliviar el dolor de huesos fracturados y otras heridas superficiales. También se usa por sus propiedades narcóticas, colocando flores debajo de la almohada para inducir el sueño, o alucinógenas tomando infusión de las flores.¹⁴

2.2.2.3 Composición química

La *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio” pertenecen a la familia de las solanáceas y contienen los mismos alcaloides que las Daturas: escopolamina, hioscamina, atropina y los variados alcaloides del grupo tropano. La escopolamina es la que aparece en mayor proporción. Las hojas, los tallos y las flores contienen un 0.3% de alcaloides, de los cuales el 80 % es escopolamina.¹⁵

2.2.2.4 Escopolamina

Es un alcaloide cuaternario que actúa como antagonista competitivo de la acetilcolina en los receptores muscarínicos. Es soluble en agua y entra al organismo por vía oral con rápida absorción. Es un antagonista competitivo de la acetilcolina en la terminal posganglionar del sistema nervioso parasimpático. No tiene ningún efecto sobre los receptores nicotínicos. Cruza la barrera hematoencefálica, por lo cual puede producir manifestaciones del sistema nervioso central. El efecto de esta sustancia es bastante marcado en el músculo liso del sistema gastrointestinal. Los síntomas ocurren entre los 30 y los 60 minutos después de la ingesta y pueden continuar por 24 ó 48 horas, debido a que la escopolamina retarda el vaciamiento gástrico. Tales incluyen: mucosas y piel secas, disfagia, fotofobia, visión borrosa, taquicardia, retención urinaria. También puede encontrarse hipertermia, confusión, agitación, convulsiones y coma. Es común la amnesia de los eventos sucedidos después de la ingesta de la escopolamina.¹⁴

2.2.2.5 Propiedades insecticida

La *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio” es reconocida popularmente en Boyacá y en otras regiones del país por sus efectos insecticidas, donde se realizaron investigación que demuestran esta acción respaldando el conocimiento popular que indica el uso de esta planta como insecticida. Por otra

parte y conociendo la forma de actuar de sus componentes, se puede inferir que la acción insecticida se genera por parálisis de la mosca, debida a la acción anticolinérgica ejercida por el bloqueo de los receptores colinérgicos en la placa neuromotora del insecto.^{7,8}

2.2.2.6 Propiedades alucinógenas

Las flores de *Brugmansia arborea* (L) Lager “floripondio” también posee efecto alucinógeno; se ingieren preparadas en tés. Sus efectos comienzan entre los 15 y los 30 minutos y duran hasta 72, aunque cada vez con menor intensidad. La escopolamina que contiene esta planta es un agente anti colinérgico que actúa bloqueando los receptores colinérgicos en el cerebro. En función de ello se deprimen los impulsos de las terminales nerviosas o, si la dosis ha sido elevada, se estimulan y posteriormente se deprimen.¹⁵

2.2.3 Toxicidad y genotoxicidad

2.2.3.1 Toxicidad

La toxicidad es la capacidad de una sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él. Tóxico es cualquier sustancia, artificial o natural, que posea toxicidad (es decir, cualquier sustancia que produzca un efecto dañino sobre los seres vivos al entrar en contacto con ellos).¹⁶

2.2.3.2 Genotoxicidad

La genotoxicidad es la capacidad relativa para causar daño al material genético por agentes físicos, químicos o biológicos. El daño en el material genético incluye no sólo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula. Ejemplos de esto último son las proteínas que intervienen en la reparación, condensación y descondensación del ADN en los cromosomas u otras estructuras como el huso mitótico, responsable de la distribución de los cromosomas durante la división celular. Este daño puede ser de tipo mutágeno o carcinógeno.^{17, 18}

Los agentes capaces de ocasionar toxicidad genética son llamados genotóxicos o xenobióticos y se clasifican en tres categorías de acuerdo a su origen: químicos, físicos y biológicos. La primera categoría está constituida por los compuestos químicos, la segunda incluye las radiaciones en todo su espectro y la última en algunos parásitos, bacterias, hongos, vegetales o incluso virus (aunque estos últimos no son considerados seres vivos, por lo que muchas

veces aparecen clasificados en una categoría aparte). La acción o capacidad de inducir daño de estos xenobióticos está influida por la dosis recibida y el tiempo o vía de exposición, junto a la constitución genética del individuo que puede definir una susceptibilidad propia o particular.¹⁸

Las pruebas de genotoxicidad se puede definir como pruebas *in vitro* e *in vivo*, diseñadas para detectar compuestos que induzcan daño genético, directa o indirectamente, por diversos mecanismos; son necesarios antes de que se produzca la exposición en el ser humano.¹⁹

2.2.3.3 Mecanismo de genotoxicidad

Las sustancias genotóxicas pueden unirse directamente al ADN o actuar indirectamente mediante la afectación de las enzimas involucradas en la replicación del ADN y causando en consecuencia mutaciones que pueden o no desembocar en un proceso canceroso.¹⁷

Los mutágenos y carcinógenos genotóxicos son compuestos electrófilos muy reactivos y con gran afinidad por el ADN, como los derivados de compuestos orgánicos nitrogenados o halogenados, epóxidos, lactonas o compuestos inorgánicos de níquel, cromo, uranio, etc.

Los genotóxicos pueden provocar mutaciones por cambios en algunos nucleótidos debidos a:²⁰

- Sustituciones en las bases: purinas por otras purinas, pirimidinas por otras pirimidinas o purinas por pirimidinas o viceversa.²⁰
- Sustitución de una base por una sustancia análoga originando un nucleótido inútil para la duplicación.
- Alteración química de las bases mediante oxidación, desaminación.
- Alquilación de la molécula del ADN incorporando grupos químicos a las bases, mediante enlaces covalentes, formando lo que se conocen como aductos.^{21,22}
- Desfases que consisten en la adición o delección de bases, modificando la pauta de lectura.

También, pueden provocar aberraciones cromosómicas como:

- Lesiones cromosómicas por rotura, delección, intercambio o reorganización del material cromosómico y translocaciones.
- Cambio en el número de cromosomas.²²

Tras la lesión producida en el ADN, la célula puede sufrir tres procesos:

- Impedimento de la replicación produciendo la muerte por apoptosis.

- Replicación con nucleótidos alterados, o con errores en la replicación del ADN, es decir, se trasmite una mutación. Esta mutación puede ocurrir en una célula somática dando por ejemplo un proceso canceroso o malformaciones congénitas en el recién nacido; o en una célula germinal produciendo una enfermedad hereditaria o generando en el individuo una mayor susceptibilidad de contraer determinadas enfermedades.²¹
- Reparación del daño en la molécula de ADN evitándose la mutación.¹⁹

En cuanto a los carcinógenos genotóxicos, actúan como iniciadores del proceso de carcinogénesis. Esta comienza con una mutación en una sola célula pudiendo ser a nivel del metabolismo del xenobiótico, haciendo que una sustancia procancerígena se convierta en cancerígena; en la reparación del ADN dificultándola o impidiéndola y/o estimulando la proliferación celular.²⁰ Este proceso se conoce como iniciación.¹⁹

Suelen ser sustancias químicas, como compuestos alquilantes (mostazas nitrogenadas), especies reactivas de oxígeno, aflatoxinas, productos de combustión, nitrosaminas, etc.²³ Su mecanismo de acción está basado en la formación de enlaces covalentes con el nitrógeno 7 de la guanina (aducto), produciéndose una mutación irreversible. Algunas características de ellos son:

- Activos a todas las dosis, no hay una dosis mínima umbral a partir de la cual se aprecie un efecto.
- Presentan una correlación estructura, actividad, pudiéndose detectar mediante ensayos experimentales.^{21,23}
- La mayoría se clasifican como procarcinógenos, es decir, requieren una biotransformación para reaccionar con el ADN, la cual se puede producir tanto en la Fase I como en la Fase II del metabolismo. Aquí podemos encontrar hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas, micotoxinas, etc.²³

2.2.4 Evaluación genotóxica

La genética toxicológica estudia los efectos mutagénicos de sustancias químicas y radiaciones, así como las consecuencias para la salud humana de la exposición a mutágenos, considerando como tal a cualquier agente que induzca mutaciones génicas (cambio de uno o pocos pares de bases), aberraciones cromosómicas estructurales (cambios en la estructura) o numéricas (aneuploidías y poliploidías por afecciones en los componentes del aparato mitótico o meiótico) o alteraciones al ADN (formación de aductos, alquilación de bases, intercalamiento de bases), a los mecanismos de reparación

(incrementando la sensibilidad a los efectos de muchos mutágenos), a los eventos de recombinación mitótica.²⁴

Las plantas medicinales no llevan una indicación metodológica especial para su evaluación genotóxica, por lo que deben ser sometidas a las mismas regulaciones que rigen los fármacos en general. La evaluación genotóxica de extractos de plantas medicinales deben ser realizadas en primera instancia, mediante ensayos *in vitro*, validados internacionalmente, que midan el daño en los niveles de mutaciones genéticas y cromosómicas.²⁵

En el mundo las guías o rutas críticas para los estudios genotóxicos persiguen como objetivo fundamental evidenciar qué tipo o a qué nivel de organización del ADN opera el daño causado por el compuesto evaluado. En concordancia con ello se reconocen cuatro niveles: mutación génica (nivel I), mutación cromosómica (nivel II), daño primario del ADN (nivel III), transformaciones celulares (nivel IV), entre otras alteraciones. Los ensayos pertenecientes a los dos primeros niveles son muy variados y ampliamente utilizados, en especial las pruebas *in vitro* que se caracterizan por tener una alta sensibilidad y precisión.³⁷

En los últimos años las pruebas para medir daño a nivel primario del ADN, han alcanzado gran importancia entre los análisis de genotoxicidad.²⁵

Si los resultados *in vitro* son negativos, debe continuarse, en segunda instancia, con ensayos *in vivo* que respondan a los mismos niveles de daño genético que se evaluaron *in vitro*. Una vez evaluados los niveles génico y cromosómico, con ensayos *in vitro* e *in vivo*, se deben incluir ensayos que midan daño primario al ADN y de acuerdo con el resultado obtenido, se debe tomar la decisión de realizar ensayos que midan otras alteraciones y carcinogenicidad. En cualquiera de los ensayos y niveles de daño evaluados se deben emplear protocolos estandarizados (validados internacionalmente) que tomen en consideración las dosis, el tipo de exposición y la vía de administración propuesta para el fármaco.²⁴

Con el fin de detectar en sus etapas iniciales la acción sobre el material genético se utilizan las siguientes determinaciones *in vitro* que son muy utilizadas en el campo de la investigación científica para detectar genotoxicidad inicial: aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas; micronúcleos, síntesis de ADN no programada y electroforesis de una célula (ensayo del cometa).²⁴

2.2.5 Electroforesis en gel

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas en una mezcla por aplicación de un campo eléctrico. Las moléculas disueltas se desplazan o migran en un campo eléctrico a una velocidad determinada por su relación carga y masa, si dos moléculas tienen masa y formas iguales, la de mayor carga neta se desplazará más rápido hacia un electrodo.²⁴

Cuando se dirige una molécula de ADN con una enzima de restricción apropiada, se corta en fragmentos específicos. Estos fragmentos se pueden separar en función de su tamaño, por medio de una electroforesis en gel. Para ello, el ADN cortado se coloca en un gel de agarosa o poliacrilamida. Cuando pasa una corriente eléctrica a través del gel, cada fragmento se desplaza hacia abajo con una velocidad proporcional al logaritmo de su peso molecular. El desplazamiento produce una serie de bandas. Cada banda corresponde a un fragmento de tamaño definido, que es de menor cuando más abajo está en el gel. La longitud de cualquier fragmento concreto se puede determinar calibrando el gel. Para ello, en otro carril del mismo gel se hace correr un control paralelo. El control es una mezcla de fragmentos patrón, que tiene tamaños conocidos y se llaman marcadores. La migración de los marcadores define la relación entre la longitud de fragmento y la distancia recorrida en el gel.²⁶

La electroforesis en gel es un modo conveniente de cuantificar el ADN y analizar su estado físico al mismo tiempo, se puede visualizar si existen contaminantes que pueden estar presentes en la muestra de ADN o si está degradado. Es la aplicación de las técnicas de separación de macromoléculas en un campo eléctrico en función de su tamaño y carga eléctrica superficial, se define como el método de separación de sustancias cargadas al aplicar un campo eléctrico, de modo que se diferencian en el comportamiento en un campo eléctrico. Aquellas partículas cargadas positivamente (cationes) migrarán hacia el cátodo y las cargadas negativamente (aniones) hacia el ánodo.²⁷

Entre las macromoléculas, las más utilizadas son las proteínas seguidas de los ácidos nucleicos, ya que ambos tipos presentan una carga importante, algo que no presentan los lípidos, sin contar con que son insolubles. El método consiste en inmovilizar las muestras en estudio en un material gelatinoso (gel). El gel se somete a una corriente eléctrica durante un período de tiempo determinado. Cada muestra comenzará a migrar a través de los poros del gel con una velocidad diferencial, que dependerá de la carga eléctrica y del tamaño

molecular. Cuando las separaciones se han completado se interrumpe el paso de corriente y las muestras separadas se tiñen para visualizarse. Cada muestra se encontrará a una distancia distinta respecto al origen.²⁷

Los ácidos nucleicos presentan carga y son solubles ya que tienen un grupo fosfato, parte que confiere la carga, y está presente de forma regular en la estructura. Los ácidos nucleicos tienen la capacidad de migrar en un campo eléctrico y por tanto, son susceptibles de ser separados por electroforesis. El gel se encuentra sumergido en un electrolito tamponado con tris-Borato (no glicina), para garantizar que los ácidos nucleicos estén cargados negativamente; por esto a la técnica se le denomina electroforesis de inmersión. Las moléculas migrarán hacia el polo positivo, de modo que viajarán en esa dirección por el gel, separándose por tamaño (nº de nucleótidos), a la hora de cargar la muestra se colocan unos marcadores de frente (6X loading dye) que nos permita detener la electroforesis en el momento que lo creamos oportuno. Para visualizar las bandas, hay que teñir el gel o marcar radiactivamente las moléculas. El método más utilizado en geles de agarosa es el bromuro de etidio, el cual se comporta como un agente intercalante, de modo que además de disminuir la densidad de la molécula, tiene la capacidad de emitir luz cuando se le excita con luz ultravioleta. Hay que tener cuidado con este compuesto ya que es altamente cancerígeno.²⁷

La electroforesis en gel es muy utilizada en la detección, control de pureza, caracterización, cuantificación (por comparación con controles) así como preparación y purificación (por extracción de bandas desde el gel) de moléculas y fragmentos de DNA y RNA. Tiene dos mecanismos de separación: la electroforesis, que separa por la relación carga/tamaño y el tamizado por el gel, que separa mayormente por tamaño. Los geles más comunes son agarosa y poliacrilamida.²⁷

2.2.6 Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son macromoléculas, incluso mayores que las proteínas y así tienen una amplia posibilidad para transmitir información en la forma de agrupamiento de grupos químicos con una complejidad comparable a la disposición de los aminoácidos en las proteínas.²⁸

Los ácidos nucleicos se forman cuando los nucleótidos se unen entre sí por medio de puentes diéster entre átomos de C3 de un nucleótido y el C5. La secuencia lineal de los nucleótidos generalmente se expresa en dirección 5' a 3'.²⁹

2.2.7 Ácido desoxirribonucleico (ADN o DNA)

El ADN o ácido desoxirribonucleico es el componente químico primario de los cromosomas y el material del que los genes están formados, es el almacén de la información” que cada individuo posee y que necesita para llevar a cabo todas sus funciones vitales.³⁰

La molécula de ADN está formada por dos largas cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una estructura en doble hélice. Las dos cadenas de nucleótidos que constituyen una molécula de ADN, se mantienen unidas entre sí por enlaces entre las bases nitrogenadas de ambas cadenas que quedan enfrentadas.³⁰

Los componentes del ADN (polímero) son los nucleótidos (monómeros); cada nucleótido está formado por un grupo de fosfato, una desoxirribosa y una base nitrogenada. Existen cuatro bases: dos purínicas denominadas adenina (A) y guanina (G) y dos pirimidicas denominadas citosina (C) y timina (T). La estructura en doble hélice del ADN, con el apareamiento de bases limitado (adenina con timina y guanina con citosina), implica que el orden o secuencia de bases de una de las cadenas delimita automáticamente el orden de la otra, por eso se dice que la cadenas son complementarias.³⁰

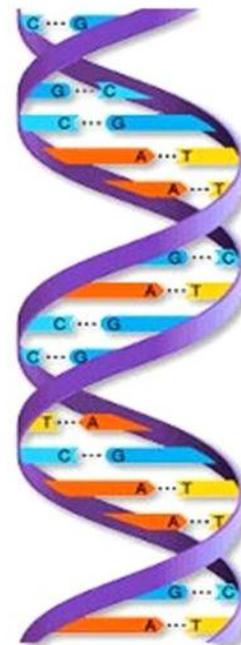
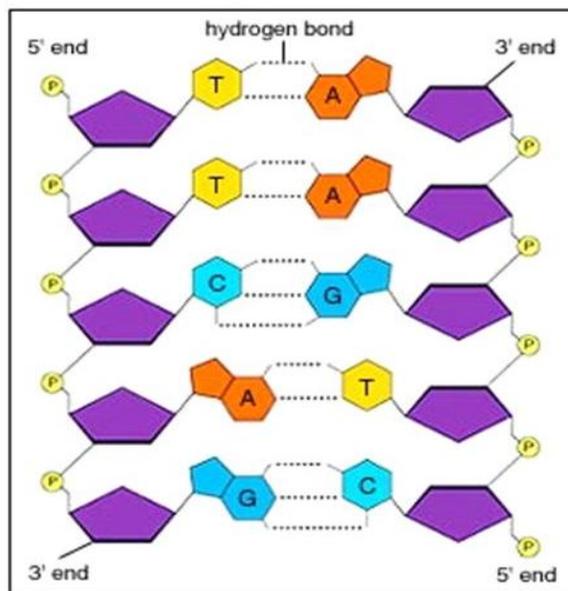


Figura 2. Estructura química de ADN

2.2.8 Extracción de ADN en sangre

Generalmente es deseable que la obtención de la muestra de ADN no cause ningún tipo de daño a la persona y que sea fácil y rápidamente obtenible. Estos

requisitos se cumplen en las muestras de sangre. Existen innumerables métodos que permiten obtener ADN a partir de sangre entera, estos difieren en la pureza y cantidad de muestra necesaria para realizar una extracción. La sangre se compone de varios tipos celulares, los más importantes son los glóbulos rojos y los glóbulos blancos. Los primeros carecen de núcleo pues lo pierden durante su maduración, por lo tanto no poseen ADN. Los glóbulos blancos, en cambio, poseen núcleo y por tanto ADN. Entonces para obtener ADN a partir de muestras de sangre sólo son necesarios los leucocitos. Si bien, en un principio se purificaban primero los glóbulos blancos para luego extraer ADN a partir de ellos, el posterior avance de la técnica permite hoy en día extraer ADN a partir de sangre entera con la misma pureza, sumando rapidez y sencillez.³¹

2.2.9 Espectrofotometría

La capacidad que tiene el ADN de absorber luz a una determinada longitud de onda (260 nm) permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico de la muestra. Si la densidad óptica (OD) es 1, corresponde a aproximadamente 50 µg/ml de cadena doble de ADN, entonces calculamos la concentración de ADN que tenemos en nuestras muestras, midiendo simplemente su absorbancia, sin necesidad de realizar una curva patrón.³² Las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 (principalmente por residuos de triptófano), así las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existen algún contaminante proteico. El cálculo de una relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm es una manera común para hacer un estimado de la pureza o evaluar la contaminación de una preparación de ADN con proteínas de ácido nucleico, esta relación debe estar entre los valores de 1,8 y 2,0. Si la muestra es pura, el primer método comúnmente usado para la a espectrofotometría.³²

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

Miranda³³, formuló un método para determinar el efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales y/o productos fitoterapéuticos frente a ADN genómico. Es necesario conocer ¿qué órgano de la planta? tallos, flores, hojas, frutos y/o semillas son usadas para preparar los remedios caseros y obtener el extracto de la misma, que puede ser acuoso, hidroalcohólico o con otro solvente orgánico; si se va estudiar el látex, se recomienda obtenerla directamente de la planta.

Preparar soluciones del extracto a diferentes concentraciones: 1 mg/mL, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL; en caso del látex preparar diluciones a concentraciones de 1%, 2.5%, 5%, 10%, 25%, 50% y 100 %. Por otro lado, obtener ADN genómico del organismo en estudio: humano,

animal o microbiano, mediante extracción orgánica o kit comercial, procurando que el ADN sea íntegro, no fragmentado; seguidamente preparar un stock de 200 μL a concentración de 1,500 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Para la evaluación de la genotoxicidad *in vitro* mediante la fragmentación del ADN, etiquetar una batería de 10 tubos de 500 μL ; depositar 14 μL de ADN del stock en los tubos N° 1 al 7, luego agregar 6 μL de cada una de las concentraciones del extracto o látex a los tubos correspondientes de 1 al 7; el tubo N° 8 se usa como “blanco”, depositando 14 μL de extracto a 100% o látex a 100% más 6 μL de agua bidestilada; el tubo N° 9 se usa como “control”, colocando 14 μL de ADN más 6 μL de agua bidestilada; el tubo N° 10 se usa como “descarte de nucleasas”, colocando 14 μL de ADN más 6 μL de extracto a 100% o látex a 100%, más 6 μL de la enzima proteinasa K. Cada batería de tubos incubar en baño María a 37°C durante una hora y de ser necesario hasta cuatro horas. Estos productos del ensayo, además de un marcador de tamaño molecular (50 pb), se someten a electroforesis a 40 voltios durante tres horas en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1%, luego se visualizará en radiación de luz ultra violeta y se tomar el registro fotográfico. Estos registros fotográficos, revelan la actividad genotóxica mediante fragmentación del ADN de las siete concentraciones ensayadas; el “blanco” sirve para verificar que no exista ADN contaminante en el extracto o látex; el “control” se usa para comparar la cantidad de ADN sin tratamiento, respecto a los siete tubos que recibieron tratamiento; y el “descarte de nucleasas” para corroborar el efecto por acción de los metabolitos secundarios, mas no por la actividad de nucleasas, debido a que ellas serían destruidas por acción de la proteinasa K en el periodo de incubación. El grado de fragmentación se compara por porcentaje, llevando a una escala numérica de cero a cuatro. Se concluye que el método Tomasevich, es eficaz y eficiente para determinar genotoxicidad de las plantas medicinales mediante fragmentación de ADN.

2.2.11 Ensayo cometa (EC)

Es un biomarcador rápido, simple, visual y sensible, conocido como electroforesis unicelular alcalina, que se utiliza para medir y analizar rupturas en el ADN. Detecta diferencias intracelulares y daño en los procesos de reparación de virtualmente todas las células. La capacidad de migración del ADN depende de la cantidad de rompimientos producidos por el agente en cuestión de esta manera cada célula lesionada tiene la apariencia de un cometa con una cabeza

y una cola brillante y fluorescente; las células que no han sido dañadas aparecen con núcleos intactos, sin cola.³⁴

Existen muchas versiones del ensayo cometa que se aplican constantemente en diferentes laboratorios a nivel mundial; la metodología general y estándar fue descrita por Ostling y Johanson en 1984 y luego reformada por Singh *et al.* En 1988, sin embargo actualmente, se han dado a conocer distintas modificaciones a la técnica dependiendo de los intereses de estudio de algunos grupos de investigación.³⁵

2.2.11.1 Ventajas del Ensayo Cometa

El ensayo cometa o electroforesis de una sola célula provee ciertas ventajas ante otras pruebas que evalúan el daño genotóxico por efecto. En este test los datos son colectados a nivel de células individuales, proveyendo información de la distribución intercelular del daño y de la reparación. Así mismo se requiere sólo pequeños números de células para ser llevado a cabo y virtualmente cualquier población de células eucariotas puede ser utilizada en el proceso.³⁰ Por medio de este ensayo es posible evaluar el daño en células no proliferativas, lo que representa también un gran beneficio sobre otras técnicas que si lo requieren.³⁶

En la electroforesis de una sola célula además se ha reportado mayor sensibilidad de detección de daño con respecto a otras pruebas de citogenética clásica. Estudios comparativos en donde se evalúan los efectos genotóxicos de la radiación por rayos X en linfocitos humanos, establecen que el daño se incrementa con las dosis de radiación proporcionadas a la muestra tanto en el test de micronúcleos como en el ensayo cometa, sin embargo la sensibilidad del ensayo cometa es significativamente superior, puesto que el daño es detectado incluso a bajas exposiciones. El ensayo del cometa alcalino es considerado también en otros estudios comparativos de carácter farmacéutico para la evaluación de nuevas drogas, junto con la prueba de aberraciones cromosómicas, mostrando un alto grado de valor predictivo.³⁷

A nivel general este test de genotoxicidad es bastante flexible permitiendo la detección de un amplio rango de daños que pueden ocasionarse en el ADN y consta de un proceso sencillo y de rápida ejecución, por lo que es posible la obtención de resultados el mismo día en que se ha tomado la muestra y se ha realizado el protocolo.³⁷

2.2.11.2 Desventajas del Ensayo Cometa

A pesar de que la técnica ha sido ampliamente empleada y aceptada a nivel mundial, existen algunas desventajas en su proceso de evaluación. La primera de ellas hace referencia al estricto manejo y preparación de los reactivos y el número de variables que pueden afectar un óptimo desarrollo, pues cualquier alteración en la concentración de la agarosa, el estado de las distintas soluciones de trabajo, el pH, la temperatura y los tiempos de cada paso, pueden cambiar drásticamente el resultado a analizar debido a la alta sensibilidad de la técnica. La segunda desventaja y la más nombrada, hace referencia a la falta de estandarización en el análisis de las muestras y la representación de los datos que se obtienen en los estudios, ya que aunque muchos investigadores abarcan el tema, proponen constantemente nuevas formas de valoración, sin definir un único proceso de evaluación que permita la comparación entre laboratorios.³⁸

2.2.11.3 Aplicaciones

El ensayo cometa es una de las técnicas más empleadas en la actualidad dentro del área de la genética toxicológica. Por su método económico, rápido y efectivo, es empleado en el estudio de seguimiento a exposiciones medio ambientales y ocupacionales de poblaciones humanas. En las disciplinas medioambientales, por ejemplo, se han realizado estudios del impacto de genotóxicos en medios acuáticos usando como modelo biológico distintas especies de peces. Así mismo en el área clínica, se han adelantado estudios de Farmacovigilancia de distintas drogas de genotoxicidad de productos químicos de los que hacen parte incluso el empleo de determinados tipos de resina en la salud oral;³³ y estudios sobre mutágenos de línea germinal.³⁹

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo entre los meses de setiembre de 2017 a febrero de 2018, la identificación taxonómica fue realizada por la Blga Laura Aucasime (Anexo N° 1 y 2); la obtención del extracto hidroalcohólico de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio” y ensayos fitoquímicos se realizaron en el laboratorio de Farmacognosia de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; la obtención de ADN genómico humano y los ensayos de genotoxicidad se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática (C.I.B.M.B.) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH).

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

Brugmansia arbórea (L) Lager “floripondio”, que crece en los pisos ecológicos de la provincia de Huamanga, región Ayacucho, Perú.

3.2.2 Muestra

- 100 gramos de flores frescas y sanas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio”.
- 02 kilogramos de hojas frescas y sanas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio”.

3.2.3 Muestreo

El muestreo se realizó por conveniencia (muestreo aleatorio simple).^{40,41}

3.3 Unidad experimental

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

3.4 Metodología y recolección de datos

3.4.1 Recolección de la muestra

Las flores y hojas fueron recolectadas en el distrito de Jesús Nazareno, provincia de Huamanga de la región Ayacucho, en horas de la mañana, Las hojas fueron

inmediatamente transportadas al Laboratorio de Farmacognosia, donde fueron secadas a temperatura ambiente bajo sombra previamente acondicionada, teniendo como base papel Kraft que fue cambiada constantemente y volteando la muestra para un secado uniforme, evitando el deterioro por la humedad y separando aquellas que cambien de color o muestren signos de alteración. Para la identificación taxonómica se emplearon muestras con flores y hojas lo que corresponde a la planta en estudio, lo cual se realizó en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas por la Blga. Laura Aucasime Medina (Anexo 1 y 2).

3.4.2 Obtención del zumo de las flores frescas y extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio”.

Para obtener el zumo, se utilizó flores frescas y en buenas condiciones de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio”, fueron trituradas en un mortero de porcelana previamente esterilizado en autoclave, con la finalidad de reducir hasta una masa homogénea y se procedió a filtrar en gaza estéril y luego en papel filtro estéril, ejerciendo cierta presión, para obtener el filtrado, con el cual se realizó la determinación cualitativa fitoquímica y también se prepararon las variadas concentraciones para los ensayos genotóxicos. (Anexo 3 y 4)

Una vez secada la muestra de las hojas, se trituró empleando un mortero, con la finalidad de reducir hasta un polvo fino y se procedió a realizar la preparación de los extractos hidroalcohólico. Se pesó 100 g de muestra seca y pulverizada, luego se maceró en un frasco de vidrio color ámbar por 7 días, para ello se utilizó etanol y agua destilada (3:1) hasta cubrir la muestra por 1 cm de diferencia. Durante el proceso se agitó el frasco durante 15 minutos dos veces al día durante los 7 días de la maceración para que el etanol se distribuya homogéneamente en la muestra. La muestra en maceración se conservó en un lugar fresco y oscuro. Luego se procedió a filtrar con ayuda de una bomba al vacío y papel filtro, finalmente se llevó a un evaporador rotatorio BUCHI-3000 a presión reducida y luego se concentró a sequedad en una estufa MEMMERT, a partir de las cuales se realizó la determinación cualitativa y también se prepararon las diferentes concentraciones para el efecto genotóxico. (Anexo 3 y 5)

Una muestra del extracto hidroalcohólico de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio” (100mg/mL) se sometió a un control de calidad de esterilidad, siendo sembradas en placas de Petri con agar Mueller Hinton, e incubadas a 37

°C durante 24 horas, verificándose que no exista desarrollo de colonias microbianas, para certificar que los extractos no están contaminados.

3.4.3 Tamizaje fitoquímico de zumo de la flores y extracto hidroalcohólico de hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio”.

Se realizó una marcha fitoquímica cualitativa al zumo de flores frescas y extracto hidroalcohólico de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio”, para identificar los diferentes metabolitos secundarios. Las reacciones de identificación se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Miranda⁴¹ Lock⁴³ (Anexo 6)

3.4.4 Extracción de ADN genómico a partir de sangre humana

Se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática, contando con una unidad de bolsa colectora de sangre “cuádruple” fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos (para el desecho); la misma que se consiguió por donación del Banco de Sangre del Hospital Regional de Ayacucho “Miguel Ángel Mariscal Llerena”, que se utilizó para la obtención del ADN de glóbulos blancos con el protocolo descrito en Miranda.⁴⁴

Procedimiento

- Se transfirió 1 ml de sangre de un tubo de centrifuga con tapa y se adicionó 9 ml del tampón Tris– HCl 50 mM (pH 7.7).precalentado a 37 °C.
- Se homogenizó y se incubó a 37 ° C por 30 minutos, se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos para sedimentar los linfocitos.
- Se descartó el sobrenadante aspirándolo con una pipeta Pasteur dejando 1 ml del centrifugado en la parte inferior del tubo.
- Se repitió los procedimientos 3 (esta vez con 5 ml de tampón Tris – HCl 50 mM (pH 7.7), 4 y 5 hasta tener un preparado claro.
- Se adicionó 1 ml de centrifugado, 9 ml de solución salina (NaCl al 0.85%) se homogenizó y se centrifugó a 2500 rpm/ 10 minutos.
- Se aspiró y se descartó el sobrenadante dejando solo el sedimento, se resuspendió el sedimento en 0.5 ml de la solución HIGH TE (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 100 mM). Se resuspendió el sedimento y se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 2 ml
- Se adicionó 0.5 ml de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 40 mM; SDS al 1%; NaCl 10 mM).precalentada a 50 °C.
- Se adicionó 10 µL de la solución de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó por una noche a 53 °C.

- Se adicionó 1 ml de la solución Fenol saturado con Tris: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1). Y se homogenizó por inversión delicadamente durante 10 minutos.
- Se centrifugó en la microcentrífuga por 10 minutos para separar las fases, luego aspirar la fase superior acuosa que contiene el DNA y se transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2 ml.
- Se adicionó a la fase acuosa 1 ml de la solución de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1) y se homogenizó por inversión durante 5 minutos. Se centrifugó en la microcentrífuga por 10 minutos. Se aspiró la fase acuosa que contiene el DNA y se transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2 ml.
- Se repitió el procedimiento anterior hasta obtener una fase acuosa completamente clara.
- Se adicionó un volumen de alcohol isopropílico helado y se dejó en reposo por 1 hora en hielo. Luego se centrifugó en la microcentrífuga por 15 minutos.
- Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se enjuagó el sedimento con 1 ml de etanol al 70%.
- Se centrifugó en la microcentrífuga por 10 min. Se eliminó el alcohol y se dejó secar el sedimento a medio ambiente.
- Se resuspendió el sedimento con 300 ul de la solución low TE (Tris HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM y se guardó en la nevera.

3.4.5 Ensayo de genotoxicidad *in vitro*

Se desarrolló siguiendo los protocolos descritos en Miranda^{42,9,10,11} con las siguientes fases:

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

Se realizó una cuantificación por espectrofotometría UV en Eppendorf BioPhotometer plus del ADN genómico humano obtenido, se llevó esto a una concentración de 1500 ng/ul en un volumen final de 200 ul para la planta medicinal en estudio, para cada ensayo.

3.4.5.2 Fase de ensayo de genotoxicidad *in vitro* del zumo de las flores frescas y extracto hidroalcohólico de hojas de *Brugmansia arborea* (L) Lager “floripondio”, sobre el ADN genómico humano.

A partir del zumo de la flor fresca de *Brugmansia arborea* (L) Lager “floripondio”, se procedió a preparar las soluciones a concentraciones de 5%, 10%, 25%, 50% y 100%, utilizando agua bidestilada estéril como solvente.(Anexo 7)

Se acondicionó las mezclas para los ensayos de genotoxicidad *in vitro* de ADN genómico, de acuerdo al detalle siguiente:

Tabla 1. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad *in vitro* de zumo de las flores fresca de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio” sobre ADN genómico humano.

Condiciones	Mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>							
N° de tubo	1	2	3	4	5	6 Blanco	7 Control	8 C/PK
Stock de AND (1 500 ng/μL)	14	14	14	14	14	-	14	14
Volumen en μL								
Zumo (%)	5	10	25	50	100	100	-	100
Zumo (μL)	6	6	6	6	6	20	-	6
Proteinasa K	-	-	-	-	-	-	-	6
Volumen total (μL)	20	20	20	20	20	20	20	26
Incubación en baño María a 37 °C	1 hora							

Leyenda: PK (Proteinasa K)

A partir del extracto hidroalcohólico obtenido de las hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio”, se procedió a preparar las soluciones a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL; posteriormente a 200 mg/mL, 300 mg/mL, 400 mg/mL y 500 mg/mL, utilizando agua bidestilada estéril como solvente. (Anexo 8)

Se acondicionó las mezclas para los ensayos de genotoxicidad *in vitro* de ADN genómico, de acuerdo al detalle siguiente:

Tabla 2. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad *in vitro* de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio” sobre ADN genómico humano.

Condiciones	Mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>							
N°de tubo	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 hidroalcohólico de las hojas (mg/mL)	5	10	25	50	100	100	-	100
Extracto hidroalcohólico de las hojas (μL)	6	6	6	6	6	20	-	6
Proteinasa K	-	-	-	-	-	-	-	6
Volumen total (μL)	20	20	20	20	20	20	14	26
Incubación en baño María a 37 °C	1 hora							

Leyenda: PK (Proteinasa K)

Tabla 3. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad *in vitro* de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio” sobre ADN genómico humano.

Condiciones	Mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>							
	N° de tubo	1	2	3	4	5 Blanco	6 Control	7 PK
Stock de ADN (1 500 ng/μL)		14	14	14	14	-	14	14
Volumen en μL								
Extracto (mg/ml)		200	300	400	500	500	-	500
hidroalcohólico (μL)		6	6	6	6	20	-	6
Proteinasa K		-	-	-	-	-	-	6
Volumen total (μL)		20	20	20	20	20	20	26
Incubación en baño María a 37 °C						1 hora		

Leyenda: PK (Proteinasa K)

3.4.6 Fase de electroforesis

Se preparó el gel de agarosa a 1% y se dispuso en una cámara de electroforesis Biometra. Para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa, se utilizó las cantidades descritas en la siguiente tabla: (Anexo 11 y 13)

Tabla 4. Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN genómico humano, con el zumo de las flores frescas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio”, para el ensayo de genotoxicidad *in vitro*. Ayacucho 2017. (Anexo 9)

Condiciones	Volúmenes de carga para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>									
	N° de carril del gel	1	2	3	3	4	5	6	7	8
zumo (%)	Marcador molecular	5	10	25	50	100	Blanco	Control	C/PK	
zumo (μL)		3	8	8	8	8	8	8	8	8
Loading (μL) (azúl de bromofenol, xialenoxialen, orange G)		2	2	2	2	2	2	2	2	2
Volumen total (μL)		5	10	10	10	10	10	10	10	10

Leyenda: C/PK (Digestión con proteinasa K)

Tabla 5. Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN genómico humano, con el extracto hidroalcohólico del *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio”, para el ensayo de genotoxicidad *in vitro*. Ayacucho 2017. (Anexo 10)

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
Muestra	(mg/mL)	Marcador molecular	5	10	25	50	100	Blanco	Control	C/PK
	(µL)		5	8	8	8	8	8	8	8
	Loading (µL) (azúl de bromofenol, xialenoxialen, orange G)		2	2	2	2	2	2	2	2
	Volumen total (µL)		7	10	10	10	10	10	10	10

Tabla 6. Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN genómico humano, con el extracto hidroalcohólico del *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio”, para el ensayo de genotoxicidad *in vitro*. Ayacucho 2017. (Anexo 10)

Condiciones		Volúmenes de carga para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>						
Nº de carril del gel		1	2	3	4	5	6	7
Muestra	(mg/mL)	Marcador molecular	200	300	400	500	Blanco	Control
	(µL)		3	8	8	8	8	8
	Loading (µL) (azúl de bromofenol, xialenoxialen, orange G)		2	2	2	2	2	2
	Volumen total (µL)		5	10	10	10	10	10

Luego se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se programó a 30 voltios (V) para tres horas de corrida.

3.4.7 Fase de lectura por radiación UV

Luego del tiempo de corrido electroforético, se sumergió el gel de agarosa en una solución de bromuro de etidio al 1% durante quince minutos aproximadamente, se enjuagó con abundante agua destilada dos veces y para visualizar las bandas y/o fragmentos de ADN productos de la genotoxicidad, se colocó el gel de agarosa en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra *UVsolo TS*. (Anexo 12)

Adicionalmente se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; en ambos casos para visualizar las bandas de ADN a diferentes concentraciones.

3.4.8 Fase de interpretación y clasificación del registro visual de genotoxicidad

La escala de los valores numéricos correspondientes a los niveles de fragmentación del ADN como producto de la genotoxicidad, visualizados en el registro fotográfico, fueron basados en la clasificación del “ensayo cometa” propuesto por Speit (1995) y Collins (2004), en tesis de Mónica Marisol Larrea Poma.⁴⁵

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

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

Fuente: Larrea Poma M, 2007

3.5 Tipo de investigación

Básico-experimental.

3.5.1 Diseño de investigación

Tabla 8. Diseño de investigación

GRUPO	TIEMPO DE INCUBACIÓN	TRATAMIENTO	OBSERVACIÓN
G ₁	1 hora	control	O ₁
		blanco	O ₂
		5 mg/mL	O ₃
		10 mg/mL	O ₄
		25 mg/mL	O ₅
		50 mg/mL	O ₆
		100 mg/mL	O ₇
		200 mg/mL	O ₈
		300 mg/mL	O ₉
		400 mg/mL	O ₁₀
G ₂	1 hora	500 mg/mL	O ₁₁
		pk	O ₁₂
		control	O ₁₃
		blanco	O ₁₄
		5%	O ₁₅
		10%	O ₁₆
		25%	O ₁₇
		50%	O ₁₈
		100%	O ₁₉
		pk	O ₁₉

Se realizaron cuatro repeticiones de cada ensayo.

3.6 Análisis de datos estadísticos

Los datos obtenidos fueron agrupados y presentados en tablas, expresado en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. El daño genotóxico se evaluó mediante el paquete estadístico SPSS versión 23, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis para muestras no paramétricas. El valor de $p < 0,05$ será considerado como el nivel estadísticamente significativo.⁴¹

IV. RESULTADOS

Tabla 9. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas y zumo de las flores de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio”. Ayacucho, 2018.(Anexo 6)

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados		Observaciones
		Zumo de flores	Extracto hidroalcohólico de hojas	
Alcaloides	Dragendorff	+++	+++	Hay formación de precipitado en todas las reacciones.
	Mayer	+++	+++	
	Wagner	+++	+++	
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	+	+	Formación de una coloración roja Hay una coloración amarilla,
Flavonoides	Shinoda	+	+++	naranja, carmelita o rojo en la fase amílica.
Quinonas	Borntrager	Negativo	+	Escaso color rojizo o rosada en la fase amoniacal.
Catequinas	Catequinas	Negativo	++	Coloración verde carmelita a luz UV, indica un ensayo positivo.
Saponinas	Espuma	++	Negativo	Formación de espuma al superficie.
Azúcares reductoras	Benedict	++	+	Formación de precipitado rojo ladrillo.
Taninos y Fenoles	Cloruro Férrico	+	+++	Formación de una coloración negruzca.
Aminas (aminoácidos)	Ninhidrina	++	+++	Coloración violeta
Cardenolidos	Kedde	Negativo	Negativo	No hay coloración violácea.

Leyenda:

- (+) : Leve
- (++) : Moderada
- (+++): Abundante

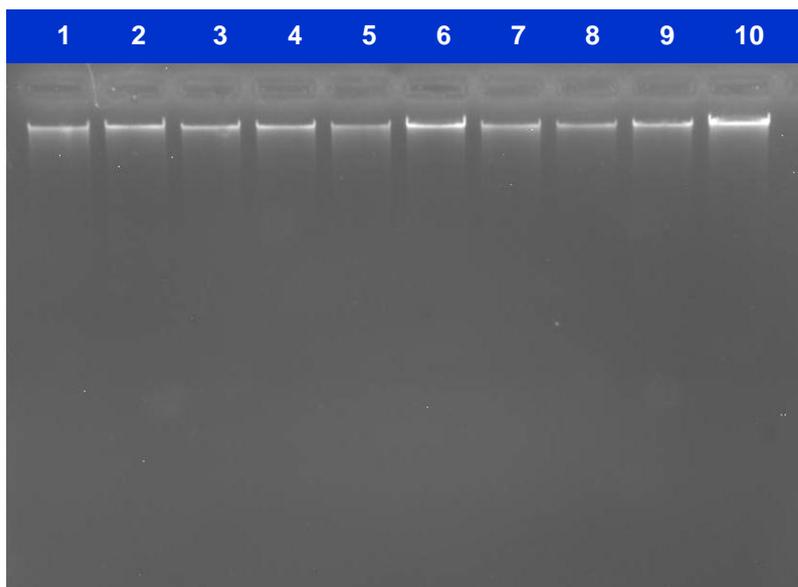


Figura 3. Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico humano, obtenido de seis muestras y coloreado con bromuro de etidio. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.

Leyenda:

Volumen de carga: Muestra 8 μ L + loading 6X 2 μ L PCR.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante una hora.

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

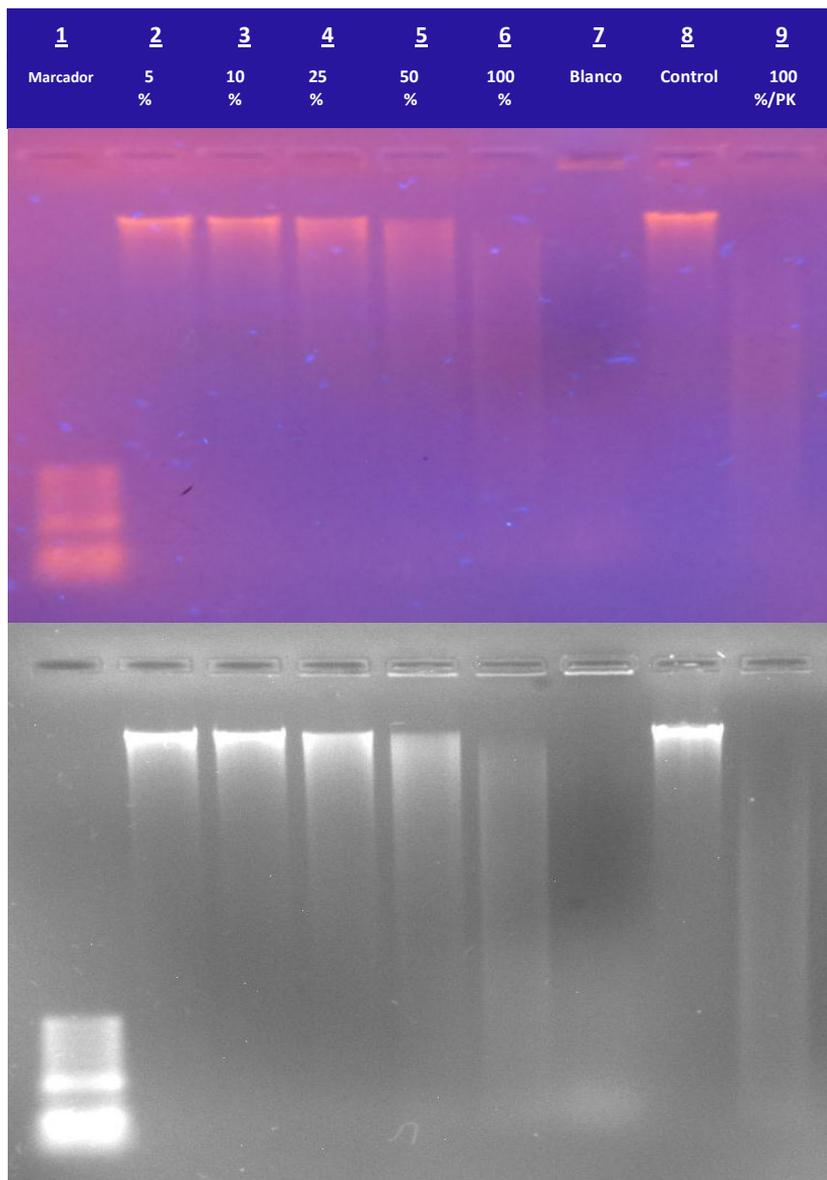


Figura 4. Ensayo genotóxico *in vitro* del zumo de la flor fresca de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 5%, 10%, 25%, 50% y 100%, frente a ADN genómico humano incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.

Leyenda:

Carril N° 1: Marcador de peso molecular

Carril N° 2: Con 5%

Carril N° 3: Con 10%

Carril N° 3: Con 25%

Carril N° 4: Con 50%

Carril N° 5: Con 100%

Carril N° 6: Con 100% de zumo (blanco).

Carril N° 7: Con 100% de ADN puro (control).

Carril N° 8: Con 100% de zumo + proteinasa K

Volumen de carga: Muestra (8 µL) + loading (2µL) = 10 µL.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante 3 horas.

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

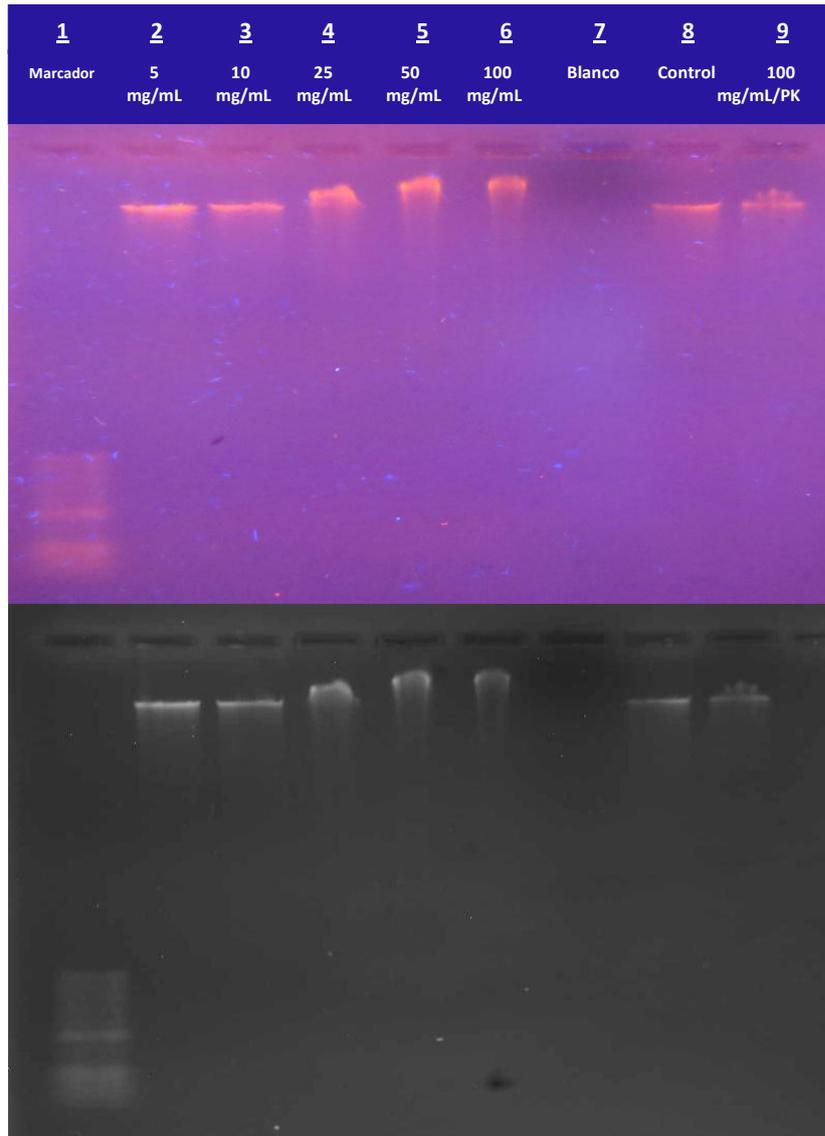


Figura 5. Ensayo genotóxico *in vitro* del extracto extracto hidroalcohólico de hojas del *Brugmansia arborea* (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, frente a ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.- UNSCH. Ayacucho 2017.

Leyenda:

Carril N° 1: Marcador de Peso molecular

Carril N° 2: Con 5mg/mL

Carril N° 3: Con 10mg/mL

Carril N° 4: Con 25mg/mL

Carril N° 5: Con 50mg/mL

Carril N° 5: Con 100mg/mL

Carril N°6: Con 100mg/mL extracto hidroalcohólico (blanco)

Carril N° 7: Con 100% de ADN puro (control).

Carril N°8: Con100mg/mL extracto hidroalcohólico + proteinasa K

Volumen de carga: Muestra (8 µL) + loading (2 µL) + PCR = 10 µL.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante 3 horas.

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

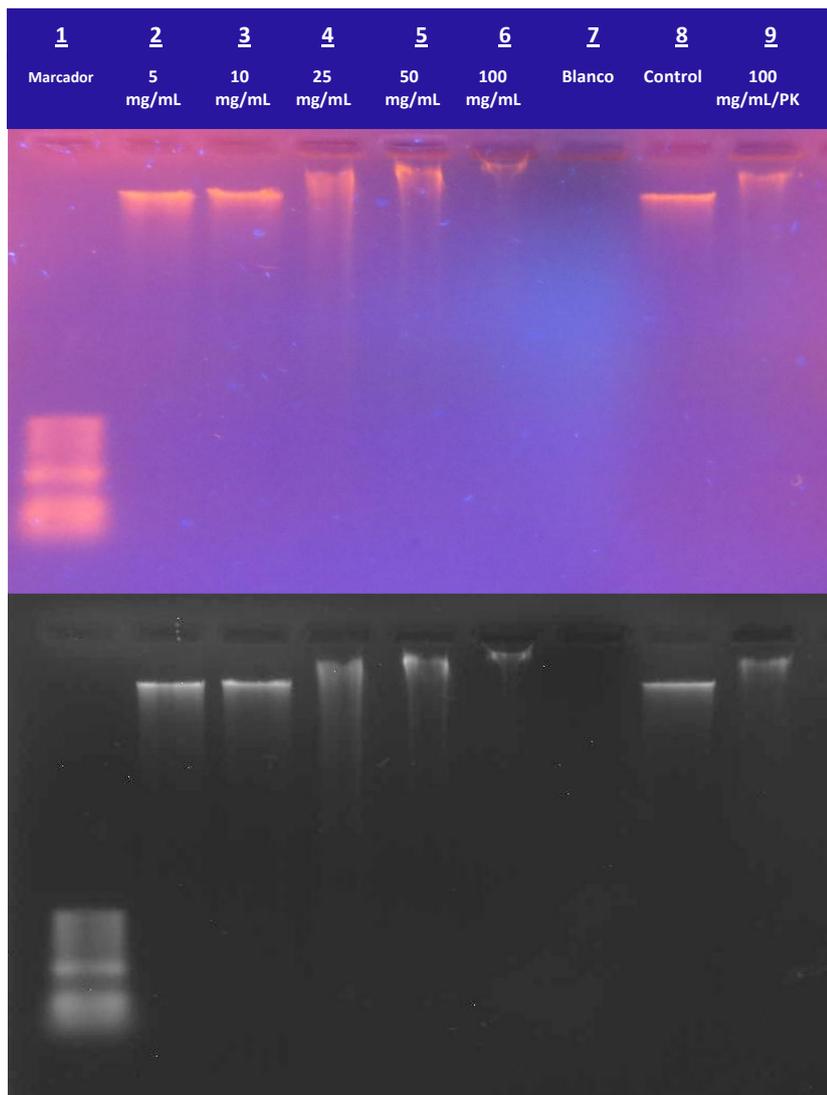


Figura 6. Ensayo genotóxico *in vitro* del extracto extracto hidroalcohólico de hojas del *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, frente a ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.

Leyenda:

Carril N° 1: Marcador de Peso molecular

Carril N° 2: Con 5mg/mL

Carril N° 3: Con 10mg/mL

Carril N° 4: Con 25mg/mL

Carril N° 5: Con 50mg/mL

Carril N° 5: Con 100mg/mL

Carril N°6: Con 100mg/mL extracto hidroalcohólico (blanco)

Carril N° 7: Con 100% de ADN puro (control).

Carril N°8: Con 100mg/mL extracto hidroalcohólico + proteinasa K

Volumen de carga: Muestra (8 μ L) + loading (2 μ L) + PCR = 10 μ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante 3 horas.

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

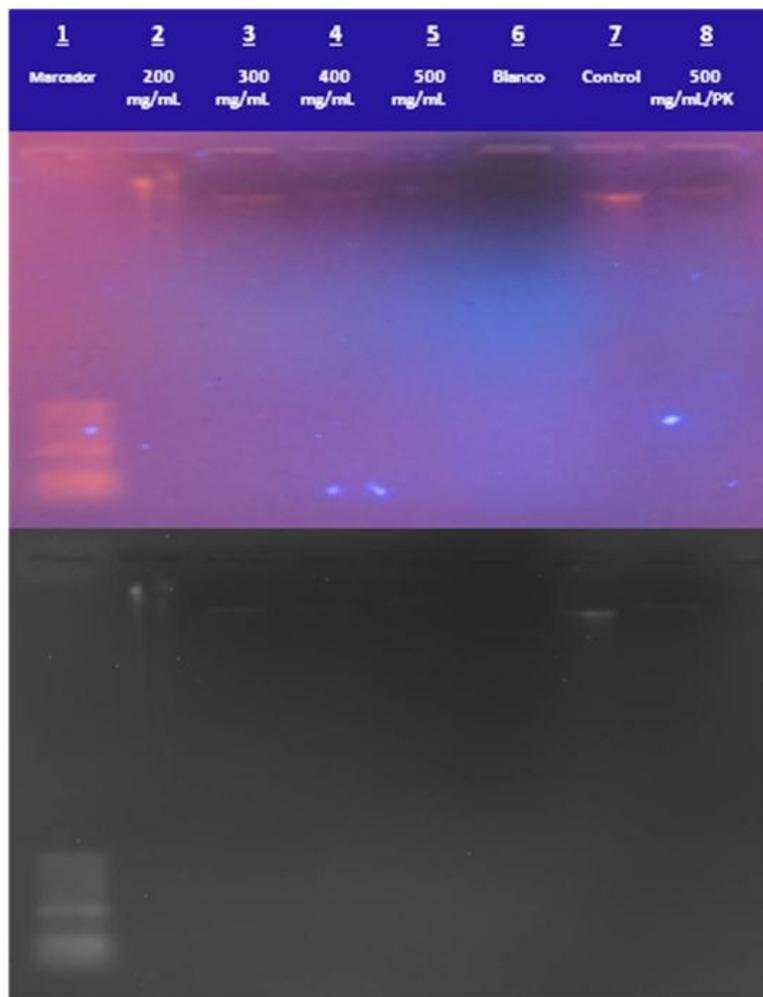


Figura 7. Ensayo genotóxico *in vitro* del extracto extracto hidroalcohólico de hojas del *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente a ADN genómico humano incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.

Leyenda:

Carril N° 1: Marcador de peso molecular

Carril N° 2: Con 200 mg/mL

Carril N° 3: Con 300 mg/mL

Carril N° 4: Con 400 mg/mL

Carril N° 5: Con 500 mg/mL

Carril N° 6: Con 500 mg/mL de extracto etanólico (blanco).

Carril N° 7: Con 100% de ADN puro (control).

Carril N° 8: Con 500 mg/mL extracto etanólico + proteinasa K

Volumen de carga: Muestra (8 µL) + loading (2 µL) = 10 µL.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante 3 horas.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos.

Tabla 10. Valores numéricos del ensayo genotóxico *in vitro* del zumo de las flores frescas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 5%, 10%, 25%, 50% y 100%, frente a ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.

Condiciones de la incubación		<i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”				
		Zumo de la flor fresca.				
		Concentración en %				
Temperatura °C	Tiempo Hora	5	10	25	50	100
37	1	0	1	4	4	4
		0	0	4	4	4
		0	1	4	4	4
		0	0	4	4	4
		0	0	4	4	4

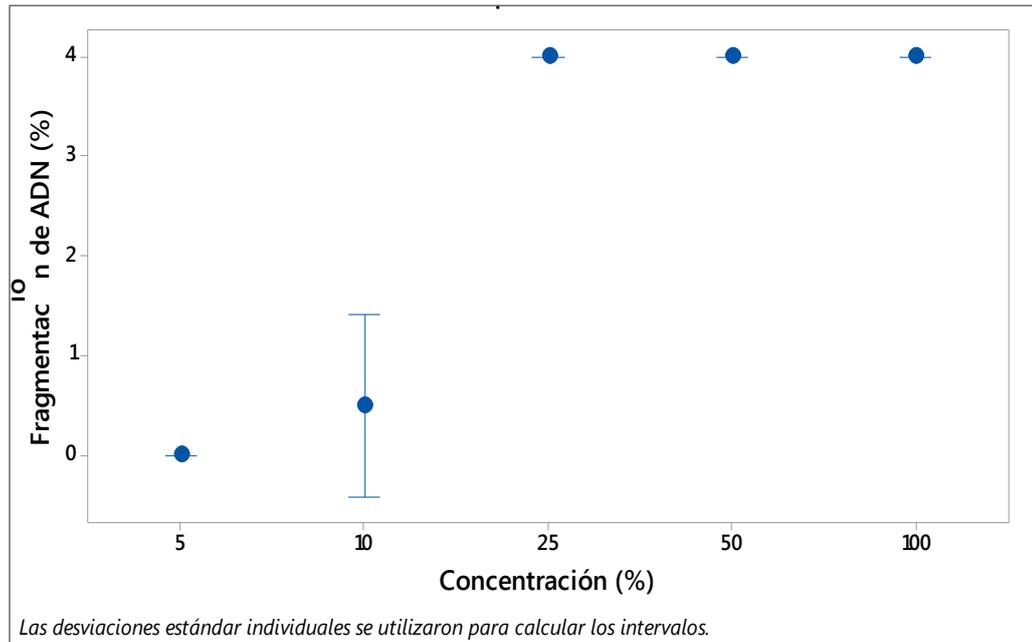


Figura 8. Prueba de Kruskal-Wallis ($H=18,4$, $GL=4$, $P=0.001$): para determinar el grado de genotoxicidad *in vitro* del zumo de las flores frescas de *Brugmansia arborea* (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 5%, 10%, 25%, 50% y 100%, frente a ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017

Leyenda:
 $P = 1 \times 10^{-4}$

Tabla 11. Valores numéricos del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente a ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.

Condiciones de la incubación		<i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio” Extracto hidroalcohólico de hojas secas.								
Temperatura °C	Tiempo Horas	Concentración en mg/mL.								
		5	10	25	50	100	200	300	400	500
37	1	0	0	2	3	4	4	4	4	4
		0	0	2	3	4	4	4	4	4
		0	0	2	3	3	4	4	4	4
		0	0	2	3	4	4	4	4	4

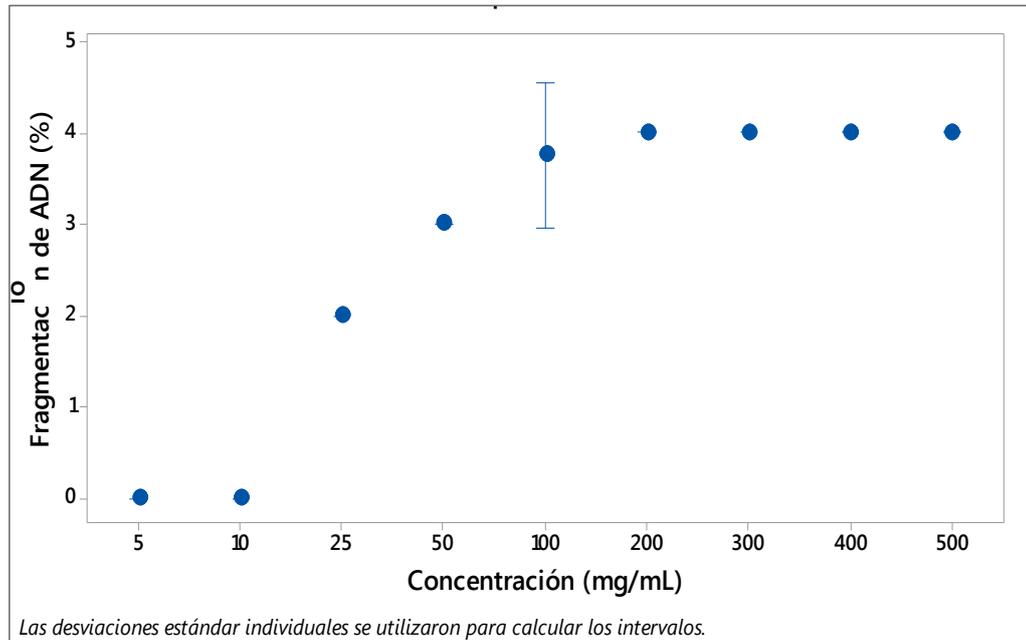


Figura 9. Prueba de Kruskal-Wallis ($H=33.84$, $GL=8$, $P=0.000$): para determinar el grado de genotoxicidad *in vitro* del extracto extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brugmansia arborea* (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, frente a ADN genómico humano, incubado a 37 °C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2017.

Leyenda:
 $P = 1 \times 10^{-4}$

V. DISCUSIÓN

El conocimiento que actualmente se tiene de un gran número de plantas, de muchas de las cuales se conocen sus principios medicinales nos ponen en condiciones de aprovecharlas mejor para el tratamiento de las enfermedades más comunes, o en todo caso aliviar al enfermo, mientras sea conducido a un centro asistencial.

Los resultados del presente trabajo de investigación, nos conduce a determinar el efecto genotóxico *in vitro* del zumo de las flores y el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager "floripondio". La tabla 9, reporta los metabolitos secundarios identificados en el zumo de las flores: alcaloides, saponinas, azúcares reductoras y aminas en abundante cantidad; lactonas y/o cumarinas, flavonoides, taninos y fenoles en cantidad leve; mientras que en el extracto hidroalcohólico de la hojas, se identificaron: alcaloides, flavonoides, catequinas, taninos y fenoles, y aminas en abundante cantidad; azúcares reductores en cantidad moderada.

La figura 3 es el registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico humano, obtenido de diez muestras y coloreado con bromuro de etidio, se puede apreciar la calidad de las bandas, son bien definidas con muy escasa "cola" o "brochazo", resaltando entre ellas las de los carriles 10, 6 y 2 con mayor luminiscencia y cantidad obtenida. Por tanto, el procedimiento realizado para la obtención del ADN, ha sido muy cuidadosa para obtener en buena cantidad y sin fragmentación. La luminiscencia de la banda va directamente relacionada a la cantidad de ADN, que obedece a la vez a la cantidad de bromuro de etidio intercalado en el ADN, porque incide sobre ella los fotones de rayos ultra violeta en el transiluminador.

La figura 4, corresponde al registro fotográfico del ensayo genotóxico *in vitro* del zumo de las flores de *Brugmansia arbórea* (L) Lager "floripondio" a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, frente a ADN genómico humano

a 1,500 ng/μL, incubado en baño María a 37 °C durante una hora; luego estos productos fueron corridos en electroforesis con gel de agarosa a 1% con 40 voltios durante tres horas, posteriormente el gel fue bañado en bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos, para colocarlo en el transiluminador ultra violeta. El carril 1 corresponde a las bandas del marcador de tamaño molecular de 100 pb., en el carril 2 se puede apreciar que el tratamiento con 5% de zumo de flores no manifiesta ninguna disminución de la concentración del ADN, en el carril 3 con 10% de zumo de flores se observa una ligera disminución del ADN, los carriles 4, 5 y 6 con 25%, 50% y 100% de zumo de flores respectivamente, muestran la totalidad del ADN fragmentado, todos los tratamientos comparados con la banda del carril 8 que es el “control” (ADN sin tratamiento). El carril 7 corresponde al “blanco”, es el zumo a 100%, no hay presencia de ADN por lo que no puede conducirnos a error en la interpretación de la genotoxicidad, obviamente están presentes todos sus metabolitos secundarios. El carril 9 corresponde al “descarte de la nucleasas”, en el tubo se enfrentaron al ADN con el zumo a 100%, además de la enzima proteinasa K que si estuvieran presentes las enzimas nucleasas en el zumo, éstas serían degradadas por la proteinasa K, demostrando que la acción de fragmentación es causado por los metabolitos secundarios; se observa la fragmentación total del ADN, similar al carril 6; por tanto, queda demostrado que la fragmentación del ADN en los diferentes tratamientos de éste ensayo, es causado por los metabolitos secundarios presentes en el zumo de las flores de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio”.

Estos resultados concuerdan con lo realizado por Marca P y col.¹⁰ evaluaron la genotoxicidad *in vitro* del zumo del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo” a concentraciones de 5, 10, 50 y 100%, si presentaron una potente actividad genotóxica frente al DNA genómico de *Staphylococcus sp.* Por otro lado, el extracto etanólico del bulbo de “ajo” a concentraciones de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente, no presentaron efecto genotóxico frente al DNA genómico de *Staphylococcus sp.*; éste último no concuerda con nuestro estudio, porque demostramos una actividad creciente relacionada con la concentración del extracto como se detalla en las siguientes figuras.

La figura 5, corresponde a los registros fotográficos del primer y segundo ensayo, y la figura 6 al tercer y cuarto ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, frente a ADN genómico humano

a 1,500 ng/ μ L, incubado en baño María a 37 °C durante una hora; luego estos productos fueron corridos en electroforesis con gel de agarosa a 1% con 40 voltios durante tres horas, posteriormente el gel fue bañado en bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos, para colocarlo en el transiluminador ultra violeta. En ambas figuras: el carril 1 corresponde a las bandas del marcador de tamaño molecular de 100 pb., en los carriles 2 y 3 se puede apreciar que el tratamiento con 5 y 10 mg/mL de extracto, respectivamente no manifiestan ninguna disminución de la concentración del ADN, en el carril 4 con 25 mg/mL de extracto se observa una ligera disminución del ADN, en el carril 5 con 50 mg/mL de extracto la fragmentación es casi total, mientras que en el carril 6 con 100 mg/mL de extracto la totalidad del ADN está fragmentado. Todos los tratamientos fueron comparados con la banda del carril 8 que es el “control” (ADN sin tratamiento). El carril 7 corresponde al “blanco”, es el extracto a 100 mg/mL, no hay presencia de ADN por lo que no puede conducirnos a error en la interpretación de la genotoxicidad, obviamente están presentes todos sus metabolitos secundarios. El carril 9 corresponde al “descarte de la nucleasas”, en el tubo se enfrentaron al ADN con el extracto a 100 mg/mL, además de la enzima proteinasa K que si estuvieran presentes las enzimas nucleasas en el extracto, éstas serían degradadas por la proteinasa K, demostrando que la acción de fragmentación es causado por los metabolitos secundarios; se observa la fragmentación del ADN, similar al carril 6; por tanto, queda demostrado que la fragmentación del ADN en los diferentes tratamientos de éste ensayo, es causado por los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brugmansia arborea* (L) Lager “floripondio”.

Todos estos resultados, con una tendencia que, a mayor concentración del extracto, la fragmentación del ADN tratado se hace más evidente; nos condujeron a formular el ensayo de genotoxicidad *in vitro*, de una manera más amplia, con extracto hidroalcohólico de *Brugmansia arborea* (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente, enfrentándose cada uno de ellos a 6 μ de ADN genómico humano a 1,500 ng/ μ L, e incubados a 37 °C durante una hora; se tuvo como “blanco” el extracto de mayor concentración (500 mg/mL), como “control” 14 μ L de ADN en estudio y como “descarte de nucleasas”, un tubo con 14 μ L de DNA más 6 μ L extracto (500 mg/mL) y 6 μ L proteinasa K. Estos productos, además de un marcador de tamaño molecular, se sometieron a electroforesis con 40 voltios durante tres

horas en gel de agarosa, posteriormente se bañó en bromuro de etidio al 1%, luego se visualizó con radiación de luz ultra violeta y se tomó el registro fotográfico de la figura 7.

Podemos apreciar que el tamaño e intensidad del color grosella de las bandas de ADN, va disminuyendo drásticamente desde la concentración de 200 mg/mL, mientras que a 300, 400 y 500 mg/mL ha sido fragmentado la totalidad del ADN; todos ellos comparados con la banda de ADN del carril 7 que es el “control”; en el carril 6 no hay presencia de ADN, que sirve como “blanco”. Por otro lado, las bandas de ADN del carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb, como indicador de corrido y de posibles fragmentos que podrían estar presentes, como productos de los tratamientos, situación que no se aprecia en ningún carril. Adicionalmente, la mancha de color azul en los carriles 5 y 6, corresponde a la fluorescencia de los metabolitos secundarios del extracto, a mayor concentración hay mayor fluorescencia.

La relación directa de la concentración de los metabolitos secundarios con el efecto genotóxico, también fueron demostrados por Pillaca.¹¹ determinó el efecto genotóxico “*in vitro*” del látex de plantas medicinales antiverrucosas: *Euphorbia peplus* L. “leche leche” y *Ficus carica* L. “higo”. Los metabolitos secundarios identificados fueron: alcaloides, lactonas y/o cumarinas, taninos, flavonoides y quinonas. Ambos látex, de *Euphorbia peplus* L. “leche leche” y *Ficus carica* L. “higo”, presentaron una importante actividad genotóxica sobre el ADN genómico humano, siendo a concentraciones de 100% y 50% con mayor efecto genotóxico respecto a 25% y 10%. Concluyó que el daño genotóxico depende directamente de la concentración del látex; más no así del tiempo de incubación.

Los resultados visualizados en la figura 4, fueron llevados a valores numéricos que se muestran en la tabla 10, tomando en cuenta la escala de la tabla 7, se interpreta que a concentración de 5% del zumo de las flores de “floripondio” no ha degradado, mientras que el de 10% ha degradado entre el 5% al 20% del ADN en tratamiento, en tanto que las concentraciones de 25, 50 y 100% del zumo, respectivamente, han fragmentado mayor a 95% del ADN en tratamiento.

Tomando estos datos, se pudo realizar el análisis estadístico con la prueba de Kruskal – Wallis, confrontando el grado de fragmentación del ADN en tratamiento expresado en porcentaje (%) versus la concentración del zumo de las flores de “floripondio” también en porcentaje (%), mostrados en la tabla 10 y la figura 4. El porcentaje de fragmentación del ADN, revela el grado de genotoxicidad,

formulándose como hipótesis nula (H_0) que todas las medianas son iguales y como hipótesis alterna (H_1) que al menos una mediana es diferente. Los resultados reportan que para $GL=4$ y $H=18.4$, el valor de $P=0.001$; por tanto, se rechaza la H_0 y se acepta la H_1 , porque P resultó menor que 0.05 . En consecuencia, el grado de fragmentación del ADN tratado depende de la concentración del extracto de la planta.

Los resultados visualizados en las figuras 5, 6 y 7 fueron llevados a valores numéricos que se muestran en la tabla 11, tomando en cuenta la escala de la tabla 7, se interpreta que a concentración de 5 mg/mL y 10 mg/mL del extracto no ha degradado al ADN, mientras que a 25 mg/mL ha degradado entre el 20% al 45% del ADN en tratamiento, de 50 mg/mL degradó entre el 40 al 95% de ADN, en tanto que las concentraciones de 100 , 200 , 300 , 400 y 500 mg/mL , respectivamente, han fragmentado mayor a 95% del ADN en tratamiento.

Igualmente, tomando estos datos, se pudo realizar el análisis estadístico con la prueba de Kruskal – Wallis, confrontando el grado de fragmentación del ADN en tratamiento expresado en porcentaje (%) versus la concentración de los extractos de la hoja en mg/mL de *Brugmansia arborea* (L) Lager “floripondio”, mostrados en la tabla 11 y la figura 9. El porcentaje de fragmentación del ADN, revela el grado de genotoxicidad, formulándose como hipótesis nula (H_0) que todas las medianas son iguales y como hipótesis alterna (H_1) que al menos una mediana es diferente. Los resultados reportan que para $GL=8$ y $H=33.4$, 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 grado de fragmentación del ADN tratado depende de la concentración del extracto de la planta.

Así mismo, nuestros resultados coinciden con los reportados por Quispe.¹² determinó el efecto genotóxico *in vitro* de látex y extracto hidroalcohólico de semilla de *Carica papaya* L. “papaya” frente a ADN genómico humano e identificó los metabolitos secundarios presentes. El látex de “papaya” desde 5% al 100% de concentración, presenta un potente efecto genotóxico frente al ADN genómico humano; mientras que el extracto hidroalcohólico manifiesta una tendencia inversa, a mayor concentración del extracto la fragmentación del ADN es menor; y a menor concentración del extracto (5 mg/mL y 10 mg/mL), la fragmentación del ADN es mayor. Concluyó que el látex y el extracto hidroalcohólico de semilla, presentan efecto genotóxico *in vitro* frente a ADN genómico humano.

Todos los estudios realizados en las plantas medicinales son aportes para entender este complejo sistema de propiedades curativas que presentan las plantas, pero a la vez tomar en cuenta si estos nos podrían causar daño, siendo necesario ampliar todas estas investigaciones, motivo por el que nos permitimos sugerir que es necesario crear el Instituto Nacional de Medicina Floklórica para el estudio, análisis y aplicación de esta importante Medicina Paralela como aliada de la Medicina Académica. En la actualidad existen muchas relaciones entre ambas, si tomamos en cuenta el sentido integral de salud y, por consiguiente, de enfermedad, aquellas relaciones son manifiestas.

VI. CONCLUSIONES

1. El zumo de las flores y el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio”, presenta efecto genotóxico *in vitro* frente al ADN genómico humano.
2. Los metabolitos secundarios identificados en el zumo de las flores de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio” fueron: alcaloides, saponinas, azúcares reductoras y aminos en abundante cantidad; lactonas y/o cumarinas, flavonoides, taninos y fenoles en cantidad leve; mientras que en el extracto hidroalcohólico de la hojas, se identificaron: alcaloides, flavonoides, catequinas, taninos y fenoles, y aminos en abundante cantidad; azúcares reductores en cantidad moderada.
3. El el zumo de las flores de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio” a concentraciones de 5% no manifiesta ninguna disminución de la concentración del ADN, pero con 25%, 50% y 100% respectivamente, muestran la totalidad del ADN fragmentado; prueba de Kruskal – Wallis (GL=4, H=18.4, P=0.001). Con el extracto hidroalcohólico de las hojas a concentraciones de 5 y 10 mg/mL, no presentó efecto genotóxico *in vitro*, mientras que a concentraciones de 25 mg/mL ha degradado entre el 20% al 45% del ADN en tratamiento, de 50 mg/mL degradó entre el 40 al 95% de ADN, en tanto que las concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente, han fragmentado mayor a 95% del ADN genómico humano, prueba de Kruskal – Wallis (GL=4, H=18.4, P=0.001).

VII. RECOMENDACIONES

- Impulsar trabajos de investigación sobre genotoxicidad en la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, ya que en los últimos años ha retornado el interés por las plantas medicinales en búsqueda de nuevas estructuras bioactivas para el tratamiento de las enfermedades.
- Ampliar estudios de genotoxicidad *in vitro* de *Brugmansia arborea* (L) Lager “floripondio” con extractos de otros solventes, así como con extractos fraccionados.

VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Carrillo T, Moreno R y G. Importancia de las plantas medicinales en el autocuidado de la salud en tres caseríos de santa Ana Trujillo. Revista de la facultada de farmacia.2006 [18 de junio del 2017]48(2).Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/23889/1/articulo4.pdf>
2. Celik H, Arinc E. Bioreduction of Idarubicin and Formation of ROS Responsible for DNA Cleavage by NADPH-Cytochrome P450 Reductase and its Potencial Role in the Antitumor Effect. J Pharm Pharmaceut Sci (www. cspCanada.org); 2008.
3. Flores M. Compilación bibliográfica Brugmansia Arborea SPP.[trabajo recepcional].Veracruz.octubre del 2011.
4. Garaj-Vrhovac V, Gajski G. Evaluation Of The Cytogenetic Status Of Human Lymphocytes After Exposure To A High Concentration Of Bee Venom *In Vitro*. Arh Hig Rada Toksikol; 2009.
5. Dusinska M, Andrew R. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. Mutagenesis; 2005.
6. Piñeros L, Pombo L, Borrego P, BarajasL. Actividad Antimicrobiana del Extracto e Hidrolato de Brugmansia Arborea sobre cepas patógenas prevalentes En Colombia. I Congreso Internacional en Ciencias de la Salud, Educación y Música [revista en Internet] 2015 Noviembre. [acceso 15 de junio de 2017]; 26(3). Disponible en: https://www.juanncorpas.edu.co/uploads/media/CINVEST_Nov_19_y_20_de_2015.pdf#page=109
7. Espinoza Choque A. Determinación de la actividad insecticida de los aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos de: floripondio, khoa y altamisa; en modelo *Drosophila melanogastes*. [Tesis de licenciatura]. La paz- Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés; 2015.
8. Ramírez M, Cruz A, Rodrigues C. Evaluación preliminar del efecto de los etanólicos de 5 plantas medicinales sobre la mosca de los cuernos. Revista U.D.C.A Actualidad y divulgación científica-Bogota.2009 junio[acceso 06 setiembre de 2017]12(1) Disponible en: <file:///C:/Users/HP/AppData/Local/Mendeley%20Ltd./Mendeley%20Desktop/Downloaded/00dfeaf7a6082988a96cd2bfa0562f497a308f36.html>
9. Pino J, Alvis R. Efecto de Brugmansia arborea (L.) Lagerheim (Solanacea) en el sistema reproductor masculino de ratón .Revista peruana de Biología [revista en internet] lima-2008 [acceso 23 de julio del 2018] Disponible en:<file:///C:/Users/HP/AppData/Local/Mendeley%20Ltd./Mendeley%20Desktop/Downloaded/e437c7bdbd6a7101de0a22c4d6994015e168a997.html>
10. Marca P, Miranda T. Evaluación preliminar de la genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum* L. “ajo” frente a ADN *Staphylococcus sp.* .[Tesis para obter titulo]. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.Ayacucho.Peru.2017
11. Pillaca L, Miranda T. Efecto genotóxico *in vitro* del látex de plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. “leche leche” y *Ficus carica* L. “higo”. [Tesis para obter titulo]. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.Ayacucho.Peru.2014.
12. Quispe C, Miranda T. Efecto genotóxico *in vitro* de látex y extracto hidroalcohólico de semilla de *Caricapapaya* L. “papaya” frente a ADN genómico humano. [Tesis para obter titulo]. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.Ayacucho.Peru.2017

13. Lagerheim, N. Campana-brugmansia arbórea. Anuarios botánicos de sistematica, historia vegetal y geografía vegetal.[revista internet]1895-2015.20(665).Disponible en:
[https://www.ecured.cu/Campana_\(Brugmansia_arborea\)](https://www.ecured.cu/Campana_(Brugmansia_arborea))
14. Flores M. Compilación bibliográfica Brugmansia SPP.trabajo recepcional [revista en internet].Universidad de Veracruz. octubre del 2011.
<https://core.ac.uk/download/pdf/16305413.pdf>
15. Avila E. Aprovechamiento de la Scoparia dulcis (Scrophulariceae), Oenocaiplus batagua (Arecaceae), Solanum Brugmancia (solanaceae) en la producción de una pomada antiinflamatoria [Tesis título profesional]Quito. Servicio de publicaciones e intercambio científico.Universidad politécnica salesiana sede Quito.2009.
16. Repetto Jiménez M, Repetto Kuhn G. Toxicología fundamental. 4^{ta} Edición. Madrid: Díaz de Santos; 2009.
17. Glosario de términos Toxicológicos. Asociación Española de Toxicología (AETOX).
18. Klaassen C, Watkins J, Casarett, Doull. Fundamentos de toxicología. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España; 2005.
19. Hernández, Moreno, Zaragoza, Porres. Tratado de medicina Farmacéutica. España: Médica panamericana, S.A. 2011.
20. Bello J, López A. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Madrid: Díaz de Santos; 2001.
21. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD).Curso de Toxicología Ambiental. Bogotá (Colombia); 2011.
22. Carballo M. Centro de Análisis Programes Sanitaris (CAPS). Biomarcadores de genotoxicidad. Barcelona Universidad de Buenos Aires, 2011.
23. Herrera F, De La Peña E. Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Evolución de mutagenicidad y genotoxicidad. Madrid; 2004.
24. Lodish, Berk, Matsudaria, Káiser. Biología celular y molecular. 5^{ta} edición. Argentina: Médica panamericana. 2005
25. Sánchez A, Fonseca G, Capiro N, Fernández D. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en cuba. Revista cubana en farmacia. 34, 34-43.2000.
26. Benjamín Lewin. Genes. 2^{da} edición. España: Reverte, S.A.1996.
27. Carranza Díaz Z. Selección e identificación de especies de hongos ectomico rrizógenos del estado de Hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido [tesis pregrado]. Tulancingo de Bravo: Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2006.
28. Primo, E. Química orgánica básica y aplicada de la molécula a la industria. Tomo II. España: Reverte, 2007.
29. Voet, D. Bioquímica.3^{ra} Edición. Argentina: Medica panamericana, 2006.
30. Romero, E. Determinación de genotoxicidad en neonatos mediante métodos de diagnóstico no invasivo. [Tesis doctoral].universidad de granada, 2012.
31. Daniel L, Elizabeth W. Genetics: Analysis of Genes and Genomes. 6th edición Hartl; 2003.
32. Arena I, López J. "Espectrofotometría de absorción." Métodos de laboratorio. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2004.
33. 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.

34. Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A. Endogenous RNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes, 2008.
35. Arrebola D.; Fernández L. Actualización Sobre el Ensayo Cometa y de Micronúcleos *In vitro*, 2003.
36. Fairbairn D, Olive P, O'Neill K. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*; 1995
37. Hwang E, Bowen P. DNA Damage, a Biomarker of Carcinogenesis: Its Measurement and Modulation by Diet and Environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 2007.
38. 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.
39. Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research*; 2009.
40. Vivanco M. Muestreo estadístico, diseño y aplicación. 1^{ra} edición. Santiago de Chile: Editorial universitaria.2005.
41. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. 5^a edición. Perú: Editorial Mc Graw Hill. 2010.
42. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad de la Habana. Ciudad de Habana. Cuba; 2000.
43. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Perú: Edit. Pontificia Universidad Católica del Perú. 1994.
44. Miranda T, Valer G. Protocolos de Biología Molecular-Guía de práctica. Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2013.
45. Larrea Poma M. Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay. La Paz. Universidad Mayor de San Andrés; 2007.

ANEXOS

Anexo 1. Clasificación taxonómica de *Brugmansia arborea* (L) Lager “floripondio”
.Ayacucho 2017.



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 Farmacia y Bioquímica, **Srta. Zinquia Vaneza, GARCÍA SOTO**
, 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	:	SOLANALES
FAMILIA	:	SOLANACEAE
GENERO	:	Brugmansia
ESPECIE	:	<i>Brugmansia arborea</i> (L) Lager.
N.V.	:	“floripondio”

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

Ayacucho, 25 de Mayo del 2017

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

Dña. Laura Agustina Medina
JEFE

Anexo 2. Descripción Botánica de *Brugmansia arbórea* (L.) Lager “floripondio”
.Ayacucho 2017.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL FLORIPONDIO:

FAMILIA : SOLANACEAE
Nombre científico : *Brugmansia arbórea* (L.) Lager.
Nombre vulgar : “floripondio blanco”

CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA:

Planta arbustiva de 2.50 a 3 metros de alto, tallos ramificados desde la base, hojas grandes, simples, densamente pubescentes por ambas caras, largamente pecioladas, aovada-lanceoladas de borde entero y penninervias.

Flores grandes o agrupadas formando inflorescencias cimosas, generalmente axilares, cortamente pedunculadas; heteroclamídeas, pentámeras y bisexuales; cáliz formado por 5 sépalos soldados en la base formando una sola pieza bilobada, corola formado por 5 pétalos fusionados en forma de una campana, con 5 lóbulos en el ápice, de color blanco-amarillento; 5 estambres libres que nacen de la cara interna del tubo de la corola, gineceo de ovario súpero de placentación marginal bicarpelar y bilocular conteniendo numerosos óvulos.; fruto cápsula.

La planta despiden un olor desagradable.

HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN:

Es una planta cultivada, originaria de la región andina, crece en zonas templadas y cálidas, también se le encuentra en forma silvestre en borde de riachuelos y zonas húmedas, formando la vegetación ribereña en la costa sierra y selva.

USOS:

Se cultivan en parques y jardines con fines ornamentales por sus flores grandes, colgantes y vistosas. Esta planta tiene propiedades somníferas, alucinógenas y tóxicas por el contenido del alcaloide atropina.

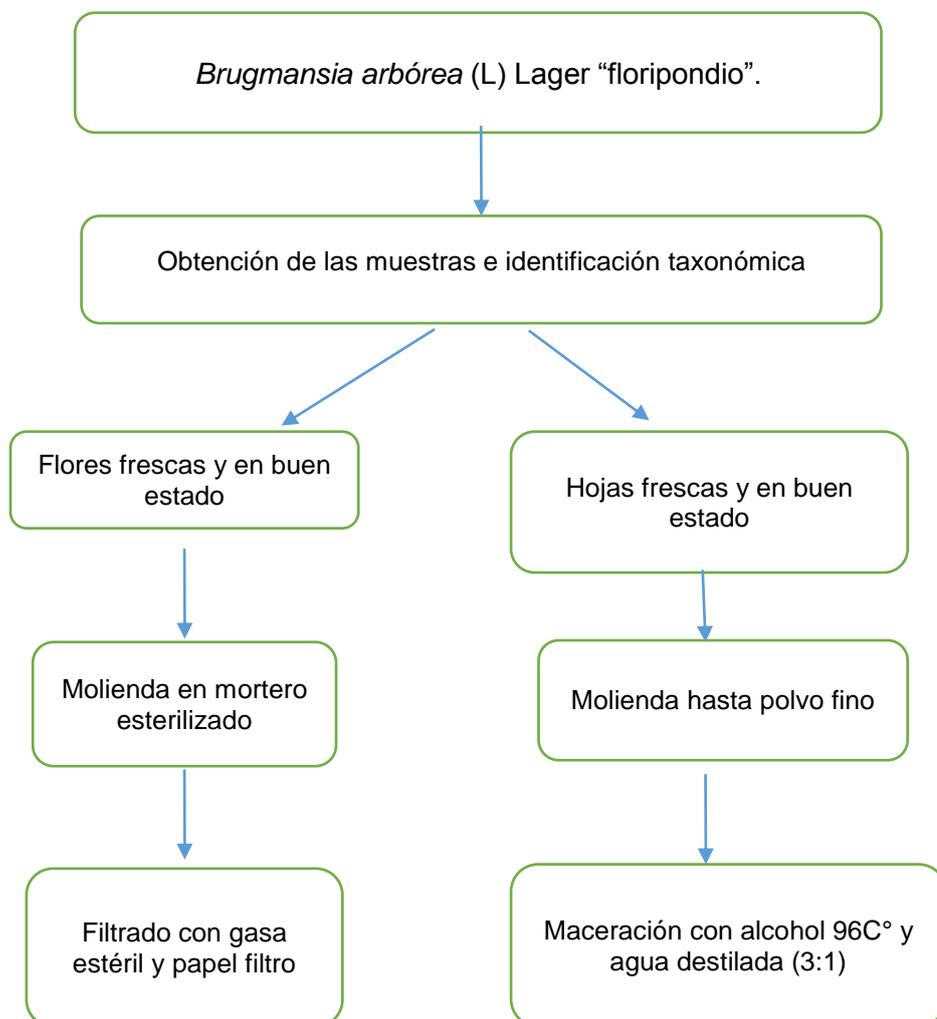
Los lugareños acostumbran colocar las hojas del floripondio debajo de la almohada de los niños para hacer dormir.

No se recomienda el uso interno por ser tóxica.

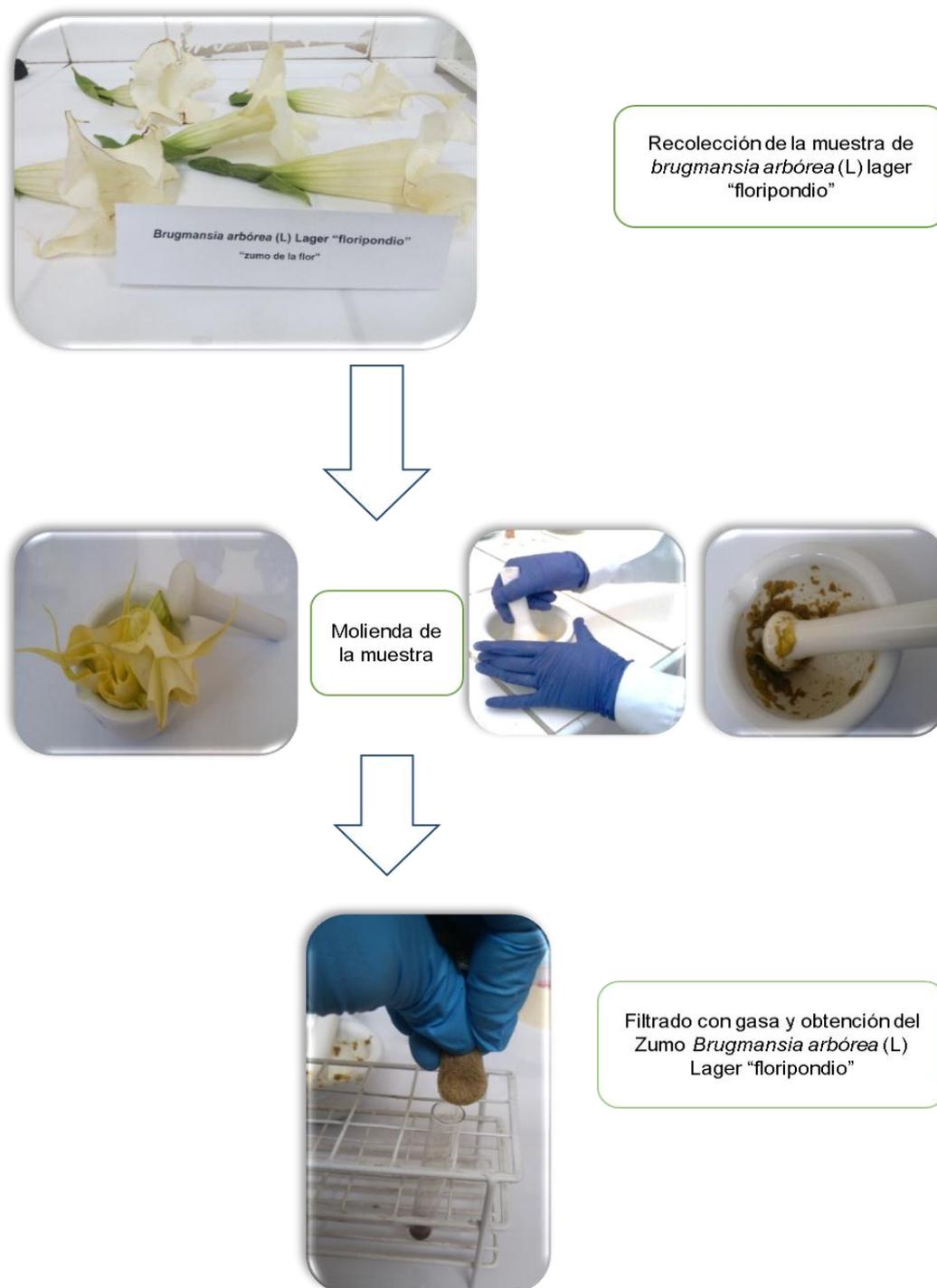
UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUASANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUASANGENSE

Dra. Laura Rocío Medina
JEFE

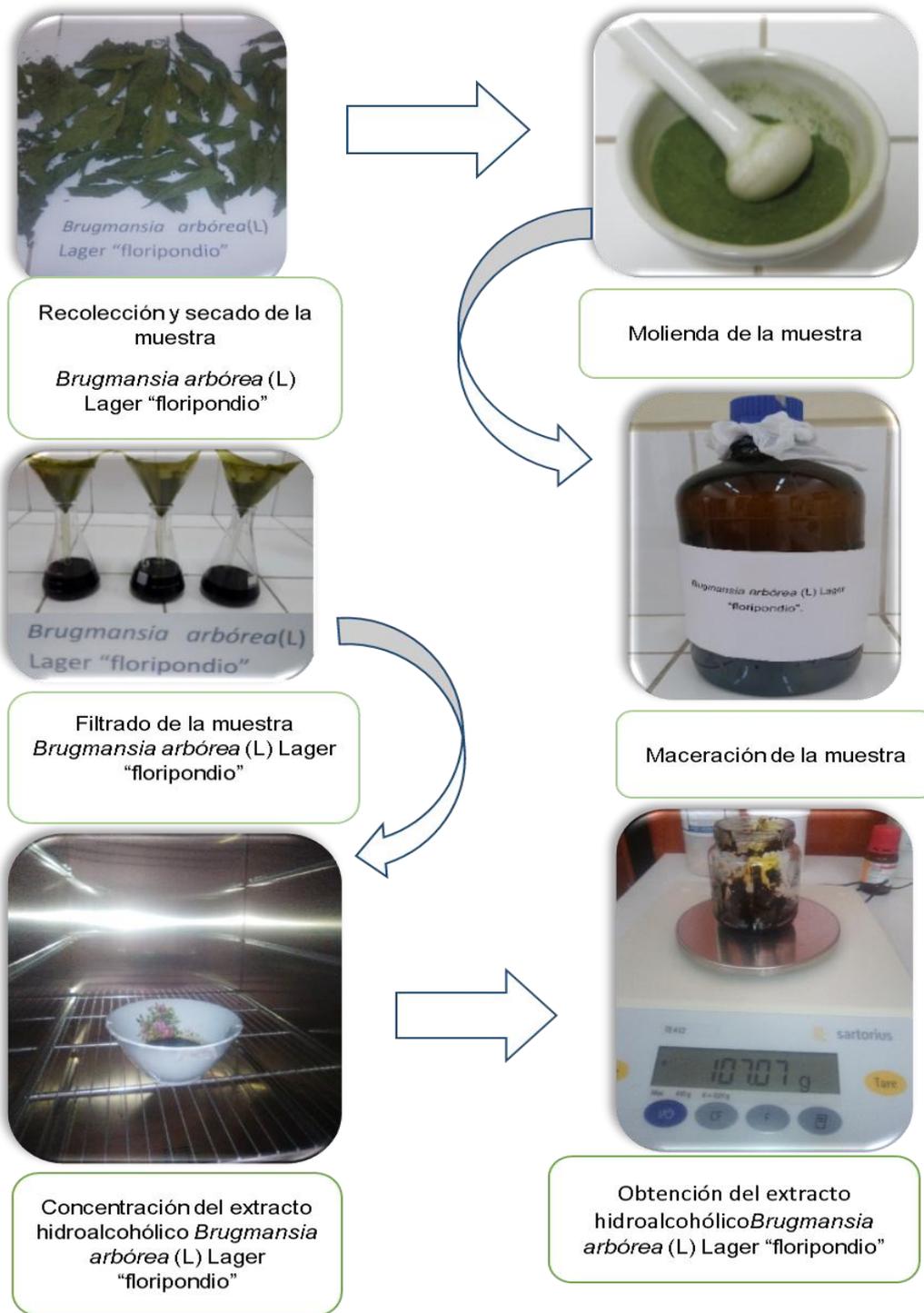
Anexo 3. Diagrama para la obtención del zumo de las flores frescas y extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager "floripondio". Ayacucho 2017.



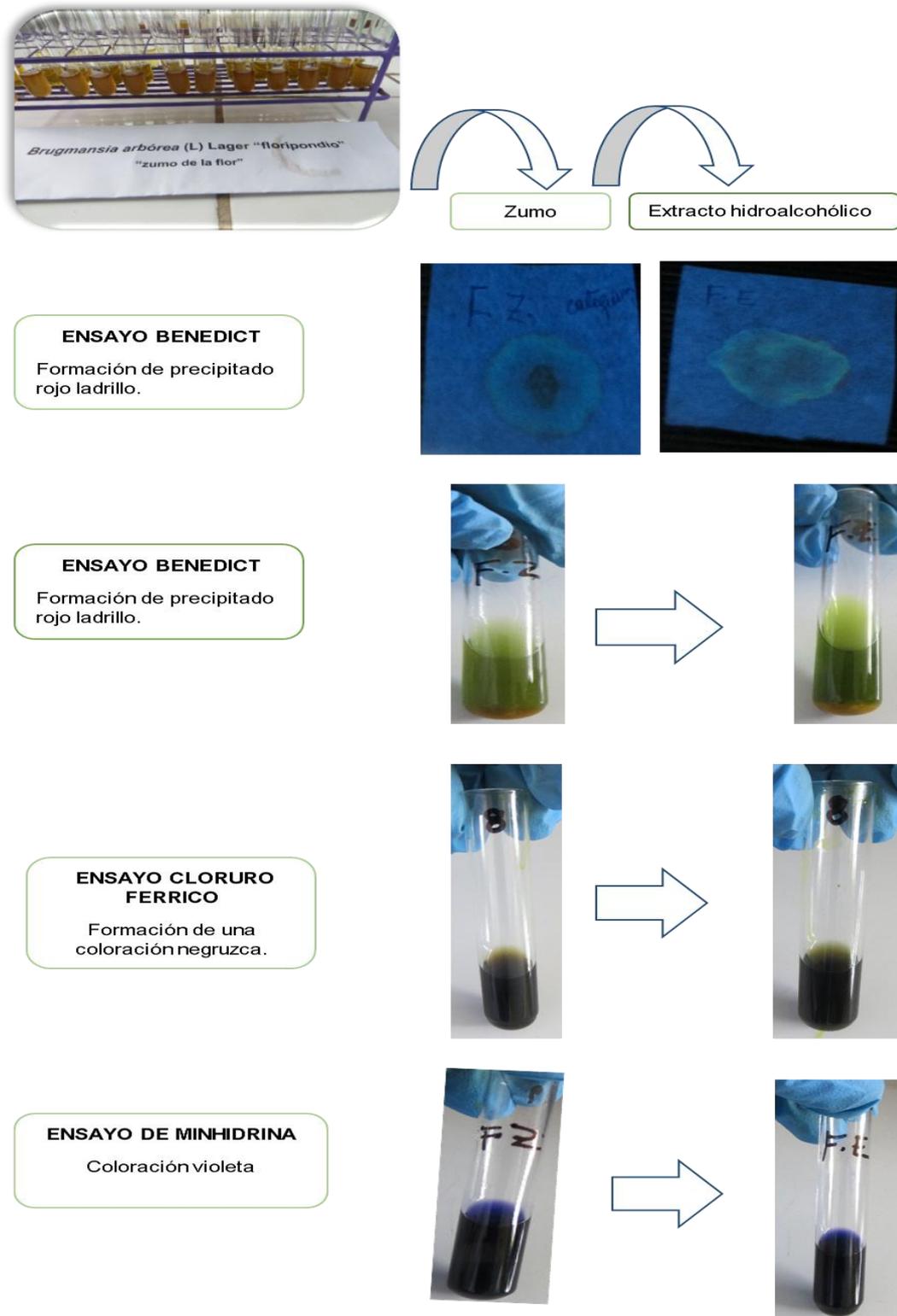
Anexo 4. Obtención del Zumo de las flores frescas de *Brugmansia arborea* (L) Lager "floripondio". Ayacucho 2017.



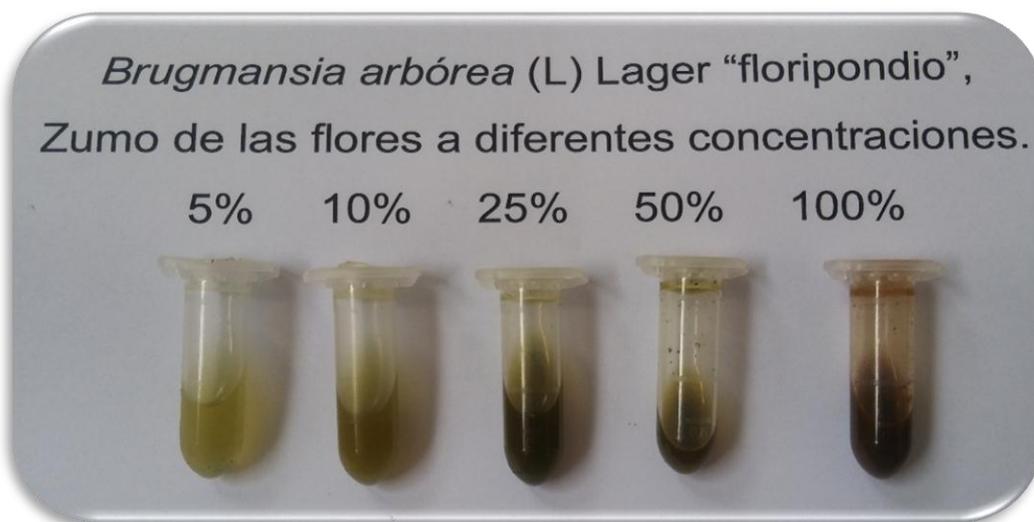
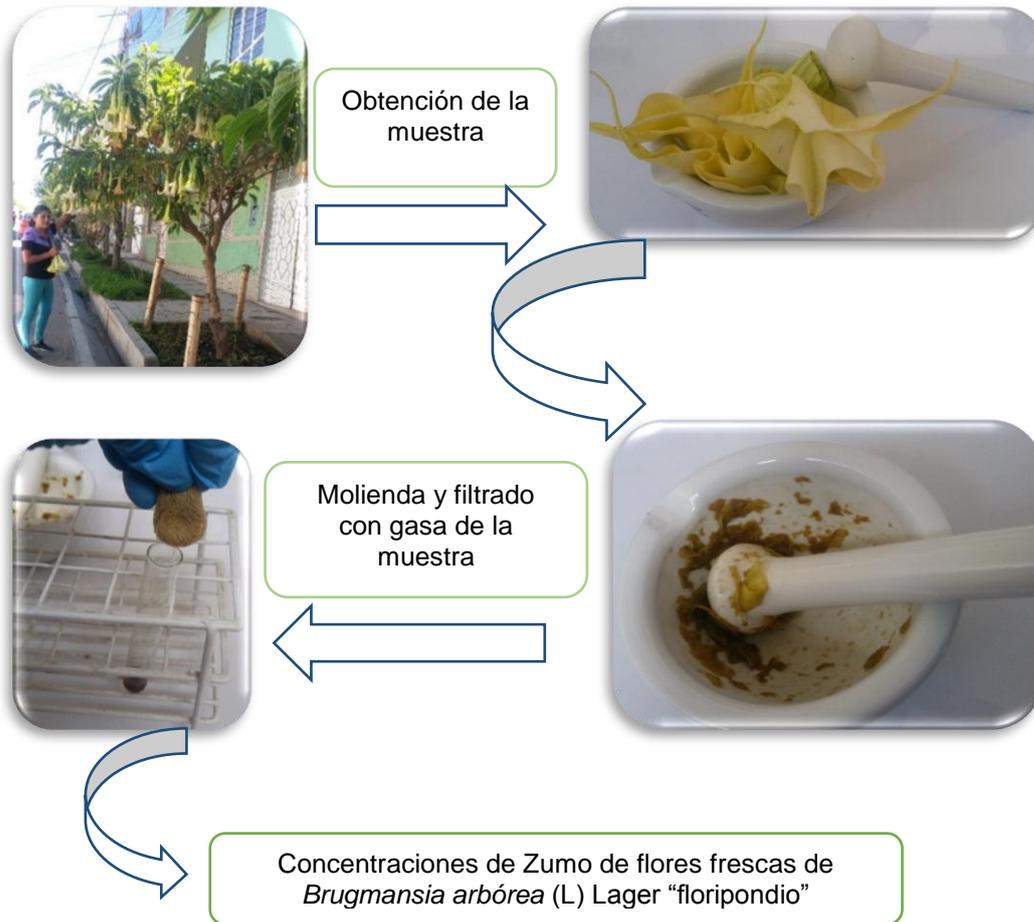
Anexo 5. Recolección, molienda y obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager "floripondio". Ayacucho 2017.



Anexo 6. Ensayo de identificación fotoquímico del Zumo de las flores y extractos hidroalcohólico de *Brugmansia arborea* (L) Lager "floripondio". Ayacucho 2017.



Anexo 7. Proceso de preparación a diferentes concentraciones del Zumo de las flores frescas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager "floripondio". Ayacucho 2017.



Anexo 8. Proceso de preparación a diferentes concentraciones del extractos hidroalcohólico de hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager "floripondio". Ayacucho 2017.



Pesado del extracto hidroalcohólico de *Brugmansia arbórea* (L) Lager "floripondio".



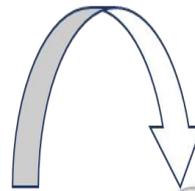
Proceso de dilución con H₂O bidestilada



Anexo 9. Preparación de solución de digestión de ADN genómico humano (con las concentraciones de zumo de flores y de *Brugmansia arbórea* (L) Lager "floripondio". E incubación en baño maría por 1 hora a 37 C°. Ayacucho 2017.



Preparación para la fase de digestión de ADN genómico humano frente a zumo de flores.

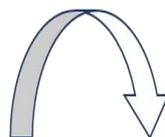


Incubación de la solución de digestión: ADN genómico + zumo de las flores de *Brugmansia arbórea* (L) Lager "floripondio".

Anexo 10. Preparación de solución de digestión de ADN genómico humano (con las concentraciones de extracto hidroalcohólico de hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager "floripondio". E incubación en baño maría por 1 hora a 37 C°. Ayacucho 2017.

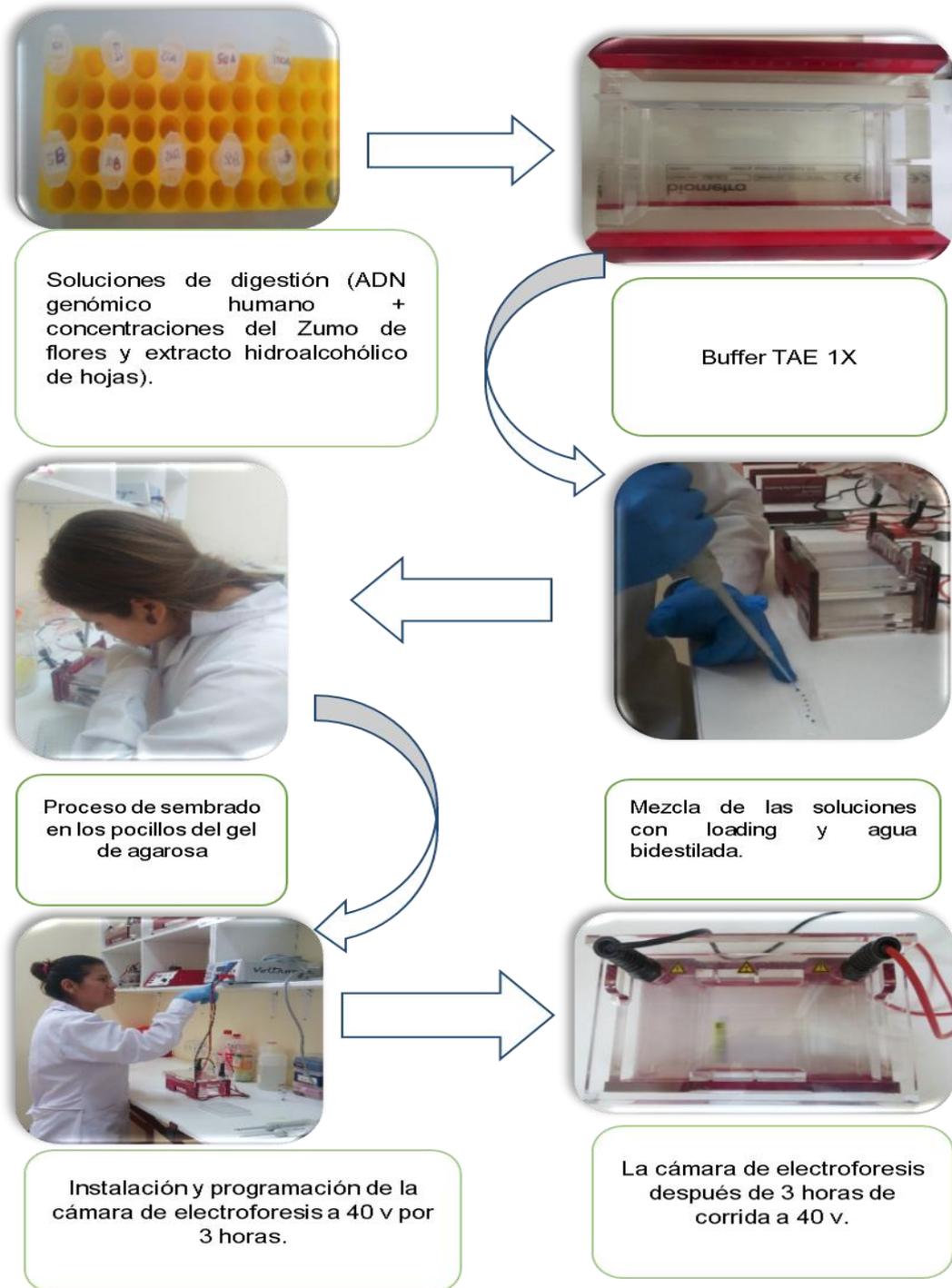


Preparación para la fase de digestión de ADN genómico humano frente a extracto hidroalcohólico de hojas.



Incubación de la solución de digestión (ADN genómico + Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager "floripondio".)

Anexo 11. Fase de electroforesis en gel de agarosa (se repite el mismo procedimiento con las concentraciones de Zumo de flores y Extracto hidroalcohólico de hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager "floripondio". Ayacucho 2017.



Anexo 12. Fase de coloración con bromuro de etidio. Ayacucho 2017.



Adicionar la solución de bromuro de etidio 1% al recipiente hasta cubrir el gel de agarosa

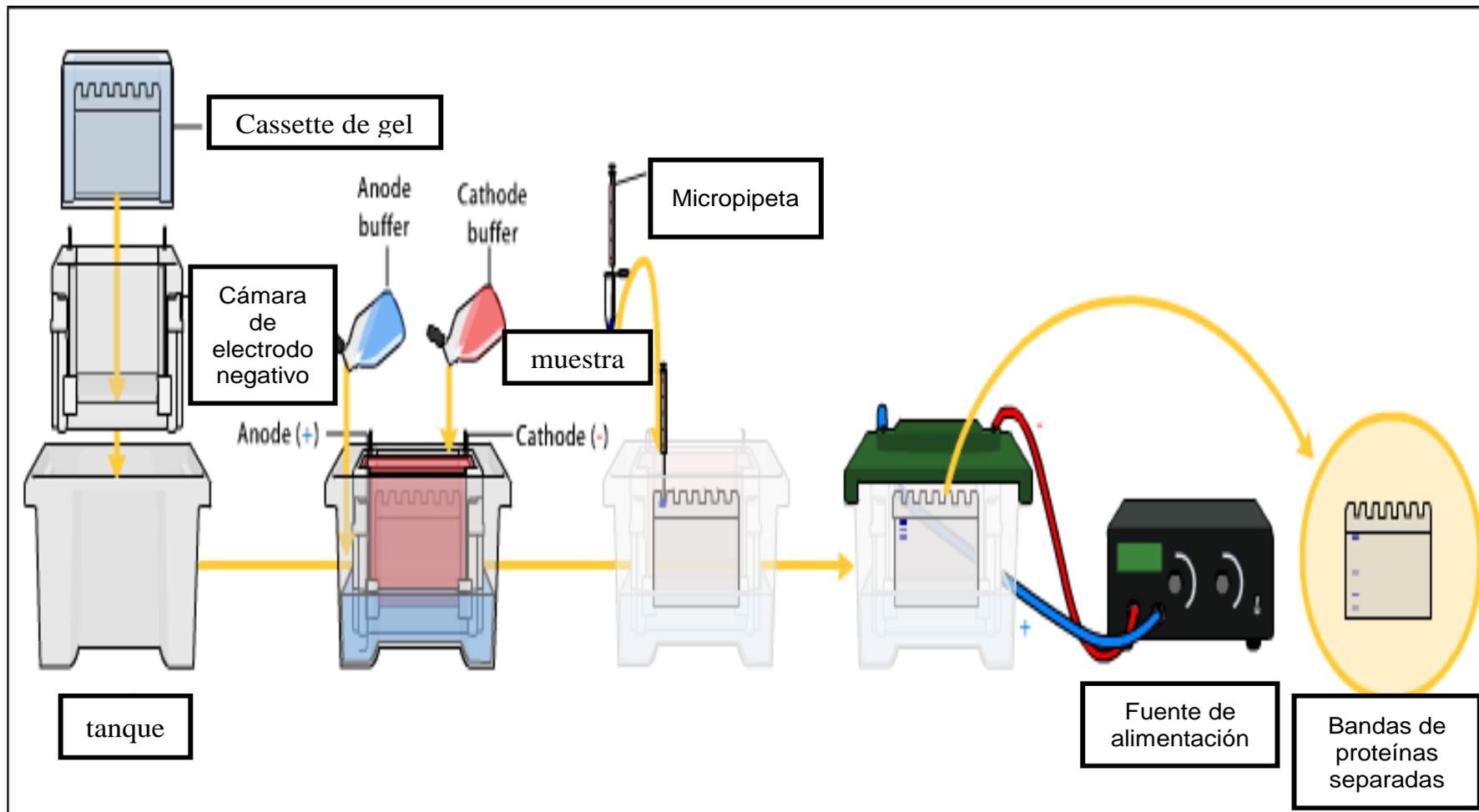


Dejar reposar por 15 minutos



Pasado los 15 minutos se devuelve la solución de bromuro de etidio 1% al frasco, luego se realiza el lavado del gel de agarosa con agua corriendo 2 veces

Anexo 13. Diagrama de equipo de electroforesis



Anexo 14. Matriz de consistencia

TÍTULO: Genotoxicidad *in vitro* del zumo de flores y extracto hidroalcohólico de hojas de *Brugmansia arbórea* (L) Lager “floripondio” frente a ADN genómico humano. Ayacucho, 2017.

PERSONAL INVESTIGADOR: Bach. Zinquia Vaneza GARCIA SOTO

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	MARCO TEÓRICO	VARIABLES	METODOLOGÍA
Genotoxicidad <i>in vitro</i> del zumo de flores y extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio” frente a ADN genómico humano. Ayacucho, 2017.	¿Tendrá efecto genotóxico <i>in vitro</i> , el zumo de flores y extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”, frente a ADN genómico humano?	<p>GENERAL</p> <p>Determinar la genotoxicidad del zumo de flores y extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”, en un ensayo preliminar <i>in vitro</i>, frente a ADN genómico humano.</p> <p>ESPECÍFICOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> Identificar los metabolitos secundarios presentes en el zumo de flores y extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”. Evaluar la genotoxicidad <i>in vitro</i> del zumo de flores y extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”, mediante la fragmentación de ADN genómico humano. 	El zumo de flores y extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”, presenta efecto genotóxico <i>in vitro</i> , en un ensayo preliminar frente a ADN genómico humano.	<p>Aspectos Botánicos</p> <p><i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”</p> <p>Genotoxicidad</p> <p>Las pruebas de genotoxicidad se pueden definir como pruebas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>, diseñadas para detectar compuestos que induzcan daño genético, directa o indirectamente, por diversos mecanismos.</p>	<p>Variable Independiente:</p> <p>Zumo de flores y extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”.</p> <p>Indicador:</p> <p>Concentración del zumo de la flor en porcentaje (%) y extracto hidroalcohólico en miligramos por mililitro (mg/ mL).</p> <p>Variables Dependientes:</p> <p>Efecto genotóxico frente a ADN genómico humano.</p> <p>Indicador:</p> <p>Grado de fragmentación del Ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico humano.</p>	<p>Tipo de investigación :</p> <p>Básica – experimental.</p> <p>Diseño Experimental:</p> <p>El experimento se realizará bajo la guía del modelo <i>in vitro</i> para estudiar la actividad genotóxica.</p> <p>Población: <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”, que crece en los diferentes pisos ecológicos de la provincia de Huamanga.</p> <p>Muestra: zumo de flores (20 mL) y hojas (dos Kg) de <i>Brugmansia arbórea</i> (L) Lager “floripondio”, de la planta en estudio que se desarrolla en la ciudad de huamanga.</p> <p>Unidad experimental:</p> <p>400 µL de ADN genómico humano a concentración de 1500 ng/ µL.</p> <p>Análisis estadístico:</p> <p>paquete estadístico SPSS, Pruebas de Kruskal-Wallis</p>