

A Dios, por guiarme en esta etapa profesional, a mis padres Fabio y Leonilda, mis hermanos por apoyarme siempre.

AGRADECIMIENTOS

Un reconocimiento especial a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por formar excelentes profesionales al servicio de la comunidad ayacuchana.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, del mismo modo a toda la plana docente, quienes fueron los impartidores de conocimiento, experiencia y exigencia, con lo que se desarrolló nuestra formación para un ambiente de alta competitividad a nivel profesional y personal.

A mi asesor Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich, quien accedió a brindarme toda su paciencia, capacidad y experiencia científica.

A mis co-asesores la Mg. Miriam Moreno Hinojosa, quienes accedieron a brindarme toda su paciencia, capacidad y experiencia científica.

A mi padre y madre, por la motivación y confianza brindada durante toda la etapa de mi formación, asimismo, a mis amigos quienes estuvieron a lado mío brindándome su apoyo moral.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. DESARROLLO DE LA PERSPECTIVA TEÓRICA	3
2.1. Marco Referencial	3
2.1.1. <i>Antecedentes Internacionales</i>	3
2.1.2. <i>Antecedentes Nacionales</i>	8
2.1.3. <i>Antecedentes Locales</i>	8
2.2. Marco Teórico	11
2.2.1. Ricinus Communis	11
2.2.2. Ácidos Nucleicos	12
2.2.3. Toxicidad y Genotoxicidad	13
2.2.4. Electroforesis en Gel de Agarosa	18
2.2.5. Espectrofotometría	19
2.3. Marco Conceptual	20
2.4. Marco Ético y Legal	20
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Alcance de la Investigación	21
3.2. Diseño de la Investigación	21
3.3. Unidad de Análisis	21
3.4. Población de Estudio	21
3.5. Muestra	21
3.6. <i>Criterios de Selección</i>	21
3.6.1. <i>Criterios de Inclusión</i>	21
3.6.2. <i>Criterios de Exclusión</i>	21
3.7. Instrumentos de Recolección de Datos	21
3.7.1. Recolección y Secado de la Muestra Vegetal	21
3.7.2. Elaboración del Extracto Hidroalcohólico de Hojas y Semillas Inicial	22
3.7.3. Identificación Fitoquímica	22
3.7.4. Extracción de ADN Genómico a partir de Escherichia coli	22
3.7.5. Cuantificación de ADN genómico de E. coli	23
3.7.6. Ensayos de genotoxicidad in vitro, “Método Tomasevich”	24

3.8. Análisis de Datos	27
CAPÍTULO IV.RESULTADOS	29
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	37
CAPÍTULO VI.CONCLUSIONES	45
CAPÍTULO VII.RECOMENDACIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXOS	53

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	<i>Metabolitos secundarios presentes en la hoja de R. communis.</i>	12
Tabla 2	<i>Preparación de concentraciones de ADN a diferentes concentraciones para patrones de banda en electroforesis.</i>	24
Tabla 3	<i>Preparación de las soluciones para el ensayo de genotoxicidad in vitro del extracto de Ricinus communis “higuerilla” sobre ADN genómico Escherichia coli.</i>	25
Tabla 4	<i>Preparación de soluciones de ADN genómico con hojas y semillas de Ricinus communis “higuerilla” para el ensayo de genotoxicidad in vitro.</i>	26
Tabla 5	<i>Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN, clasificados por registro visual.</i>	25
Tabla 6	<i>Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas y semillas de Ricinus communis “higuerilla”. Ayacucho, 2023</i>	31

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	<i>Estructura química de las bases nitrogenadas.</i>	12
Figura 2	<i>Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1% de 7 muestras del ADN genómico Escherichia coli y coloreado con bromuro de etidio. Ayacucho 2023.</i>	32
Figura 3	<i>Ensayo de genotoxicidad in vitro del extracto hidroalcohólico de semillas de Ricinus communis “higuerilla” a diferentes concentraciones (5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL) sobre el ADN genómico E. coli, a 37°C después de una hora de incubación. Ayacucho 2023.</i>	33
Figura 4	<i>Genotoxicidad expresada en porcentaje de fragmentación del ADN de Escherichia coli por el efecto del extracto de las semillas de Ricinus communis</i>	34
Figura 5	<i>Ensayo de genotoxicidad in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas de Ricinus communis “higuerilla” a diferentes concentraciones (5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL) sobre el ADN genómico E. coli, a 37°C después de una hora de incubación. Ayacucho 2023.</i>	35
Figura 6	<i>Genotoxicidad expresada en porcentaje de fragmentación del ADN de Escherichia coli por el efecto del extracto de las hojas de Ricinus communis</i>	36

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1	<i>Constancia de la clasificación taxonómica de la especie vegetal Ricinus communis “higuerilla”.</i> 55
Anexo 2	<i>Secado de la planta en estudio: Ricinus communis “higuerilla”.</i> 56
Anexo 3	<i>Preparación de los extractos hidroalcohólicos Ricinus communis “higuerilla”.</i> 57
Anexo 4	<i>Esquema de obtención del extracto hidroalcohólico, tamizaje fitoquímico y determinación del efecto genotóxico Ricinus communis “higuerilla”. Ayacucho 2023.</i> 58
Anexo 5	<i>Flujograma del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de Ricinus communis “higuerilla”.</i> 59
Anexo 6	<i>Identificación de metabolitos secundarios de los extractos hidroalcohólicos de Ricinus communis “higuerilla”</i> 60
Anexo 7	<i>Protocolo de extracción de ADN genómico de Escherichia coli.</i> 61
Anexo 8	<i>Sembrado en el gel de agarosa al 1%, ADN genómico de Escherichia coli.</i> 62
Anexo 9	<i>Valores numéricos del ensayo de genotoxicidad in vitro del extracto hidroalcohólico de semillas de Ricinus communis “higuerilla” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, sobre el ADN genómico Escherichia coli, incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH.</i> 63
Anexo 10	<i>Prueba de Kruskal – Wallis para evaluar el grado de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de semillas de Ricinus communis “higuerilla”, según la concentración del extracto, frente a ADN genómico Escherichia coli, incubado a 37°C durante una hora. Ayacucho, 2023.</i> 64
Anexo 11	<i>Valores numéricos del ensayo de genotoxicidad in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas de Ricinus communis</i> 65

“higuerilla” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, sobre el ADN genómico Escherichia coli, incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2023.

Anexo 12	<i>Prueba de Kruskal – Wallis para evaluar el grado de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de hojas de Ricinus communis “higuerilla”, según la concentración del extracto, frente a ADN genómico Escherichia coli, incubado a 37°C durante una hora. Ayacucho, 2023</i>	66
Anexo 13	<i>Matriz de Definición y Operacionalización de Variables</i>	67
Anexo 14	<i>Matriz de Consistencia.</i>	68

RESUMEN

Las hojas y semillas de *Ricinus communis* “higuerilla”, son empleadas en la medicina tradicional para tratar afecciones digestivas, casos febriles e infecciones. El objetivo del presente trabajo determinar el efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Ricinus communis* “higuerilla”, sobre el ADN de *Escherichia coli*. La determinación de genotoxicidad se realizó empleando el método “Tomasevich”, método en el cual el ADN de *Escherichia coli* fue enfrentado con los extractos a diferentes concentraciones, y el potencial genotóxico fue evaluado en función de la fragmentación y degradación del ADN bacteriano. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y semillas revelan presencia de catequinas, resinas, azúcares reductores, fenoles, aminoácidos, quinonas y alcaloides. Los resultados obtenidos muestran que el extracto hidroalcohólico de semillas a 100 mg/mL fragmentó el ADN bacteriano por encima del 95%, mientras que el extracto hidroalcohólico de hojas a 100 mg/mL fragmentó el ADN bacteriano entre un 20 al 40%. En conclusión, los extractos hidroalcohólicos de hojas y semillas de *Ricinus communis* presentaron efecto genotóxico frente a ADN de *Escherichia coli*, siendo el efecto genotóxico de las semillas superior al de las hojas.

Palabras clave: *Ricinus communis*, ADN de *Escherichia coli*, efecto genotóxico.

ABSTRACT

The leaves and seeds of *Ricinus communis* (higuerilla) are used in traditional medicine to treat digestive disorders, fever, and infections. The objective of this study was to determine the *in vitro* genotoxic effect of the hydroalcoholic extract of *Ricinus communis* (higuerilla) on *Escherichia coli* DNA. Genotoxicity was determined using the Tomasevich method, in which *Escherichia coli* DNA was challenged with extracts at different concentrations, and the genotoxic potential was evaluated based on the fragmentation and degradation of bacterial DNA. The secondary metabolites present in the hydroalcoholic extract of the leaves and seeds reveal the presence of catechins, resins, reducing sugars, phenols, amino acids, quinones, and alkaloids. The results obtained show that the hydroalcoholic extract of seeds at 100 mg/mL fragmented bacterial DNA by over 95%, while the hydroalcoholic extract of leaves at 100 mg/mL fragmented bacterial DNA by between 20% and 40%. In conclusion, the hydroalcoholic extracts of leaves and seeds of *Ricinus communis* showed a genotoxic effect against *Escherichia coli* DNA, with the genotoxic effect of the seeds being greater than that of the leaves.

Keywords: *Ricinus communis*, *Escherichia coli* DNA, genotoxic effect.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales en toda la historia de la humanidad se presentaron como una de las herramientas principales dentro del cuidado de la salud, ya que sus contenidos fueron representados desde la prehistoria en sus apariciones por los primeros escritos y pinturas rupestres como en China, apareciendo en este país, la primera obra de medicina en el mundo y es por ello que se considera a los jardines botánicos como sistemas de preservación de plantas, por otra parte, se tiene a Galenus en Roma, quien priorizó el uso de las plantas dentro de la medicina, por ello fue considerado padre de la farmacia, asimismo también reportó que algunas especies vegetales presentan toxicidad, de acuerdo a la cantidad consumida, por ello la importancia de llevar a cabo estudios que evalúen a las plantas como fuente de sustancias químicas tóxicas (Organización Panamericana de la Salud, 2024).

La higuera es una planta anual considerado como arbusto o árbol, la cual presenta en su composición química a la ricina, que por estudios previos se ha considerado como una de las proteínas con mayor efecto tóxico, presentando un mecanismo inactivador de los ribosomas RPs de tipo II, inhibiendo la síntesis de proteínas, por lo cual podría ser probable que también interactúe con las cadenas de nucleótidos del ADN, desarrollando alteraciones y/o mutaciones dependiendo de la concentración (Arboleda et al., 2012; Pacheco, 2009).

En la investigación de drogas vegetales y productos extractivos, se avalúan la calidad, eficacia y seguridad, con respecto a la seguridad, previamente se debe tener establecidos los aspectos de calidad como la composición química y la eficacia. Todo estudio de drogas vegetales debe abarcar composición química, bioactividad, eficacia y seguridad, puesto que los compuestos químicos presentes en una especie vegetal pueden no sólo tener propiedades bioactivas, si no también propiedades tóxicas, las cuales podrían generar efectos colaterales nocivos en las personas que lo consumen, en función a ello, el presente trabajo busca conocer el efecto genotóxico de hojas y semillas de *R communis* sobre el ADN aislado de *Escherichia coli*.

Los objetivos planteados son los siguientes:

Objetivo general

Determinar la genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Ricinus communis* “higuerilla”.

Objetivos específicos

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Ricinus communis* “higuerilla”
- Evaluar la genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y semillas de *Ricinus communis* “higuerilla”.
- Comparar la genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y semillas de *Ricinus communis* “higuerilla”.

CAPÍTULO II. DESARROLLO DE LA PERSPECTIVA TEÓRICA

2.1. Marco Referencial

2.1.1. Antecedentes Internacionales

Aslani et al. (2007), en el trabajo titulado “Toxicosis por ricino (*Ricinus communis*) en un rebaño de ovejas”. Tuvo como objetivo describir los hallazgos clínicos, de laboratorio y patológicos de ovejas intoxicadas con semillas de ricino. La fuente de intoxicación fue una mezcla de residuos de jardín. 45 animales presentaron toxicosis clínica y 17 murieron. Los signos clínicos observados incluyeron debilidad, salivación excesiva, diarrea acuosa intensa, deshidratación, dilatación de las pupilas (midriasis), rechinar de dientes, temperatura corporal baja (hipotermia) y la tendencia a permanecer en posición de decúbito. Los hallazgos hematológicos y bioquímicos más significativos fueron un alto hematocrito, una alta concentración de BUN, creatinina y fósforo séricos, y una alta actividad de 8 CK y AST séricos. La patología reveló graves problemas de salud que incluyeron una severa gastroenteritis, hemorragia y necrosis en el corazón, necrosis en el hígado y daño agudo en los túbulos renales de los riñones. El tratamiento incluyó cuidados sintomáticos y de apoyo con terapia de fluidos y administración de catárticos. Por otro lado, manifiesta que, la semilla de ricino debe mantenerse fuera del alcance de todo tipo de animales domésticos, y cuando la planta se cultiva con fines ornamentales, los frutos que contienen las semillas maduras deben ser removidos en otoño y guardados o destruidos de manera segura.

Audi et al. (2005), en su trabajo “Envenenamiento por ricina”. Tuvo como objetivo sintetizar la literatura sobre la intoxicación por ricina y proporcionar recomendaciones basadas en nuestro mejor juicio profesional para los médicos y los funcionarios de salud pública que se enfrentan a la liberación deliberada de ricina en el medio ambiente. Estudio que el envenenamiento por ricina involucra la ingestión de semillas de ricino e investigaciones experimentales en animales. La liberación de ricina en aerosol en el medio ambiente o la adulteración de alimentos y bebidas son vías de exposición que probablemente sean explotadas. Los síntomas después de la ingestión (inicio dentro de las 12 horas) son inespecíficos y pueden incluir náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal, y pueden progresar a hipotensión, fallo hepático, disfunción

renal y muerte debido a fallo multiorgánico o colapso cardiovascular. Se espera que la inhalación (inicio de los síntomas probablemente dentro de las 8 horas) de ricina produzca tos, disnea, artralgias y fiebre, y puede progresar a insuficiencia respiratoria y muerte, con pocas manifestaciones de otros sistemas de órganos. Los autores concluyen que, los trabajadores de la salud y los funcionarios de salud pública deben considerar la intoxicación por ricina en pacientes con enfermedades del tracto gastrointestinal o respiratorio en el contexto de una amenaza creíble. Los centros de control de intoxicaciones y las autoridades de salud pública deben ser notificados de cualquier enfermedad conocida asociada con la exposición a ricina.

Abbes et al. (2021), en su investigación “Intoxicación por ricina: una revisión sobre el origen de la contaminación, el diagnóstico, el tratamiento, la prevención y la notificación de la intoxicación por ricina”. Tuvo como objetivo la recopilación de estudios de casos humanos de intoxicación por ricina en todo el mundo. Se usaron las bases de información Pubmed, Sciencedirect y Google Scholar para extraer artículos desde enero de 1980 hasta junio de 2020. Tuvo como principales hallazgos de cincuenta pacientes intoxicados por ricina en todo el mundo descritos en la literatura. La mayoría de los casos se encontraron en Asia (19 casos), Europa (12 casos) y América (15 casos). La 9 intoxicación fue principalmente accidental (37 casos). La intoxicación por semillas de ricino se caracteriza por una enfermedad aguda tipo gastroenteritis como manifestaciones primarias que conducen a un grave desequilibrio de líquidos y electrolitos. El mecanismo de la muerte fue el colapso vascular periférico y el fallo múltiple de órganos que ocurre de 10 a 72 horas después de la intoxicación. El cuestionamiento de los pacientes y la familia permitió recuperar un historial de ingestión de semillas de ricino o aceite de ricino. Los pacientes recibieron tratamiento sintomático que consistió principalmente en rehidratación con líquidos intravenosos y descontaminación digestiva realizada con carbón activado y/o lavado gástrico dentro de un día después de la ingestión, para reducir la absorción gastrointestinal de la ricina. Este tratamiento de descontaminación administrado temprano ha sido muy efectivo. Solo se observaron seis muertes. Finalmente concluye, los clínicos y los profesionales de la salud deben tener un alto nivel de sospecha cuando se enfrenten a un brote de enfermedades respiratorias o gastrointestinales graves.

Ohishi et al. (2014), en su investigación “Ricinina: Un alcaloide de piridona de *Ricinus communis* que activa la vía de señalización de Wnt (sitio de integración relacionado con Wingless), a través de la caseína quinasa 1 α ”. Tuvo como objetivo

evaluar la activación de señalización de la vía Wnt a través de la caseína quinasa 1 α , mediada por la ricinina, para lo cual realizaron experimentos mediante los tallos de *R. communis* (Euphorbiaceae) fueron recolectados en Bangladesh. Evidenciaron que la señalización de Wnt juega un importante rol en la proliferación, diferenciación, desarrollo de células y diversas enfermedades. El fraccionamiento guiado por la actividad del extracto de MeOH del tallo de *R. communis* condujo al aislamiento de cuatro compuestos (1-4). Las actividades de transcripción de TCF/ β -catenina de 1 y 3 fueron 2,2 y 2,5 veces más altas a 20 y 30 μ M, respectivamente. Las células tratadas con ricinina (1) tenían niveles más altos de β catenina y menores niveles de p- β -catenina (ser 33, 37, 45, Thr 41) de proteína, mientras que los niveles de proteína quinasa 3 β de glucógeno sintasa (GSK3 β) y la quinasa 1 α de la caseína (CK1 α) permanecieron sin cambios. Las células tratadas con pirvinio, un activador de CK1 α , tenían niveles más bajos de β -catenina. Sin embargo, el tratamiento combinado de pirvinio y 1 condujo a niveles más altos de β catenina que los de las células tratadas solo con pirvinio, lo que sugiere que 1 inhibió la actividad de CK1 α . Además, 1 aumentó los niveles de proteína β -catenina en embriones de pez cebra. Estos resultados indicaron que 1 activó la vía de señalización Wnt al inhibir CK1 α .

Farooq et al. (2018), desarrollaron un estudio titulado “Actividades sedantes y anti nociceptivas de dos nuevos sesquiterpenos aislados de *Ricinus communis*”. Tuvo el objetivo de evaluar el efecto sedante y antinociceptiva a partir de sesquiterpenos de *R. communis* evaluado en ratas, en base a dos nuevos sesquiterpenos, denominados trivialmente ricinusoide A (1) y ricinusoide B (2), aislados de la fracción de acetato de etilo de *R. communis*. Las estructuras de los nuevos compuestos se elucidaron mediante técnicas espectroscópicas detalladas, incluyendo espectroscopía 1D- y 2D-NMR, UV, IR y espectrometría de masas. Los compuestos (1-2) también se evaluaron para determinar sus efectos sedantes y analgésicos in vivo en pruebas de campo abierto y contorsiones inducidas por ácido acético, respectivamente, a dosis de 5, 10 y 20 mg·kg⁻¹ administrados por vía intraperitoneal (IP). Evidenciaron que el pretratamiento con ambos compuestos de prueba causó una reducción expresiva ($p \leq 0,05$) en la actividad, como agentes sedantes, y en las constricciones abdominales, como analgésicos. Ambos compuestos (1-2) poseen efectos sedantes y antinociceptivos marcados en modelos animales.

Sitton & West (1975), en su investigación “Casbeno: un diterpeno antifúngico producido en extractos libres de células de plántulas de *Ricinus communis*”. Tuvo como

objetivo comparar la capacidad de extractos libres de células de plántulas de ricino de 2.5 días para sintetizar casbano a partir del ácido mevalónico en plántulas que habían germinado en condiciones estériles y plántulas que fueron expuestas intencionalmente a cultivos fúngicos. Los extractos de plántulas expuestas a cultivos de *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger* o *Fusarium moniliforme* produjeron niveles mucho más altos de casbano que los extractos de control estériles; las tasas iniciales de síntesis de casbano fueron 20-40 veces más altas en los extractos de plántulas que habían sido expuestas a hongos. Aunque se observó alguna variación en la capacidad de síntesis de otros hidrocarburos de diterpeno a partir del ácido mevalónico en los dos tipos de extractos, no se observó una estimulación consistente o notable en la síntesis de ninguno de ellos en estas condiciones de exposición de las plántulas a los hongos. El agar de papa y dextrosa utilizado como medio de crecimiento fúngico no provocó por sí solo el aumento en la síntesis de casbano. Las micelias intactas y los extractos libres de células de las micelias de *Rhizopus stolonifer* no dieron indicios de biosíntesis de diterpenos a partir del ácido mevalónico. El casbano purificado a concentraciones de 10 µg/ml o más retardó el desarrollo de *A. niger* en medio de papa y dextrosa. El casbano también se encontró que inhibía el crecimiento endógeno y estimulado por ácido giberélico de las vainas foliares del mutante dwarf-5 de *Zea mays* y del crecimiento de la cepa K12 de *Escherichia coli* en medio de glucosa-minerales. Se sugiere que el casbano puede servir como fitoalexina para la planta de ricino.

Li Fang Zheng, Fang Dai, Bo Zhou, Li Yang y Zhong-Li Liu (2008) investigaron como objetivo el efecto prooxidante de los ácidos hidroxicinámicos (HCA) en la rotura de la cadena de ADN. El estudio se enfocó en investigar cómo los ácidos hidroxicinámicos (HCA) afectan la integridad del ADN, examinando la ruptura del plásmido pBR322 en su forma superenrollada y el daño ocasionado al ADN de timo de ternera al interactuar con iones Cu(II). Un aspecto central de la investigación fue comprender la conexión entre la estructura molecular de los HCA y su capacidad para inducir estos efectos. Los HCA que se analizaron fueron el ácido cafeico (CaA), el ácido clorogénico (ChA), el ácido sinápico (SA), el ácido ferúlico (FA), el ácido 3-hidroxicinámico (3-HCA) y el ácido 4-hidroxicinámico (4-HCA). Mediante un enfoque experimental, se estableció que los compuestos que poseían un grupo orto-dihidroxilo (como el CaA y el Cha) o un grupo 4-hidroxi-3-metoxilo (como el SA y el FA) mostraron una capacidad significativamente mayor para dañar el ADN.

Los hallazgos indican que la transferencia de electrones entre los HCA y el Cu(II) es fundamental en el proceso reactivo. Además, se sugiere que el CaA y el Cha tienen la capacidad de unirse al Cu(II) mediante quelación, lo que facilitaría la transferencia de electrones dentro de la molécula. El estudio también demostró que las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los iones Cu(I) contribuyen al daño del ADN, y que este daño pudo ser reducido al añadir manitol, glutatión (GSH), catalasa y ácido batocuproinodisulfónico (BCDS).

Wachira et al. (2014) determinó la Toxicidad de seis extractos de plantas y dos alcaloides de piridona de *Ricinus communis* contra el vector de la malaria *Anopheles gambiae*. Se llevaron a cabo pruebas de alimentación con extractos de las plantas *Artemisia afra*, *Bidens pilosa*, *Parthenium hysterophorus*, *Ricinus communis*, *Senna didymobotrya* y *Tithonia diversifolia* para investigar sus posibles efectos tóxicos en hembras adultas. Adicionalmente, se evaluó la capacidad larvicida de estos extractos contra larvas de tercer estadio de *Anopheles gambiae s.s.*

Los resultados mostraron que los extractos de *T. diversifolia* y *R. communis* fueron los más tóxicos contra los mosquitos hembra adultos después de 7 días de alimentación, con valores de LC50 de 1.52 y 2.56 mg/mL, respectivamente. Se observó que la capacidad de los extractos para eliminar larvas se incrementó a medida que pasaba el tiempo de exposición. El extracto de *R. communis* fue el más efectivo, causando la mayor mortalidad larval después de 72 horas, con una concentración letal media (LC50) de 0.18 mg/mL. Los mosquitos alimentados con soluciones de los compuestos puros, 3-carboxi-4-metoxi-N-metil-2-piridona y ricinina, sobrevivieron casi tanto como los alimentados con el extracto de *R. communis*. Para concluir, los extractos de las seis especies de plantas demostraron diferentes niveles de actividad biológica contra las larvas y las hembras adultas de *Anopheles gambiae s.s.* *Tithonia diversifolia* y *Ricinus communis* fueron los extractos con mayor bioactividad tanto contra las hembras adultas como contra las larvas de este mosquito. Además, se observó que la vida de las hembras de *Anopheles gambiae s.s.* se acortaba a medida que aumentaba el tiempo de exposición a los dos compuestos puros evaluados.

Arboleda, Guzmán y Mejía (2012) evaluaron el efecto de extractos cetónicos de raíces, tallos, hojas y frutos de higuierilla (*Ricinus communis*) sobre el nematodo barrenador [*Radopholus similis*] en condiciones *in vitro*. Se obtuvieron extractos cetónicos utilizando el método de Soxhlet y se evaluaron sus efectos en tres concentraciones diferentes (25, 50 y 100%). Los resultados se compararon con grupos

de control que recibieron agua y con un tratamiento utilizando un nematicida químico, Carbofuran. Se aplicaron 2 mL de cada extracto a 50 hembras de *Radopholus similis* colocadas en placas de Petri. Transcurridas 48 horas, se evaluaron los efectos nematicida (mortalidad) y nemostático (inhibición de la actividad) bajo un diseño experimental completamente aleatorizado. Los extractos cetónicos obtenidos de frutos, raíces y hojas de higuera, utilizados a una concentración del 100%, demostraron una actividad nematicida que osciló entre el 73% y el 89%. Este efecto no fue significativamente diferente del observado con el nematicida químico (82-98%), pero sí fue considerablemente mayor en comparación con el grupo de control tratado con agua (0,7-12%). El análisis de Bradford confirmó la presencia de proteínas en los extractos cetónicos. El extracto obtenido de los frutos contenía la mayor concentración de albúmina, probablemente ricina, lo que se sugiere como un factor importante en la alta mortalidad observada en *Radopholus similis*.

2.1.2. Antecedentes Nacionales

López (2023), en su investigación “Estudio de toxicidad *in vitro* del extracto acuoso de *Physalis peruviana* (aguaymanto) sobre linfocitos humanos”. Tuvo el objetivo de evaluar el efecto genotóxico y citotóxico del extracto acuoso (EA) obtenido a partir de *P. peruviana* sobre cultivo de linfocitos humanos, para lo cual se utilizó un cultivo de linfocitos obtenido de sangre periférica de donantes, se expusieron a los linfocitos alrededor de 30 minutos a diferentes concentraciones (62,5; 100; 250 y 1000 µg/mL) del EA de hojas de *P. peruviana*, el peróxido de hidrógeno (300 µM) fue empleado como control positivo y buffer fosfato alcalino empleado como el control negativo, como resultado se obtuvo que el porcentaje de fragmentación de ADN sometido a diferentes concentraciones tuvieron diferencias significativas, resaltando el EA a 1000 µg/mL evidenciando un daño del 46 %, concluyeron que el EA de *P. peruviana* presentó un efecto genotóxico y citotóxico *in vitro* sobre cultivos de linfocitos.

2.1.3. Antecedentes Locales

Quispe (2017), en su investigación “Efecto genotóxico *in vitro* de látex y extracto hidroalcohólico de semilla de *Carica papaya* L. “papaya” frente a ADN genómico humano”. Tuvo el objetivo de evaluar su capacidad para causar daño en el ADN genómico humano en un entorno de laboratorio. Se obtuvieron muestras de látex y semillas de la planta y se sometieron a varios procedimientos. Posteriormente, se llevó

a cabo un examen exhaustivo de los compuestos químicos incluidos en el látex y el extracto, junto con evaluaciones de su potencial para causar daños genéticos. Se utilizaron diversas concentraciones del látex y del extracto para exponer el ADN genómico de linfocitos humanos. La evaluación del daño genotóxico se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa con una solución de bromuro de etidio al 1% y exposición a la luz ultravioleta con el sistema de imágenes UV solo TS de Biometra. El látex y el extracto hidroalcohólico de semillas de papaya mostraron genotoxicidad contra el ADN genómico humano en un entorno *in vitro*.

Montes (2017), en su investigación “Efecto genotóxico *in vitro* del látex de plantas medicinales de uso dérmico *Argemone mexicana* L. “cardo santo” y *Taraxacum officinale* “diente de león”. Ayacucho, 2017”. Tuvo el objetivo de evaluar su capacidad para causar daño en el ADN genómico humano, especialmente en el contexto de tratamientos dérmicos. Los resultados del estudio revelaron que el látex de estas plantas posee propiedades genotóxicas, lo que significa que puede dañar el ADN genómico humano. Además, se descubrió que los metabolitos secundarios del látex contenían una cantidad notable de alcaloides, compuestos fenólicos y taninos. Específicamente, se observó que el látex de *Argemone mexicana* L., cuando estaba presente en concentraciones que oscilaban entre 10 mg/mL y 100 mg/mL, exhibía un potente impacto genotóxico sobre el ADN genómico humano. Además, la fragmentación del ADN fue inducida por dosis de látex de *Taraxacum officinale* de 100 mg/mL y 50 mg/mL. El estudio concluye que el látex de estas plantas medicinales utilizadas en tratamientos dérmicos presenta propiedades genotóxicas en el ADN genómico humano, y se observa una relación entre la concentración del látex y su efecto genotóxico.

Ataucusi Oré (2020) investigó el efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña” frente al ADN genómico humano. Se obtuvieron extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos de la planta “urqu muña” mediante la técnica de maceración. Posteriormente, se evaluó su potencial genotóxico *in vitro* empleando el “Método Tomasevich” y la técnica de electroforesis en gel de agarosa. El análisis cualitativo reveló una presencia abundante de taninos y/o fenoles en las hojas y tallos de la planta. También se identificaron flavonoides (en cantidad regular en hojas y solo trazas en tallos), catequinas (en concentración regular en hojas y baja en tallos), saponinas (en cantidad regular en hojas y ausentes en tallos), y alcaloides (solo trazas tanto en hojas como en tallos). La cantidad de ADN genómico humano se midió mediante espectrofotometría UV,

obteniéndose concentraciones elevadas y niveles de pureza considerados aceptables. El extracto hidroalcohólico de hojas causó una ligera disminución en la concentración de ADN a partir de 25 mg/mL, lo que sugiere fragmentación. Esta fragmentación se confirmó al observar una reducción en la intensidad y la fragmentación del ADN tratado con proteinasa K. En cuanto a los tallos, la degradación del ADN comenzó a ser evidente a partir de una concentración de 200 mg/mL. El análisis estadístico reveló que las diferentes concentraciones de los extractos afectaron la intensidad de las bandas de ADN, y que el nivel de fragmentación del ADN genómico humano variaba según la concentración del extracto utilizado. En conclusión, el efecto genotóxico de los extractos hidroalcohólicos de *Clinopodium brevicalex* “urqu muña” sobre el ADN genómico humano está directamente relacionado con la concentración, siendo significativo en las hojas a partir de 25 mg/mL y en los tallos a partir de 200 mg/mL.

Ayala Pérez (2014) investigó el efecto genotóxico *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de *Spartium junceum* L. "retama", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto" sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*. La metodología empleada fue de tipo experimental y *diseño in vitro*. Los extractos se obtuvieron mediante maceración y su potencial genotóxico se analizó utilizando electroforesis en gel. El estudio también identificó la presencia de metabolitos secundarios en estos extractos y evaluó el daño que causaban al ADN de *Staphylococcus aureus* tras la exposición.

Marca Yupanqui (2018) realizó una investigación en Ayacucho, Perú, con el objetivo de determinar la genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum* L. “ajo” frente a ADN de *Staphylococcus* sp. La metodología empleada fue de tipo experimental y *diseño in vitro*. En este estudio, se utilizaron *Allium sativum* L. “ajo” y *Staphylococcus* sp. como organismo modelo y población de estudio, respectivamente. Las muestras analizadas fueron el extracto etanólico y el zumo del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”, así como el ADN de *Staphylococcus* sp. El análisis estadístico se fundamentó en la observación y categorización del patrón de fragmentación del ADN visualizado mediante electroforesis. Los hallazgos revelaron que el extracto etanólico de *Allium sativum* L. “ajo” no indujo daño genético en el ADN de *Staphylococcus* sp. Sin embargo, el zumo obtenido del bulbo de ajo demostró tener un efecto genotóxico potente sobre el material genético bacteriano.

2.2. Marco Teórico

2.2.1. *Ricinus Communis*

Clasificación Taxonómica

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	MALPIGHIALES
FAMILIA	:	EUPHORBIACEAE
GÉNERO	:	<i>Ricinus</i>
ESPECIE	:	<i>Ricinus communis</i>
NOMBRE VULGAR	:	“higuerilla”

Descripción Botánica

Planta anual perenne, puede medir hasta 6 m de altura. Su color varía de verde claro a azul-grisáceo, y a veces puede mostrar tonalidades rojizas en ciertas estaciones. El tallo es denso y ramificado. Sus hojas son alternas, tienen pecíolos y son palmeadas, con 5 a 11 lóbulos dentados y una nervadura similar a la de una mano abierta (nervación palmatinervia). Las flores femeninas tienen periantos de 4-8 mm, mientras que las masculinas tienen de 6-12 mm. Raíz profunda y enraizada. El fruto son cápsulas subglobosas con espinas gruesas y cortas. Una cubierta sedosa cubre las semillas elípticas, brillantes, de color gris y marrón (Anadón et al., 2018).

Distribución Geográfica

Posiblemente África, ampliamente distribuido en los trópicos de ambos hemisferios (Anadón et al., 2018).

Propiedades y Usos Medicinales

Las semillas tienen función como laxante, vermífugo, el aceite como purgante y por vía oral (Liévano, 2008).

Composición Química

Estudios previos han identificado algunos compuestos presentes en la hoja de *R. communis*. Ver tabla 1.

Tabla 1*Metabolitos secundarios presentes en la hoja de R. communis.*

Familia	Metabolito secundario
Flavonoides	Compuestos glicosilados derivados del kaempferol y quercetina; glucopiranosidos, epicatequina, rutina,
Alcaloides	Ricinina y la N_dimetilricinina
Monoterpenos	1,8 cineol, α pineno y alcanfor
Sesquiterpenos	Ácido oleico, linoleico, ricinoleico, hexadecanoico, esteárico; β cariofileno, α y β amirina.
Ácidos fenólicos	Ácido gálico, elágico, gentísico,
Fitatos	Ácido palmítico y lupeol.

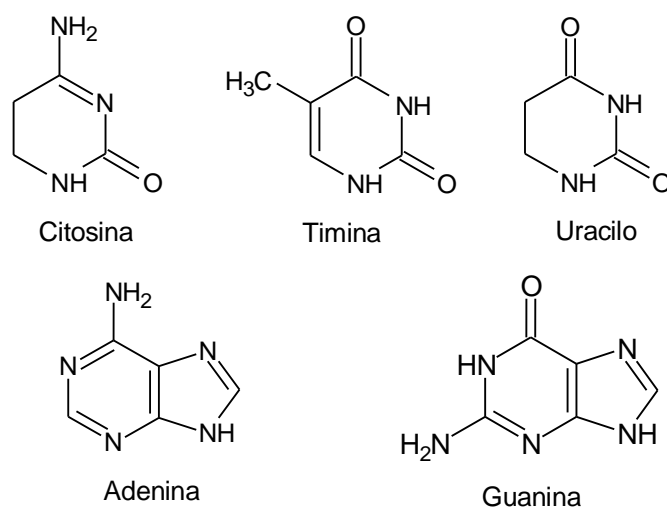
Nota. Obtenido de (Abomughaid et al., 2024)

2.2.2. Ácidos Nucleicos

Hay dos tipos: el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ribonucleico (ARN), diferenciados por el ácido fosfórico que presentan, son considerados polinucleótidos, osea, moléculas dispuestas poliméricamente conformadas por la secuencia de unidades monoméricas sencillas (mononucleótidos), quienes se mantienen enlazados por un tipo de enlace fosfodiéster o diéster fosfórico (Lozano et al., 2005).

Bases Nitrogenadas, Nucleósidos y Nucleótidos

Estos componentes estructurales son derivados de bases nitrogenadas de carácter básico: pirimidina y purina. Bases pirimidínicas son timina (T), citosina (C), y uracilo (U); purínicas son guanina (G) y adenina (A), derivando en esencia por la sustitución de átomos de hidrógeno, reemplazando por radicales hidroxilo o aminas en posiciones diferentes del anillo purínico o pirimidínico, respectivamente (Lozano et al., 2005).

Figura 1*Estructura química de las bases nitrogenadas.*

Ácido Desoxirribonucleico (ADN o DNA) Genómico Humano

El ADN, que tiene forma de doble hélice y está formado por dos hebras de nucleótidos unidas entre sí, es el principal depósito de toda la información genética del cuerpo humano. Un grupo fosfato, una base nitrogenada y una desoxirribosa constituyen los componentes de los nucleótidos, que son los ladrillos fundamentales del ADN. Existen cuatro bases diferentes, que se denotan con las letras C, T, A y G respectivamente: citosina, timina, adenina y guanina. Debido a la naturaleza complementaria de estos pares de bases (guanina con citosina y adenina con timina), la alineación de una cadena dicta automáticamente el orden de toxicidad y genotoxicidad de la otra (Ayala, 2014).

2.2.3. Toxicidad y Genotoxicidad

Toxicidad

La toxicidad se refiere a la capacidad de una sustancia química de tener consecuencias perjudiciales o adversas en un organismo vivo tras una exposición directa. Estos efectos pueden variar en gravedad y pueden afectar la salud de un individuo de diferentes maneras, desde irritaciones leves hasta daño orgánico grave o incluso la muerte, dependiendo de la sustancia y la dosis de exposición. La toxicidad es un concepto importante en la toxicología, la ciencia que estudia los efectos nocivos de las sustancias químicas en los organismos vivos y su evaluación. Un compuesto es considerado tóxico si tiene la capacidad de producir efectos perjudiciales, ya sea de forma natural o artificial (Armstrong, 2022).

Genotoxicidad

Las pruebas de genotoxicidad se utilizan para evaluar la capacidad de sustancias químicas o agentes físicos para causar daño en el material genético de un organismo, ya sea de manera directa o indirecta, a través de varios mecanismos. Estas pruebas pueden llevarse a cabo tanto *in vitro* (en un entorno de laboratorio, fuera del organismo) como *in vivo* (en organismos vivos). Las pruebas de genotoxicidad es identificar y evaluar los compuestos que tienen el potencial de causar daño genético antes de que se produzca la exposición en seres humanos. Estas pruebas son fundamentales en la evaluación de la seguridad de productos químicos, alimentos, medicamentos, y en la identificación de carcinógenos potenciales. Detectar el potencial genotóxico de una sustancia antes de su uso o exposición es esencial para proteger la salud humana y prevenir riesgos para la población (Cáceres et al., 1987).

Evaluación de Genotoxicidad

La genética toxicológica explora los efectos de las sustancias químicas y las radiaciones sobre la salud, centrándose específicamente en sus propiedades mutagénicas. Estos mutágenos pueden provocar mutaciones genéticas, aberraciones cromosómicas estructurales y aberraciones cromosómicas numéricas. Además de los mecanismos de reparación del ADN, la genética toxicológica estudia los cambios en el ADN, como la formación de aductos, la alquilación de bases y la intercalación de bases, que pueden aumentar la susceptibilidad a numerosos mutágenos. La genotoxicidad de las sustancias químicas y las radiaciones incluye la recombinación mitótica y meiótica. En resumen, la genética toxicológica busca comprender cómo ciertas sustancias y radiaciones pueden dañar el material genético y cómo esto puede afectar la salud humana (Hoffman, 1996).

Las plantas medicinales deben seguir los mismos estándares y regulaciones que se aplican a los fármacos en general cuando se trata de evaluar su genotoxicidad. Esto implica que, al evaluar los posibles efectos genotóxicos de extractos de plantas medicinales, se deben seguir protocolos y ensayos *in vitro* que estén validados a nivel internacional y que sean capaces de medir daños en los niveles de mutaciones cromosómicas y genéticas. La genotoxicidad de las plantas medicinales es una preocupación importante, ya que su uso terapéutico puede tener implicaciones directas en la salud de las personas. Por lo tanto, es esencial realizar evaluaciones rigurosas para determinar si estos extractos pueden causar daño genético en el ADN humano. Al utilizar ensayos *in vitro* validados, se busca obtener resultados precisos y confiables que ayuden a evaluar la seguridad de las plantas medicinales y a tomar decisiones informadas sobre su uso terapéutico (Sánchez et al., 2000).

La importancia de las guías y rutas críticas utilizadas en todo el mundo para llevar a cabo estudios genotóxicos. El objetivo principal de estas investigaciones es determinar el nivel específico de organización del ADN en el que se produce el daño inducido por la sustancia probada. Para ello, se reconocen cuatro etapas principales:

Mutación génica: Este primer nivel se refiere a cambios o mutaciones en los genes individuales, que implican alteraciones en uno o pocos pares de bases del ADN. Las pruebas y ensayos en este nivel se centran en evaluar si el compuesto evaluado puede causar mutaciones específicas en genes.

Mutación cromosómica: En este segundo nivel, se investigan las alteraciones en la estructura de los cromosomas, como cambios en la organización y la forma de los

cromosomas. Estas pruebas se centran en evaluar si el compuesto puede inducir aberraciones cromosómicas.

Daño primario del ADN: Este tercer nivel se enfoca en evaluar si el compuesto puede causar daño directo al ADN, como la formación de aductos, alquilación de bases o intercalación de bases. Estas alteraciones afectan la estructura del ADN mismo.

Transformaciones celulares: Este cuarto nivel implica estudiar si el compuesto evaluado puede provocar transformaciones en las células, como la iniciación de procesos cancerígenos. Se busca entender cómo el daño genético puede llevar a cambios en la función celular y a la transformación celular maligna.

Las pruebas de mutaciones genéticas y cromosómicas se utilizan con frecuencia, en particular las pruebas *in vitro* debido a su gran sensibilidad y precisión. Recientemente, las evaluaciones de genotoxicidad se han ampliado para incluir pruebas principales de daños en el ADN.

En resumen, las rutas y guías crucial para la investigación genotóxicos buscan comprender a qué nivel se produce el daño genético causado por una sustancia y utilizan una variedad de pruebas para evaluar estos efectos. Esto es esencial para determinar la seguridad de las sustancias y proteger la salud humana (Peña et al., 1990).

El proceso de evaluación de genotoxicidad es un enfoque escalonado y riguroso que incluye tanto pruebas *in vitro* como pruebas *in vivo* para determinar la seguridad de una sustancia en relación con su capacidad para causar daño genético. Aquí se resumen los pasos clave en este proceso:

Pruebas *in vitro*: Se realizan inicialmente pruebas *in vitro* para evaluar la genotoxicidad de la sustancia. Esto puede incluir ensayos que miden mutaciones genéticas y aberraciones cromosómicas. Si los resultados de estas pruebas *in vitro* son negativos y no muestran evidencia de genotoxicidad, se procede al siguiente paso.

Pruebas *in vivo*: Durante el segundo paso, se realizan pruebas *in vivo* para evaluar los niveles de daño genético que se evaluaron previamente en las pruebas *in vitro*.

Esto implica la exposición de organismos vivos, como animales de laboratorio, a la sustancia en cuestión. Estos estudios en animales permiten evaluar la genotoxicidad en un contexto más cercano a las condiciones del cuerpo humano.

Evaluación de daño primario al ADN: Si tanto las pruebas *in vitro* como las pruebas *in vivo* no muestran evidencia de genotoxicidad, se pueden realizar ensayos adicionales para evaluar el daño primario al ADN. Estos ensayos buscan determinar si

la sustancia causa daño directo al ADN, como la formación de aductos o alquilación de bases.

Otras alteraciones y carcinogenicidad: Dependiendo de los hallazgos conseguidos en las pruebas anteriores, se pueden llevar a cabo ensayos adicionales para evaluar otras alteraciones celulares y la carcinogenicidad potencial de la sustancia. Esto implica estudiar si la sustancia tiene el potencial de inducir cáncer en los organismos expuestos.

Cumplimiento de protocolos normalizados: Es de suma importancia seguir protocolos validados internacionalmente a la hora de realizar pruebas y evaluar los niveles de daños. Estos protocolos garantizan que las pruebas se realicen de forma coherente y fiable. Se tienen en cuenta diversos factores, como la dosis, el tipo de exposición y la vía de administración propuesta del fármaco.

En resumen, el proceso de evaluación de genotoxicidad es un enfoque riguroso que involucra múltiples etapas, desde pruebas *in vitro* hasta pruebas *in vivo* y ensayos específicos para evaluar el daño al ADN. El uso de protocolos estandarizados es esencial para garantizar la validez y la comparabilidad de los resultados en todo el proceso de evaluación (Sánchez et al., 2000).

Los hallazgos *in vitro* mencionados son instrumentos cruciales en el ámbito de la investigación científica para detectar la genotoxicidad primaria. Cada una de ellas se utiliza para evaluar diferentes aspectos del daño genético y son ampliamente utilizadas en estudios de genotoxicidad. Aquí se explica brevemente cada una de ellas:

Aberraciones cromosómicas: Este ensayo se utiliza para identificar cambios en la estructura de los cromosomas, como roturas cromosómicas, fragmentación y fusión de cromátides. Estas alteraciones pueden ser indicativas de genotoxicidad y daño en el ADN.

Intercambio de cromátides hermanas: Este ensayo evalúa la capacidad de las cromátides hermanas (las dos copias de un cromosoma) para intercambiar material genético. Si se observan intercambios anormales, puede ser un indicio de genotoxicidad.

Micronúcleos: Los micronúcleos son pequeñas estructuras nucleares que se pueden encontrar fuera del núcleo principal de una célula. Su presencia puede ser un indicador de daño cromosómico y genotoxicidad. Se pueden contar y evaluar como parte de los estudios de genotoxicidad. (Miranda et al., 2015)

Síntesis de ADN no programada: Este ensayo se centra en la capacidad de las células para sintetizar ADN de manera no programada en respuesta al daño genético. La detección de síntesis de ADN no programada puede indicar que se ha producido daño en el ADN. (Miranda et al.,2015)

Electroforesis de una célula: El ensayo del cometa permite evaluar el daño al ADN en una célula individual. Las células se someten a un campo eléctrico y el ADN dañado se mueve hacia la dirección del ánodo, creando una "cola" de cometa visible. La longitud y la intensidad de la cola del cometa son indicativos del grado de daño genético. (Miranda et al.,2015)

Estas determinaciones *in vitro* son valiosas para identificar genotoxicidad en las etapas iniciales de la evaluación de una sustancia. Proporcionan información importante sobre el daño genético potencial causado por una sustancia y son parte integral de la evaluación de la seguridad de productos químicos, fármacos y otros compuestos en relación con su impacto en el material genético (Peña et al., 1990).

El "método Tomasevich" es una variante del "ensayo cometa" utilizado para evaluar la genotoxicidad. Ideó esta técnica para establecer el impacto genotóxico de las plantas de uso médico y/o los compuestos fitoterapéuticos sobre el ADN genómico en un entorno de laboratorio. Según él, es importante identificar qué parte de la planta, como frutos o semillas, hojas, flores, tallos, se utiliza en la elaboración de remedios caseros. A continuación, se puede obtener el extracto de la parte elegida, ya sea en forma de extracto a base de agua, alcohol u otro disolvente orgánico. (Miranda et al., 2015)

A continuación, se detallan los pasos para llevar a cabo estas preparaciones:

Preparación de Soluciones del Extracto:

Se deberá pesar la muestra de la planta sobre un contenedor adecuado (ámbar), diluir con el solvente adecuado hasta obtener la concentración inicial requerida, posteriormente se deberá diluir con el mismo solvente para conseguir concentración variadas para utilizarse en el ensayo. (Miranda et al.,2015)

Preparación del ADN Genómico:

Se deberá obtener muestras de ADN proveniente de origen microbiano o animal, será extraído seguido de procesos detallados en el kit comercial de extracción de ADN, se realizará una medición de la concentración del ADN espectrofotométricamente, se utilizará una concentración stock para posteriormente exponerla a las diferentes concentraciones del extracto de la planta en estudio para

evaluar daño en el ADN genómico, evaluado espectrofotométricamente. (Miranda et al.,2015)

Preparación de los Tubos de Ensayo:

Se emplearán 10 tubos de ensayo debidamente enumeradas, del 1-7 (ADN expuestos al extracto), tubo 8 (blanco); tubo 9 (control) y el tubo 10 (proteínasa K).

Incubación

La incubación será necesaria y se realizará al menos 1 a 4 horas, este proceso es necesario para que los compuestos presentes en los tubos de ensayo interacciones y se genere algún efecto sobre el ADN.

Electroforesis:

Posterior a la incubación, se llevarán las muestras sobre un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio agregado, se someterá a electroforesis a 40 V alrededor de 3 horas, este proceso permite la división de los fragmentos de ADN conforme a sus respectivos tamaños.

Visualización y Registro:

Posterior a la electroforesis, se utilizará un transiluminador con radiación de luz UV, con lo cual veremos el ADN como mancha fluorescente iluminado bajo esta luz, se harán tomas para realizar comparación entre las corridas de las muestras de los 7 tubos con las corridas realizadas por el control y blanco, con el fin de evaluar si hubo o no fragmentación, este proceso es analítico y nos permitirá la determinación del efecto genotóxico del extracto en estudio. (Miranda et al.,2015)

2.2.4. Electroforesis en Gel de Agarosa

Uso: Se usa principalmente para dividir fragmentos de ADN y ARN de tamaño moderado a grande, generalmente en el rango de 50 pares de bases (pb) a 40.000 pb. Es ideal para examinar el producto de digestiones con enzimas de restricción, realizar análisis de PCR y verificar la integridad de fragmentos genéticos más grandes.

Características: Los geles de agarosa se preparan mediante la disolución de agarosa en un tampón adecuado y se vierten en una bandeja de gel horizontal. Cuando la agarosa se solidifica, se forma una matriz de gel tridimensional con poros de tamaño variable. El ADN o ARN se carga en pocillos en la parte superior del gel y se somete a un campo eléctrico horizontal. Las moléculas migran a través del gel y se separan según su tamaño. La agarosa es más fácil de manipular y menos tóxica que la poliacrilamida.

Resolución: Tiene una resolución moderada y no puede separar moléculas que difieran en tamaño en menos de aproximadamente 50 pb. El tamaño de los poros de la agarosa determina esta limitación.

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida:

Uso: Se usa cuando se requiere una alta resolución y separación de fragmentos de ADN o ARN de tamaño pequeño a mediano, generalmente en el rango de 5 pb a 600 pb. Es esencial para analizar fragmentos que difieren en una o unas pocas bases y para aplicaciones de secuenciación de ADN de Sanger.

Características: Poliacrilamida en geles se preparan mediante la polimerización de monómeros de acrilamida en presencia de un agente de reticulación. Esto forma una matriz de gel muy fina y uniforme. Los geles de poliacrilamida se corren de forma vertical en una caja de electroforesis especializada. Esta técnica es más compleja que la electroforesis en gel de agarosa y requiere una mayor atención a la seguridad debido a la toxicidad de los monómeros de acrilamida. (Miranda et al., 2015)

Resolución: Tiene una alta resolución y puede separar fragmentos de ADN que difieren en una o unas pocas bases. La resolución se debe a la fina matriz de gel de poliacrilamida, que permite una separación más precisa.

En resumen, la elección entre electroforesis en gel de agarosa y poliacrilamida depende de la aplicación específica y el tamaño de los fragmentos que se desean separar y analizar. Los geles de agarosa son ideales para tamaños más grandes y aplicaciones generales, mientras que los geles de poliacrilamida son esenciales cuando se requiere alta resolución y precisión en la separación de fragmentos de ADN o ARN más pequeños (Khan Academy, 2024).

2.2.5. Espectrofotometría

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que se basa en la absorción de radiación electromagnética por las moléculas. Esta técnica permite evaluar la concentración en solución de un compuesto. Para medir la cantidad de luz absorbida por una solución y determinar la longitud de onda de la luz que puede atravesarlo se utiliza un espectrofotómetro (Díaz et al., 2010).

La capacidad de captar la luz de una determinada longitud de onda tiene el ADN, que es de 260 nanómetros. Como resultado, la cantidad de ácidos nucleicos presentes en una muestra puede determinarse utilizando este método. Si la densidad óptica (DO) es 1, esto equivale a una cantidad de ADN en la hebra de aproximadamente 50 g/ml. Por lo tanto, no hay necesidad de una curva estándar para determinar la

concentración de ADN en una muestra, ya que es posible calcular la concentración de ADN en una muestra simplemente midiendo su absorbancia 12). Además, se puede utilizar la relación entre las lecturas a 280 nm y 260 nm para estimar la pureza del ADN o evaluar la contaminación en la preparación del mismo. Un intervalo ideal para la relación es entre 1,8 y 2,0. La espectrofotometría es la técnica preferida para la cuantificación cuando el material es puro. Las proteínas tienen un pico de absorción a 280 nm, debido sobre todo a la presencia de residuos de triptófano. Por lo tanto, una medición realizada a esta longitud de onda específica podría sugerir la existencia de impurezas proteicas en la muestra (Lock, 1994; Quispe, 2017).

2.3. Marco Conceptual

2.3.1. ADN

Es la molécula fundamental que guarda la información genética de los seres vivos. Está compuesto por una doble hélice de nucleótidos (base nitrogenada, desoxirribosa, fosfato) y es esencial para la replicación, transcripción y herencia. Su daño puede generar disfunciones, mutaciones o muerte celular, destacando la importancia de evaluar su posible afectación por compuestos. (Real Academia Nacional de Medicina, s. f.). (Ayala, 2014).

2.3.2. Extracto Hidroalcohólico

Es una preparación que resulta de macerar o percolar material vegetal en una solución de agua y etanol. Esta mezcla de solventes permite extraer diversos compuestos de la planta, tanto hidrosolubles como liposolubles (ej., flavonoides, alcaloides, etc), cuya presencia y concentración final dependen de la polaridad de dichos compuestos y de la proporción agua-alcohol en la mezcla. (Tituaña Pulluquitin et al., 2018).

2.3.3. *In Vitro*

Se refiere a experimentos realizados fuera de un organismo vivo, en condiciones controladas de laboratorio (ej., tubos de ensayo, placas de Petri). Permite estudiar efectos genotóxicos directamente sobre el ADN o células bacterianas, facilitando el aislamiento y evaluación de una sustancia sin la complejidad de un sistema biológico completo, a diferencia de los estudios *in vivo*. (Real Academia Nacional de Medicina, s. f.).

2.4. Marco Ético y Legal

No aplica

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Alcance de la Investigación

Investigación básica, explicativo

3.2. Diseño de la Investigación

Experimental

3.3. Unidad de Análisis

ADN genómico de *Escherichia coli*. a concentración de 1500 ng/μL por cada ensayo

3.4. Población de Estudio

Estuvo conformada por las plantas aparentemente sanas de *Ricinus communis* “higuerilla”, que crecen en zonas aledañas de la ciudad universitaria UNSCH.

3.5. Muestra

Un kilo de hojas y un kilo de semillas de *Ricinus communis* “higuerilla”, que crecen en zonas aledañas de la ciudad universitaria UNSCH.

3.6. Criterios de Selección

3.6.1. Criterios de Inclusión

Recolección de plantas sanas de *Ricinus communis* “higuerilla” que crecen en zonas de la ciudad universitaria UNSCH.

3.6.2. Criterios de Exclusión

Se excluyen las hojas y semillas de *Ricinus communis* “higuerilla” que muestren signos de enfermedad, daños o que hayan sido tratadas con algún tipo de sustancia química.

3.7. Instrumentos de Recolección de Datos

3.7.1. Recolección y Secado de la Muestra Vegetal

Las muestras fueron recopiladas en la Ciudad Universitaria de la UNSCH. Las muestras fueron reunidas en la madrugada y transportadas rápidamente al Laboratorio de Farmacognosia y Biología Molecular. Allí, se secaron a temperatura ambiente en un área sombreada, utilizando papel Kraft como sustrato. El papel fue reemplazado varias veces para asegurar un secado adecuado y evitar cualquier degradación causada por la humedad. (Anexo 2).

Después de dejar secar la muestra, se redujo a la consistencia de un polvo fino machacándola en un mortero. A continuación, se obtuvieron los extractos hidroalcohólicos. Para la clasificación taxonómica se usaron las plantas que tenían flores, semillas y hojas que correspondían a la planta. Esta determinación se realizó en el Laboratorio de Botánica de la FCB y fue validada por la Blga. Laura Aucasime Medina. (Anexo 3)

3.7.2. Elaboración del Extracto Hidroalcohólico de Hojas y Semillas Inicial

Los 100 g de hojas y semillas secas fueron pulverizados por separados, después se macero por separado en un frasco ámbar alrededor de 7 días, el solvente se compuso de agua y etanol en una proporción de (1:3), se agitó durante 15 minutos, 2 veces por día, con el fin de conseguir la homogenización.

Luego, la muestra se filtró, se colocó en un vaso precipitado en una estufa Memmert a 37 °C para la evaporización del solvente y conseguir el extracto seco el cual será utilizado como muestra para los ensayos de tamizaje fitoquímico y genotoxicidad.

De igual forma se procedió con la muestra seca y pulverizada de la semilla de la higuera (Anexo 2).

3.7.3. Identificación Fitoquímica

Explicar los procedimientos para ejecutar el tamizaje fitoquímico con la finalidad de determinar a cada metabolito secundario presentes en la muestra del extracto (Anexo 3,4,5).

3.7.4. Extracción de ADN Genómico a partir de *Escherichia coli*

Inicialmente se reactivó la cepa de *Escherichia coli* en caldo nutritivo, seguidamente se sembró en agar nutritivo con la finalidad de obtener biomasa microbiana y proceder a la obtención del ADN genómico. El protocolo se describe a continuación:

- Se vertieron 400 µL de buffer TE 1X a un tubo transfiriendo 100 mg de *E. coli*, incubación a 85° C (25 min.), en baño maría.
- Se añadió lisozima (10 mg/mL) en 60 µL, incubado a 37° C (2 horas) en baño maría.
- La mezcla de SDS/proteinasa K (75 µL SDS 10% + 5 µL PK 10 mg/mL) fue vertida en el tubo e incubó por 15 minutos a 65° C.

- Se agrega 100 μ L NaCl (5M) y 5 μ L de CTAB (N-cetil-N, N, N-Trimetil bromuro de amonio), incubado a 65° C (15 min).
- Se preparó una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), homogenizado y centrifugado (15 min / 14 000 rpm), trasvasar el sobrenadante a otro tubo.
- Se agregó 600 μ L isopropanol frío (100%), incubación a -20° C (12 horas – noche), luego se centrifuga (15 min / 14 000 rpm).
- Se lavó el sedimento con 1 mL de etanol (70%), centrifugado (10 min / 14 000 rpm).
- Se desechó el sobrenadante y se rehidrató el sedimento con 50 μ L de agua bidestilada estéril.
- Se añadió μ L ARNasa (20 mg/ μ L), incubado a 37 °C (1 hora)
- Se almacenó el ADN obtenido a – 20 °C.

3.7.5. Cuantificación de ADN Genómico de E. coli

Por Espectrofotometría

Procedimiento:

1. En el proceso de homogeneización de muestras de ADN fueron lentamente mezcladas 10 veces con una micropipeta de 100 μ L.
2. Se preparó el Eppendorf BioPhotometer plus, un espectrofotómetro UV, para la cuantificación del ADN.
3. La superficie del adaptador se limpió utilizando 2 μ L de agua bidestilada estéril, que se retiró después de un minuto utilizando papel de seda. Este procedimiento se repitió para mejorar la limpieza.
4. Una vez más, se aplicó a la superficie del adaptador una capa de agua bidestilada estéril de 2 microlitros. Se eligió la opción "BLANK" para calibrar un valor de 0,000 A (amperio), que corresponde a una absorbancia nula. Se utilizó un papel tisú secante para eliminar cualquier resto de agua y, a continuación, se depositó una muestra de ADN de 5 L. A continuación, se introdujo el tapón factor 50 – Longitud de partículas (Lp) ,2 mm y se eligió la opción MUESTRA para poder mostrar en la pantalla del instrumento los resultados del análisis de pureza y cuantificación del ADN. A continuación, se retiró la muestra utilizando papel de seda.
5. El procedimiento de cuantificación de cada muestra de ADN se realizó una vez más durante las etapas 4 y 5.

6. “Tras completar la cuantificación del ADN, se aplicaron 10 μL de agua bidestilada estéril sobre la superficie del adaptador. Después de un minuto, se secó el agua con papel de seda y se apagó el equipo”.

Por Electroforesis

Procedimiento:

1. Cada muestra de ADN se cargó con un gel de agarosa al 1,0% para el procedimiento de creación de cantidades de carga para electroforesis (ver Tabla 1).
2. Se vertió todo el contenido de cada combinación en los pocillos del gel de agarosa con una concentración del 1,0%, y se colocaron los pocillos en los carriles que correspondían a esas combinaciones.
3. En este punto, se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de alimentación y se ajustó para que funcionara a una tensión de 40 voltios durante un periodo de 40 min.
4. Para ver las bandas de ADN, el gel de agarosa. El gel de agarosa se lavó con agua después de 20 min en bromuro de etidio al 1%. Se tomaron fotografías con cámaras digitales Canon 20x de 12,1 megapíxeles Full HD. Las bandas de ADN genómico se observaron utilizando un transiluminador Ultra Lum UV.

Tabla 2

Preparación de concentraciones de ADN a diferentes concentraciones para patrones de banda en electroforesis.

N° de carril en gel de agarosa	ADN stock (μL)	Buffer loading 6x (μL)	Volumen de agua PCR (μL)	Volumen final de carga (μL)
1	4	1	7	12

3.7.6. Ensayos de Genotoxicidad *in vitro*, “Método Tomasevich”

Se desarrolló siguiendo el “Método Tomasevich” (ensayo cometa modificado) propuesto por Miranda (2015), el cual consta de las siguientes fases.

Fase I: Cuantificación y Preparación de Stock de ADN Genómico de *Escherichia coli*

Se utilizó un espectrofotómetro UV de la marca Eppendorf BioPhotometer plus a fin de determinar la cantidad de ADN genómico extraído. A continuación, se creó un caldo con una concentración de 1500 mg/L y un volumen final de 150 L a cada ensayo.

Fase II: Prueba de Genotoxicidad “*in vitro*” de ADN Genómico *Escherichia coli*

Se prepararon soluciones de extracto hidroalcohólico de 100, 50, 25, 10 y 5 mg/mL de concentración usando agua bidestilada. Las soluciones se desarrollaron específicamente para la evaluación de la genotoxicidad *in vitro* del ADN genómico, teniendo en cuenta los siguientes factores:

Tabla 3

Preparación de las soluciones para el ensayo de genotoxicidad in vitro del extracto de Ricinus communis “higuerilla” sobre ADN genómico Escherichia coli.

Mezclas con Extracto para Ensayo de Genotoxicidad <i>in vitro</i>								
N° de tubo	1	2	3	4	5	<u>6</u> B	<u>7</u> C	<u>8</u> c/PK
Stock de ADN (1 500ng/μL)	14	14	14	14	14	-	20	14
Volumen en μL								
Concentración (%)	5	10	25	50	100	100	-	100
Extracto								
Volumen (μL)	6	6	6	6	6	20	-	6
Proteinasa K	-	-	-	-	-	-	-	3
Volumen total (μL)	20	20	20	20	20	20	20	23
Incubación en baño María a 37 °C						1 hora		

Fase III. Electroforesis para la Detección de Genotoxicidad

Se utilizó la cámara de electroforesis Biometra para fabricar y acondicionar un gel de agarosa a una concentración del 1%. Se utilizaron las siguientes cantidades para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa:

Tabla 4

Preparación de soluciones de ADN genómico con hojas y semillas de Ricinus communis “higuerilla” para el ensayo de genotoxicidad in vitro.

Condiciones		Volúmenes de cargar para ensayo de genotoxicidad								
N° de carril de gel		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Muestra de ADN	Concentración (%)	Marcador molecular	5	10	25	50	100	B	C	c/P K
Extracto	Volumen (µL)	r	5	8	8	8	8	8	8	8
Loading (µL)			2	2		2	2	2	2	2
Volumen total			7	10	10	10	10	10	10	10

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

Luego, se preparó la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se realizó la corrida a 40 voltios (V) por 3 horas.

Fase III. Electroforesis para la Detección de Genotoxicidad

Tras la electroforesis, el gel de agarosa se tiñe al sumergirlo en una solución de bromuro de etidio al 1%, con lo que el ADN del gel se tiñe. Luego, se enjuaga el gel para eliminar el exceso de tinte y se coloca en un sistema de registro de imágenes, en este caso, el sistema Biometra UVsoloTS. Bajo radiación UV, el ADN teñido con bromuro de etidio emite fluorescencia y se pueden observar las bandas de ADN en el gel. Esto permite analizar y documentar los fragmentos de ADN producidos como resultado de la genotoxicidad.

Fase V: Interpretación y Clasificación del Registro Visual de Genotoxicidad

Los valores numéricos que representan las cantidades de fragmentación del ADN, que son indicativos de genotoxicidad y pueden observarse en el registro fotográfico, se calibraron basándose en el sistema de categorización establecido por Collins (2004) y Speit (1995) en la tesis de Larrea Poma.

Tabla 5

Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN, clasificados por registro visual.

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

Nota. Obtenido de (Larrea, 2013)

Todo este procedimiento se realizó con cuatro repeticiones, para la verificación de los resultados y la reproducibilidad del método de la evaluación de la genotoxicidad. Siendo factible la representación visual del tamaño de banda de los tratamientos comparados con la banda del control.

3.8. Análisis de Datos

Todos los datos obtenidos se agruparon para presentar en tablas, evidenciados en las fotografías de los geles de agarosa que contenía los productos. La genotoxicidad se procesó mediante el paquete estadístico SPSS mediante la prueba de Kruskal- Wallis para realizar la medición del porcentaje de fragmentación de más de dos muestras independientes. Se consideró el valor de $p \leq 0,05$, como el nivel estadísticamente significativo.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

Tabla 6

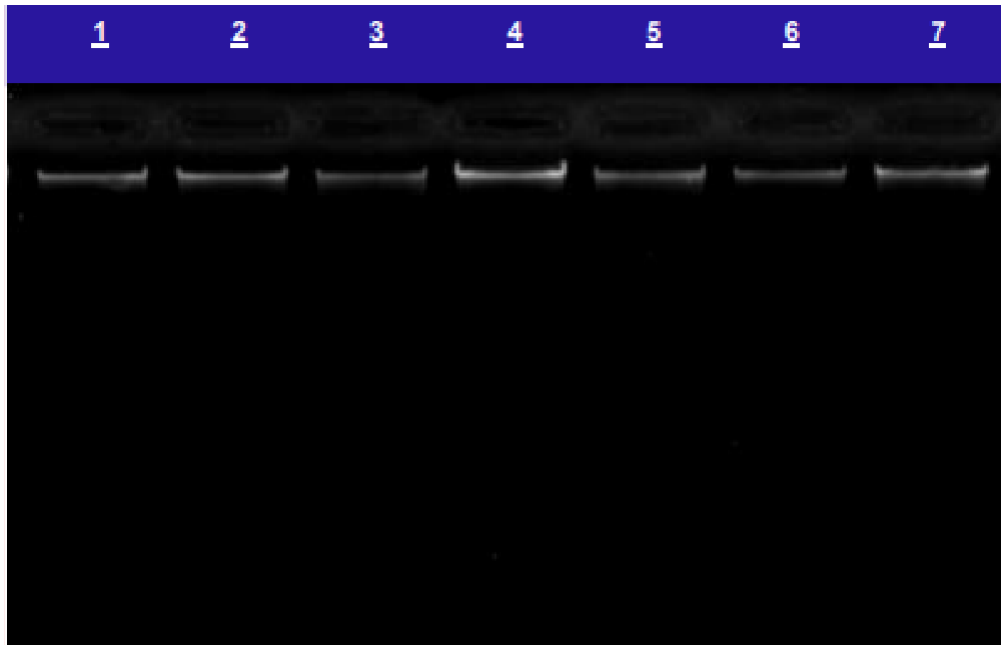
Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas y semillas de Ricinus communis “higuerilla”. Ayacucho, 2023.

Metabolitos secundarios	Ensayos	hojas	semillas	Observaciones
Catequina	Carbonato de sodio	+++	+++	Mancha verde carmelita
Resinas	Alcohol	+++	+++	Formación de precipitado
Azúcares reductores	Fehling	+++	+++	Coloración roja
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	+++	++	Coloración naranja
Triterpenos y esteroides	Lieberman	+++	++	Coloración verde oscuro
Flavonoides	Shinoda	+++	++	Coloración roja
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+++	+++	Coloración verde intenso
Aminoácidos	Ninhidrina	+++	+++	Coloración azul violáceo
Quinonas	Borntranger	+++	+++	Coloración roja
Saponinas	Espuma	-	-	No hay cambio
Glicósidos cardiotónicos	Kedde	-	-	Coloración naranja
Alcaloides	Dragendorff	++	++	Turbidez

Nota. (-): ausencia; (+): leve; (++) : moderado; (+++): abundante

Figura 2

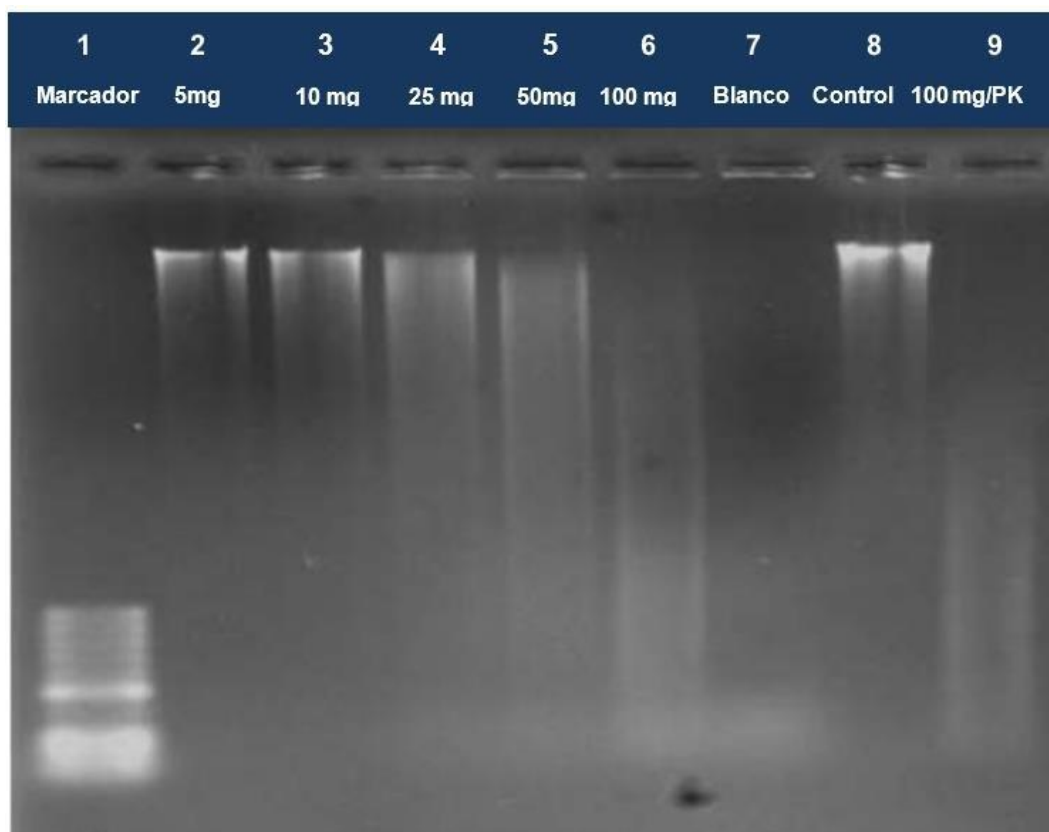
Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1% de 7 muestras del ADN genómico *Escherichia coli* y coloreado con bromuro de etidio. Ayacucho 2023



Nota. “Volumen de carga: Muestra 4 μ L + Loading 6X 1 μ L + 3 μ L agua PCR”. “Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante una hora”. “Coloración de ADN: Bromuro de Etidio al 1% durante quince minutos”

Figura 3

Ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de semillas de *Ricinus communis* “higuerilla” a diferentes concentraciones (5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL) sobre el ADN genómico *E. coli*, a 37 °C después de una hora de incubación. Ayacucho 2023.



Nota.

Carril N° 1: Marcador de tamaño molecular

Carril N° 2: Con 5 mg/mL

Carril N° 3: Con 10 mg/mL

Carril N° 4: Con 25 mg/mL

Carril N° 5: Con 50 mg/mL

Carril N° 6: Con 100 mg/mL

Carril N° 7: Extracto puro de semillas (blanco)

Carril N° 8: ADN puro (control)

Carril N° 9: Con 100 mg/mL + proteinasa K

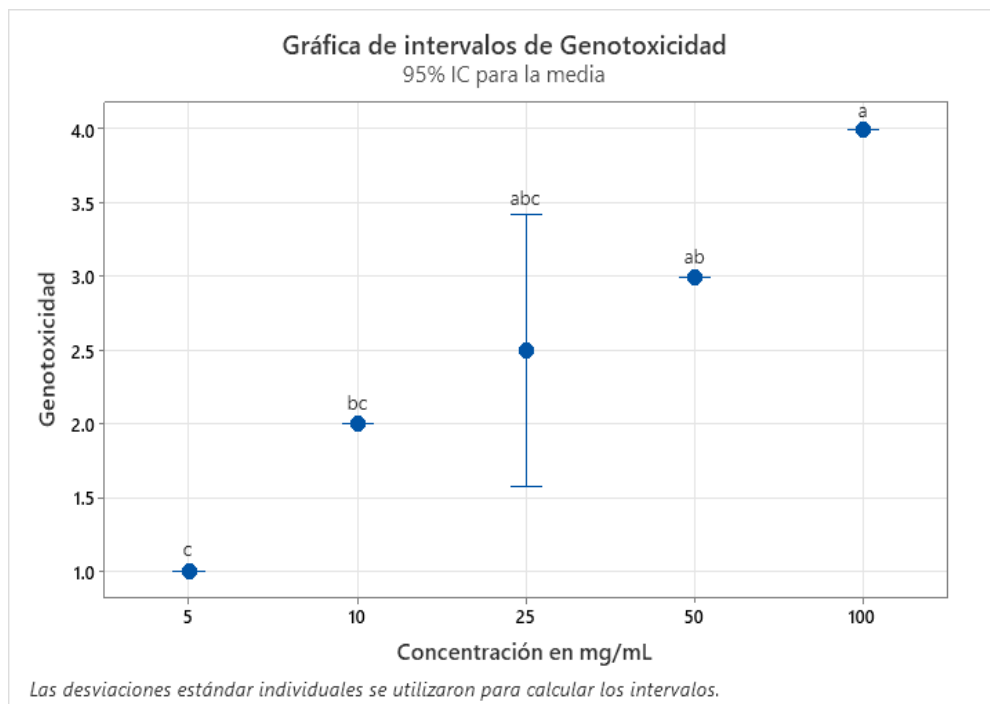
Volumen de carga: Muestra (8 μ L) + loading (1 μ L) + agua PCR (1 μ L) = 10 μ L.

Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 3 horas.

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

Figura 4

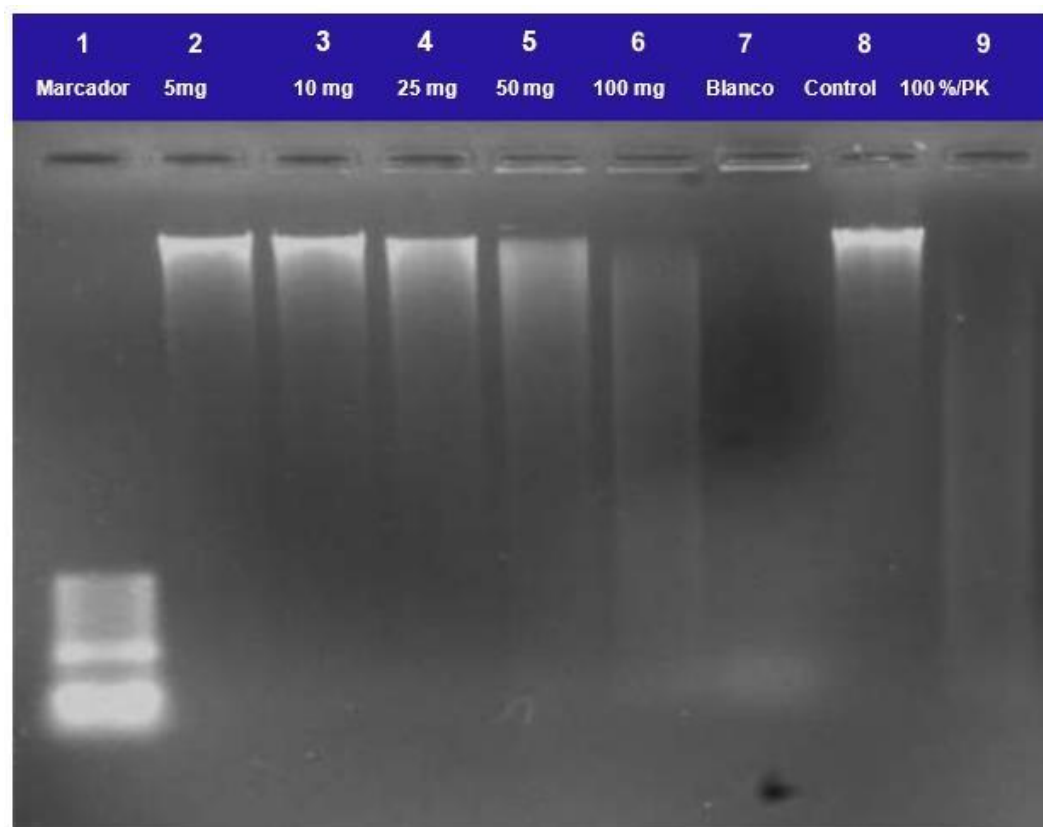
Genotoxicidad expresada en porcentaje de fragmentación del ADN de Escherichia coli por efecto del extracto hidroalcohólico de las semillas de Ricinus Communis.



Kruskal-Wallis (H=16,69, GL=4, p=0,002)

Figura 5

Ensayo de genotoxicidad in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas de Ricinus communis “higuerilla” a diferentes concentraciones (5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL) sobre el ADN genómico E. coli, a 37°C después de una hora de incubación. Ayacucho 2023.



Nota.

Carril N° 1: Marcador de tamaño molecular

Carril N° 2: Con 5 mg/mL

Carril N° 3: Con 10 mg/mL

Carril N° 4: Con 25 mg/mL

Carril N° 5: Con 50 mg/mL

Carril N° 6: Con 100 mg/mL

Carril N° 7: Extracto puro de semillas (blanco)

Carril N° 8: ADN puro (control)

Carril N° 9: Con 100 mg/mL + proteinasa K

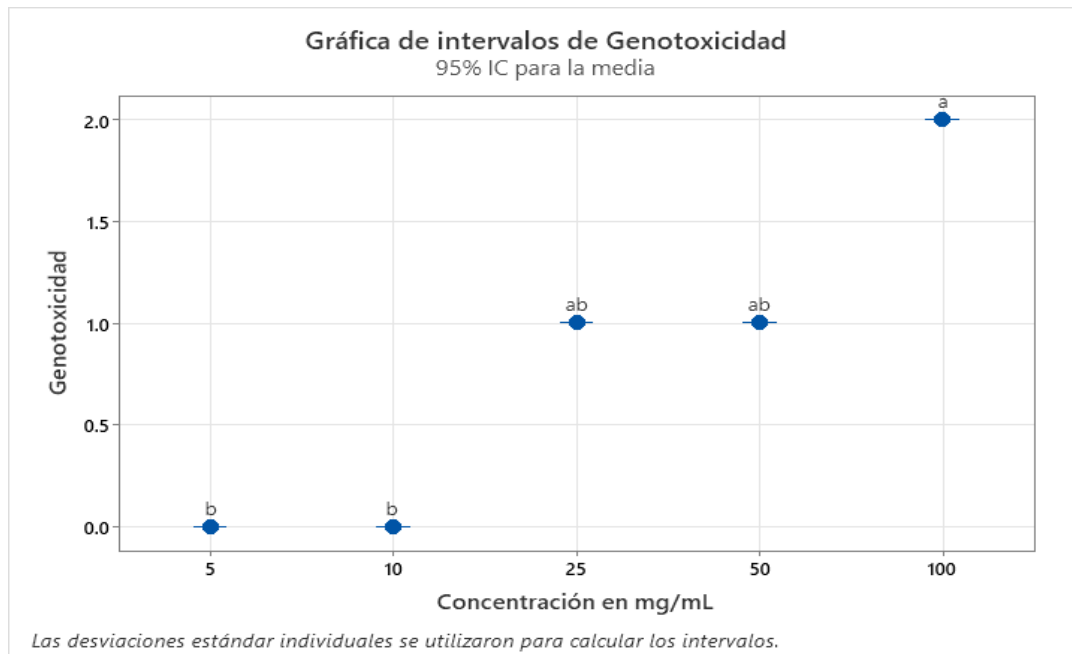
Volumen de carga: Muestra (8 μ L) + loading (1 μ L) + agua PCR (1 μ L) = 10 μ L.

Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 3 horas.

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

Figura 6

Genotoxicidad expresada en porcentaje de fragmentación del ADN de Escherichia coli por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de Ricinus Communis.



“Prueba de Krus kal-Wallis (H=16,69, GL=4, P=0.002);

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

El empleo de las plantas medicinales se ha desarrollado a través de tiempos inmemoriales, incluso considerándose a esto como la base del origen de la medicina moderna, puesto que los compuestos químicos presentes en las plantas fueron y serán una fuente de compuestos para sintetizar fármacos. El uso tradicional de las plantas medicinales se viene aun manifestando en los pueblos andinos y amazónicos como infusiones y/o extractos para mitigar algunos problemas de salud; sin embargo, el uso desmedido de estas plantas podría estar afectando a los que lo consumen, puesto que todavía no se ha logrado identificar todos los compuestos presentes, en muchos casos es posible que el compuesto terapéutico podría desarrollar también un efecto tóxico.

En la **tabla 5**, se observa que en el extracto de las hojas de *R. communis* presenta en abundancia catequinas, resinas flavonoides, fenoles, aminoácidos libres, azúcares reductores, lactonas y/o cumarinas y alcaloides. El resultado concuerda de acuerdo a lo que reporta (Abomughaid et al., 2024), puesto que se han logrado identificar flavonas derivados de kaempferol y quercetina; entre los compuestos fenólicos reportan a monoterpenos, sesquiterpenos, derivados del ácido gálico, ácido elágico, epicatequina y el ácido gentísico; los en alcaloides tenemos a la ricinina y N-desmetilricinina (Abomughaid et al., 2024). Por otro lado, (Ribeiro et al., 2016), en su revisión menciona que las hojas también presentan compuestos fenólicos como como la vitexina y ácido vainílico; cumarinas como la escopoletina, isofraxidina; esteroides como campesterol, derivados del citosterol, derivados del estigmasterol y lupeol.

La **tabla 6**, reporta que el extracto de las semillas de *R. communis* presenta abundancia de catequinas, resinas, azúcares reductores, fenoles, aminoácidos; moderadamente presenta flavonoides, lactonas y/o cumarinas, triterpenos y/o esteroides y alcaloides.

El resultado también concuerda con (Abomughaid et al., 2024), quién en su trabajo reporta la presencia de flavonoides (derivados glicosilados de la quercetina, kaempferol), taninos, monoterpenos, triterpenos, ácido gálico, epicatequina, catequina; entre ácidos grasos se reportan a los ácidos dihidroxiesteáricos, esteárico, ricinoleico y isoricinoleico. (Ribeiro et al., 2016), en su revisión menciona que las semillas también

presentan compuestos como la vitexina; alcaloides ricinina y nudiflorina; ácidos grasos como linoleato y ricinoleato de metilo.

La imagen registrada de la **figura 2**, corresponde a la corrida del ADN de *E. coli* en 7 carriles, donde se observan claramente la nitidez de luminiscencia de las bandas de ADN, lo que indica que el ADN se encuentra íntegro y concentraciones adecuadas dentro de los pocillos para realizar los ensayos correspondientes a genotoxicidad.

La imagen de la **figura 3**, pertenece al ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de semillas de *Ricinus communis* “higuerilla”, frente al ADN de *Escherichia coli*. Se fundamenta que al realizarse la corrida sobre el gel de agarosa en el cual están los tratamientos del extracto y el ADN, estos al encontrarse en el equipo del transiluminador, hacen que se genere una fluorescencia a consecuencia de que el bromuro de etidio se ha intercalado en la cadena de ADN entre cada par de bases nitrogenadas, esta fluorescencia determina la concentración e integridad del ADN; por lo que, tienen una relación directamente proporcional la intensidad lumínica con la concentración e integridad del ADN; mientras que al disminuir la intensidad lumínica correspondería a que la molécula de ADN fue fragmentada.

Por ello, el carril 1, es el indicador del tamaño de la molécula (1kb), evidenciando bandas de ADN bien definidas y separadas. A partir del carril 2 al 6 se sometió al ADN a diferentes concentraciones del extracto de semillas donde se evidenció el grado de fragmentación del ADN, donde en el carril 2, a una concentración de 5 mg/mL a fragmentado al ADN entre 5 al 20%; el carril 3, a una concentración de 10 mg/mL se muestra la fragmentación del ADN entre 20 al 40%; los carriles 4 y 5, corresponden a las concentraciones de 25 y 50 mg/mL del extracto, respectivamente, determinando que se fragmentó el ADN en un 40 al 95% y el carril 6, pertenece a una solución de 100 mg/mL, el cual fragmentó al ADN en más del 95%. En el carril 7 “blanco”, se realizó una corrida del extracto de semillas a 100 mg/mL, aquí se evidencia la ausencia de fluorescencia con el bromuro de etidio puesto que no hay presencia de ADN que provengan de las semillas, puesto que si habría, generaría una interpretación ambigua en los resultados. El carril 8 “control”, es la corrida realizada por el ADN, sin ninguna solución del extracto, se observa la fluorescencia nítida, esto se debe al bromuro de etidio que se ha intercalado en el ADN compacto sin roturas, esta corrida nos ayuda a diferenciar de la intensidad de fluorescencia relacionada con la cantidad de ADN en comparación con los carriles donde el ADN se sometió a diferentes concentraciones del

extracto se de semillas. El carril 9, se manifiesta la corrida del ADN sometido con la muestra a 100 mg/mL conjuntamente con la proteinasa K (PK), lo que al observar determinamos la degradación completa del ADN muestra que la actividad degradativa se debe a metabolitos secundarios y no a las enzimas nucleasas vegetales presentes en el extracto, puesto que la PK es una enzima inhibidora de las nucleasas, las cuales podrían estar presente en el extracto; sin embargo, al ser inhibidas por la PK, la fragmentación del ADN solo sería por actividad de los metabolitos secundarios.

La imagen de la **figura 5**, pertenece al ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Ricinus communis* “higuerilla”, frente al ADN de *Escherichia coli* . Se determinó, el carril 1, corresponde al indicador del tamaño molecular de 1kb, muestra diversas bandas de ADN separadas y bien definidas entre sí. A partir del carril 2 al 6 se sometió al ADN a diferentes concentraciones del extracto de semillas donde se evidencio el grado de fragmentación del ADN, donde en los carriles 2 y 3, a concentraciones de 5 y 10 mg/mL, respectivamente, se muestra una fragmentación ADN inferior al 5%, en los carriles 4 y 5, a concentraciones de 25 y 50 mg/mL se muestra la fragmentación del ADN entre 5 al 20%; en el carril 5 a una concentración de 100 mg/mL, determina que el ADN fue fragmentado entre 20 al 40%. El carril 7, corresponde a la corrida del extracto de semillas a 100 mg/mL, aquí se observa que no hay fluorescencia con el bromuro de etidio puesto que no hay presencia de ADN que provengan de las semillas, puesto que si habría, generaría confusión en la interpretación de los resultados, esto nos sirve como “blanco”. El carril 8, es la corrida realizada por el ADN sin tratamiento alguno “control”, se observa la fluorescencia nítida, esto se debe al bromuro de etidio que se ha intercalado en el ADN compacto sin roturas, esta corrida nos ayuda a diferenciar de la intensidad de fluorescencia relacionada con la cantidad de ADN en comparación con los carriles donde el ADN se sometió a diferentes concentraciones del extracto se de semillas. El carril 9, se manifiesta la corrida del ADN sometido con el extracto metanólico (EM) de 100 mg/mL conjuntamente con la enzima proteinasa K (PK), lo que al observar determinamos la degradación completa del ADN muestra que la actividad degradativa se debe a metabolitos secundarios y no a las enzimas nucleasas vegetales presentes en el extracto, puesto que la PK es una enzima inhibidora de las nucleasas, las cuales podrían estar presente en el extracto; sin embargo, al ser inhibidas por la PK, la degradación del ADN solo sería por acción de los metabolitos secundarios.

El porcentaje de fragmentación observado en las figuras 3 y 5, se determinó haciendo uso de los niveles de fragmentación del ADN mediado por el registro visual y conjuntamente con los valores numéricos de los anexos 9 y 11, respectivamente para cada figura, el cual utilizando la serie escalar de la tabla 4, se aprecia que, a mayor número de clase, mayor será el grado de fragmentación. Los resultados también se corroboraron mediante un estadístico de prueba de Kruskal – Wallis, que siendo una prueba no paramétrica mide diferencias o similitudes entre grupos, esta prueba comparó el grado de fragmentación del ADN en *E. coli*, manifestado en porcentaje, con la concentración del extracto de *R. communis* "higuerilla", también presentada en porcentaje. Los resultados se ilustran en la figura 6. El nivel de fragmentación del ADN en la *E. coli* tratada indica el grado de genotoxicidad. Esto nos llevó a proponer la hipótesis nula (H_0) de que el total de las medianas son idénticos, lo que sugiere que las distintas dosis del extracto tuvieron un impacto idéntico. Por otra parte, la hipótesis alternativa (H_1) postula que existe una diferencia en al menos una mediana, lo que significa que mínimo una concentración del extracto tiene un impacto distinto. Los hallazgos de la Figura 6 muestra $P = 0,002$ y $GL = 4$, $H = 16,69$, rechazando la hipótesis nula (H_0) y aceptando H_1 , ya que el valor P fue inferior a $0,05$. La concentración de extracto de *Ricinus communis* "higuerilla" determina el grado de fragmentación del ADN en la *E. coli* tratada. La fragmentación del ADN tratado fue similar a concentraciones de extracto de 50, 25, 10 y 5 mg/mL.

A partir de los resultados obtenido, se observa que los extractos de semillas y hojas presentan actividad genotóxica dependiente de concentración sobre el ADN genómico de *E. coli*, por otro lado, se observa que las semillas presentan un mayor efecto genotóxico, puesto que el grado de fragmentación del extracto de semillas a 100 mg/mL fue superior al 95%, mientras que a 100 mg/mL del extracto de hojas fragmentó entre 20 al 40%, estos resultados concuerdan con lo reportado por (Sabitha & Fatima, 2022), quienes también evaluaron el efecto genotóxico de semillas y hojas de *R. communis*, quienes también obtuvieron resultados del grado de fragmentación del ADN es proporcional a la concentración del extracto, a su vez concluyen que los compuestos presentes en las hojas evidencian una genotoxicidad leve, mientras que los compuestos de las semillas evidencian una genotoxicidad alta, evaluados sobre ADN genómico de *E. coli*.

El *R. communis* presentan estudios que han determinado la presencia de sustancias químicas nocivas como el caso del alcaloide ricinina, considerada como una de las toxinas letales que derivan a partir de las semillas de *R. communis*(Abomughaid et al., 2024), por otro lado, varios estudios reportan también la presencia de ricina, que es una glicoproteína abundante en las semillas de *R. communis*, esta sustancia se ha estudiado por (Kumar et al., 2007), quién evaluó la genotoxicidad de la ricina, donde en su trabajo reportó que hubo un aumento en la fragmentación del ADN posterior a una dosis de 0,5 de ricina; otras toxinas tenemos a las aglutinina. Estas menciones amplían el panorama sobre el resultado obtenido reafirmando que el extracto de semillas es más genotóxico que el extracto de hojas de *R. communis*. En la práctica común la ricina de las semillas es mucho más nociva si se llegan a utilizar las semillas sin procesar, por lo que su uso desmedido podría ser letal, tal como se reportado de un incidente mortal causado por una muerte presunta de suicidio de un hombre de 49 años, quien habría consumido semillas de *R. communis*, donde a pesar de recibir atención médica oportuna falleció por fallas multiorgánica.

Con respecto a la hoja, los estudios previos indican que también presentan sustancias tóxicas como la lecitina (fosfolípido) y la aglutinina que presentaron actividad citotóxica (Abomughaid et al., 2024), asimismo, un estudio realizado por (Wachira et al., 2014), quien aisló dos alcaloides del tipo piridona de las hojas de *R. communis*, presentaron un efecto tóxico; (Nemudzivhadi & Masoko, 2014), realizaron un estudio sobre la citotoxicidad sobre líneas celulares de macrófagos Raw 264.7, a partir de las fracciones del extracto metanólico de hojas de *R. communis*, siendo dependiente de la concentración a su vez la fracción de diclorometano y del extracto metanólico mostraron un CL₅₀ bajo, según lo mencionado podríamos inferir que los compuestos solubles en diclorometano poseen un actividad citotóxica, en relación a nuestro trabajo, los alcaloides son solubles en diclorometano, por ello, la ricinina podría ser responsable del daño genotóxico.

En otros estudios sobre el efecto genotóxico, se ha evaluado al zumo obtenido del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”, en el cual se utilizó ADN de *Staphylococcus* sp., reportándose que el grado de fraccionamiento del ADN fue proporcional a la concentración del zumo de *A. sativum*, reportando que a 100 mg/mL de concentración la genotoxicidad fue potente(Marca, 2018), en otra investigación, fue evaluado el extracto de tipo hidroalcohólico de tallos y hojas de *Clinopodium brevicalex* Epl. “urqu muña”, sobre el ADN de humanos, reportando que a una concentración de 500 mg/mL

de presento un mayor efecto genotóxico (Ataucusi, 2020); asimismo, el extracto de tipo hidroalcohólico obtenido a partir de tallos y hojas de *Artemisia absinthium* L. "ajenjo" sobre el ADN de humanos, reportando que el extracto de hojas a concentraciones de 300, 400 y 500 mg/mL fraccionaron por encima del 95% del ADN; también el extracto de tipo hidroalcohólico de *Juglans neotropica* "nogal", evaluado sobre ADN humano y el ADN *S. aureus*, reportando que a 100 mg/mL el grado de fragmentación fue mayor al 95% sobre ambos tipos de ADN (Cervantes, 2019), finalmente también se ha evaluado el extracto de tipo hidroalcohólico de las vainas de *Spartium junceum* "retama" y de las hojas de *Eucalyptus globulus* "eucalipto", evidenciando alto porcentaje de fraccionamiento (más del 95%), a concentraciones de 100 y 50 mg/mL (Ayala, 2014); incluso se ha evaluado un extracto mixto a partir de *Cinchona* spp, *Zingiber officinale* y *Eucalyptus globulus*, el cual a una concentración del 100 mg/mL, fue la que evidenció un mayor grado de fragmentación del ADN de *E. coli* (Rivera, 2024). En todos los estudios mencionados, el grado fragmentación del ADN utilizado para cada estudio fue directamente proporcional a la concentración de la muestra a evaluar, estos resultados están relacionados con lo obtenido en presente trabajo realizado; por otro lado, estas plantas fueron mencionadas por ser utilizadas comúnmente para tratar diversos problemas vegetales para realizar las comparaciones fueron seleccionadas de acuerdo al uso común que se dan para tratar ciertos problemas de salud en medicina tradicional alrededor de la región de Ayacucho; por ello, es muy evidente que el uso de estas plantas en tiempos prolongados y no controlados podría desarrollar efectos tóxicos y genotóxicos.

No se ha esclarecido el mecanismo por el cual desarrolla la genotoxicidad; no obstante, se ha intentado asociar este efecto a los metabolitos secundarios presentes en las plantas, que en muchas investigaciones son los responsables de la actividad terapéutica, en otras investigaciones a dosis elevadas o prolongadas, origina problemas negativos (Rivera, 2024), se menciona que algunos flavonoides, cumarinas y naftoquinonas son los responsables del efecto genotóxico a dosis elevadas (Demma et al., 2009), este estudio concuerda con lo mencionado por (de Carvalho et al., 2003), quien indica que algunos flavonoides, presenta efecto genotóxico, es especial por flavonoides que presenten en su estructura una sustitución por -OOH, en los carbonos número 7 y 3, del anillo A y B, respectivamente, estas variaciones son las que desarrollan un daño sobre el ADN, sin embargo, es necesario estudios más profundo para esclarecer esta afirmación. Por otro lado, un estudio determino que la epigallocatequina (flavonoides),

desarrolló daño a nivel cromosómico en células (WIL2-NS), a 100 $\mu\text{mol/L}$, lo que se infirió de que algunos flavonoides actúan también como prooxidantes al ser expuesto a un amplio suministro de moléculas de oxígeno (Sugisawa & Umegaki, 2002). Entre otros compuestos fenólicos se logró determinar que los ácidos hidroxicinámicos a condiciones específicas desarrollan un efecto prooxidante sobre el ADN (Zheng et al., 2008), asimismo, el ácido gálico presentó un mayor efecto prooxidante en comparación con el ácido cafeico y rosmarínico, lo cual se explica por la formación de radicales libres (superóxido y el semiquinona), en condiciones específicas, estos radicales son los responsables directos sobre el daño genómico y cromosómico (Eghbaliferiz & Iranshahi, 2016).

En cuanto a otros fitoquímicos, (Louisse et al., 2019), estudio a los alcaloides de núcleo pirrolizidina y su efecto genotóxico, en el cual evidenció que diversos compuestos que presenten un diéster abierto en su estructura, tuvieron mayor efecto genotóxico sobre células hepáticas humanas, entre las que destaca la riddelliina;(Henriques et al., 1991), menciona que los alcaloides como la reserpina, boldina, queleretrina, skimmianina y voacristina, tienen estudios que abalen su efecto genotóxico. Los estudios mencionados indica que algunos metabolitos secundarios podrían desarrollar efectos genotóxicos por mecanismos determinados aún por ser esclarecidos, mientras que otros tienen un efecto prooxidante generando mutagenicidad; a pesar de no contar con la certeza de que estos compuestos están presentes en el extracto de semillas y hojas de *R. communis*, se podría inferir que posiblemente existan otros agentes químicos responsables del efecto genotóxico, puesto que el tamizaje realizado se ha identificado la presencia de alcaloides, saponinas, cumarinas, flavonoides etc., por ello se colige que mediado de una acción sinérgica, estos fitoquímicos podrían ser los responsables de fragmentar a ADN genómico de *E. coli*. Finalmente, el efecto genotóxico determinado *in vitro* del extracto hidroalcohólico de semillas y hojas de *Ricinus communis* “higuerrilla”, frente al ADN de *Escherichia coli*, posiblemente se deba a los metabolitos secundarios que se encuentran presentes en el extracto (tabla 5 y 6), entre los que destaca triterpenos, flavonoides, resinas, fenoles, aminoácidos, azúcares reductores, quinonas, alcaloides, catequinas, lactonas y/o cumarinas y esteroides; asimismo, en la determinación del efecto genotóxico no podría ser acción de las nucleasas que quizá estén presentes en el extracto, ya que se realizó una corrida con PK alrededor de una hora de incubación, con lo que en esencia la genotoxicidad se centra en los metabolitos secundarios.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico hojas y semillas de *Ricinus communis* “higuerilla” presentaron efecto genotóxico *in vitro* frente al ADN genómico de *Escherichia coli*.
2. El extracto hidroalcohólico hojas y semillas presentan compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, azúcares reductores, catequinas, lactonas y/o cumarinas, triterpenos y/o esteroides, aminoácidos, quinonas y alcaloides.
3. El extracto hidroalcohólico de semillas de *Ricinus communis* “higuerilla”, a diferentes concentraciones evidenciaron efecto genotóxico, siendo la concentración de 100 mg/mL la que tuvo mayor porcentaje de fraccionamiento por encima del 95%, mientras el extracto hidroalcohólico de hojas presentó mayor porcentaje de fraccionamiento de 20 – 40% a 100 mg/mL
4. El extracto hidroalcohólico de las semillas presenta mayor efecto genotóxico en relación a las hojas.

CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES

1. Desarrollar trabajos de genotoxicidad modelados en ensayos *in vivo*, con el fin de corroborar los estudios *in vitro* obtenidos.
2. Desarrollar estudios de citotoxicidad, con el fin de identificar si existe relación entre daño citotóxico y genotóxico.
3. Realizar trabajos de aislamiento de los fitoquímicos mediante técnicas de HPLC acoplado a espectrofotómetro de masas, para caracterizar los componentes químicos presentes en el extracto de hojas y de semillas de *R. communis* “higuerilla”

BIBLIOGRAFÍA

- Abbes, M., Montana, M., Curti, C., & Vanelle, P. (2021). Ricin poisoning: A review on contamination source, diagnosis, treatment, prevention and reporting of ricin poisoning. *Toxicon*, 195, 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.03.004>
- Abomughaid, M., Teibo, J., Akinfe, O., Adewolu, A., Teibo, T., Afifi, M., Al-Farga, A., Al-kuraishy, H., Al-Gareeb, A., Alexiou, A., Papadakis, M., & Batiha, G. (2024). A phytochemical and pharmacological review of *Ricinus communis* L. *Discover Applied Sciences* 2024 6:6, 6(6), 1-20. <https://doi.org/10.1007/S42452-024-05964-5>
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., Ares, I., & Martínez, M. A. (2018). Poisonous Plants of the Europe. *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles: Third Edition*, 891-909. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00062-3>
- Arboleda, F., Guzmán, Ó., & Mejía, L. (2012). Efecto de extractos cetónicos de higuerilla (*Ricinus communis* linneo.) sobre el nematodo barrenador [radopholus similis (cobb.) thorne] en condiciones *in vitro*. *Revista Luna Azul*, , 35, 28-47. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8172014&info=resumen&idoma=ENG>
- Armstrong, J. (2022). *The Toxicology Handbook* (4.^a ed., Vol. 2). Elseiver. Asociación Española de Toxicología. (s. f.). *Glosario de términos Toxicológicos*. Recuperado de <https://es.aetox.es/glosario-toxicologico/glosater-f-g-h-i/>
- Aslani, M. R., Maleki, M., Mohri, M., Sharifi, K., Najjar-Nezhad, V., & Afshari, E. (2007). Castor bean (*Ricinus communis*) toxicosis in a sheep flock. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 49(3), 400-406. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2006.10.010>
- Ataucusi, V. (2020). *Efecto genotóxico in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de Clinopodium brevicalex Epl. «urqu muña» frente al ADN genómico humano. Ayacucho, 2018*. [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
- Audi, J., Belson, M., Patel, M., Schier, J., & Osterloh, J. (2005). Ricin Poisoning. *JAMA*, 294(18), 2342. <https://doi.org/10.1001/jama.294.18.2342>
- Ayala, E. (2014). *Efecto genotóxico in vitro de plantas medicinales antibacterianas Spartium junceum L. «retama», Caesalpinia spinosa (Molina) Kunzte «tara» y Eucaliptus globulus Labill «eucalipto»: Ayacucho - 2013*. [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
- Cáceres, A., Girón, L. M., Alvarado, S. R., & Torres, M. F. (1987). Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 20(3), 223-237. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(87\)90050-X](https://doi.org/10.1016/0378-8741(87)90050-X)
- Cervantes, F. (2019). *Toxicidad aguda y genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de Foeniculum vulgare Mill. “hinojo” en Mus musculus “ratón”. Ayacucho 2019*. [Tesis de grado]. <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/4410>
- de Carvalho, M., Barca, F., Agnez-Lima, L., & de Medeiros, S. (2003). Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 42(3), 185-191. <https://doi.org/10.1002/em.10183>

- Demma, J., Engidawork, E., & Hellman, B. (2009). Potential genotoxicity of plant extracts used in Ethiopian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(1), 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.013>
- Díaz, N., Reyes, E., Cejudo, A., Novo, J., & Peinado, J. (2010). *Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. . https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf
- Eghbaliferiz, S., & Iranshahi, M. (2016). Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. *Phytotherapy research : PTR*, 30(9), 1379-1391. <https://doi.org/10.1002/PTR.5643>
- Farooq, U., Khan, A., Naz, S., Rauf, A., Khan, H., Khan, A., Ullah, I., & Bukhari, S. M. (2018). Sedative and antinociceptive activities of two new sesquiterpenes isolated from *Ricinus communis*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 16(3), 225-230. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(18\)30051-7](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(18)30051-7)
- Henriques, J., Moreno, P., Von Poser, G., Querol, C., & Henriques, A. (1991). Genotoxic effect of alkaloids. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86(suppl 2), 71-74. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761991000600018>
- Hoffman, G. (1996). *Genetic - Toxicology. The basic science of poisons*. (9.^a ed., Vol. 1). Mc Graw Hill.
- Khan Academy. (2024). *Electroforesis en gel (artículo) | Khan Academy*. <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>
- Kumar, O., Lakshmana Rao, P. V., Pradhan, S., Jayaraj, R., Bhaskar, A. S. B., Nashikkar, A. B., & Vijayaraghavan, R. (2007). Dose dependent effect of ricin on DNA damage and antioxidant enzymes in mice. *Cellular and Molecular Biology*, 53(5), 92-102. <https://doi.org/10.1170/T823>
- Larrea, M. (2013). *Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay* [Tesis de pregrado, Universidad Mayor de San Andrés]. <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/3551>
- Liévano, D. (2008). *Vademécum colombiano de plantas medicinales*.
- Lock, O. (1994). *Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales*. (2.^a ed.). Pontificia Universidad Católica del Perú.
- López, C., Barrueto, M., & Paredes, J. (2023). Estudio de toxicidad *in vitro* del extracto acuoso de *Physalis peruviana* (aguaymanto) sobre linfocitos humanos. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 28(1), e1079. <https://cris.ucv.edu.pe/es/publications/estudio-de-toxicidad-in-vitro-del-extracto-acuoso-de-physalis-per>
- Louisse, J., Rijkers, D., Stoop, G., Holleboom, W. J., Delagrangé, M., Molthof, E., Mulder, P. P. J., Hoogenboom, R. L. A. P., Audebert, M., & Peijnenburg, A. A. C. M. (2019). Determination of genotoxic potencies of pyrrolizidine alkaloids in HepaRG cells using the γ H2AX assay. *Food and Chemical Toxicology*, 131, 110532. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2019.05.040>
- Lozano, J., Galindo, J., García-Borrón, J., Martínez-Liarte, J., Peñafiel, R., & Solano, F. (2005). *Bioquímica y Biología Molecular* (3.^a ed.). McGraw Hill.

- Marca, P. (2018). *Evaluación preliminar de la genotoxicidad in vitro del extracto etanólico y zumo de Allium sativum L. "ajo" frente a ADN de Staphylococcus sp. Ayacucho 2017* [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
- Miranda, T. (2015) *Protocolos de Biología Molecular – Guía de Practicas*. Ayacucho
- Montes, M. (2017). *Efecto genotóxico in vitro del látex de plantas medicinales de uso dérmico Argemone mexicana L. "cardo santo" y Taraxacum officinale "diente de león"*. Ayacucho, 2017. [Tesis de grado, UNSCH]. <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/4165>
- Nemudzhivadi, V., & Masoko, P. (2014). *In Vitro Assessment of Cytotoxicity, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of Ricinus communis (Euphorbiaceae) Leaf Extracts. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014(1), 625961.* <https://doi.org/10.1155/2014/625961>
- Ohishi, K., Toume, K., Arai, M. A., Sadhu, S. K., Ahmed, F., Mizoguchi, T., Itoh, M., & Ishibashi, M. (2014). Ricinine: A pyridone alkaloid from *Ricinus communis* that activates the Wnt signaling pathway through casein kinase 1 α . *Bioorganic & Medicinal Chemistry, 22(17), 4597-4601.* <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2014.07.027>
- Organización Panamericana de la Salud. (2024). *Situación de las plantas medicinales en Perú. Informe de reunión del grupo de expertos en plantas medicinales - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud.* <https://www.paho.org/es/documentos/situacion-plantas-medicinales-peru-informe-reunion-grupo-expertos-plantas-medicinales>
- Pacheco, C. (2009). *Efecto del extracto hidroetanólico de higuera Ricinus communis L. sobre el adulto del picudo del agave Scyphophorus acupunctatus Gyllenhal.* [Tesis de maestría]. Instituto Politécnico Nacional.
- Peña, E., Barrueco, C., Herrera, A., & García, P. (1990). Ensayos de genotoxicidad: una alternativa a la experimentación animal. *Revista de experimentación animal: órgano oficial de la Sociedad Española de Experimentación Animal, ISSN 1130-2739, Vol. 1, Nº. 1, 1990, págs. 41-52, 1(1), 41-52.* <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3922024>
- Quispe, C. (2017). *Efecto genotóxico in vitro de látex y extracto hidroalcohólico de semilla de Carica papaya L. "papaya" frente a ADN genómico humano. Ayacucho, 2016.* [Tesis de grado, UNSCH]. <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/1663>
- Repetto Jiménez, M., & Repetto Kuhn, G. (2009). *Toxicología fundamental (4ta ed.)*. Díaz de Santos. <https://www.editdiazdesantos.com/wwwdat/pdf/9788490524794.pdf>
- Real Academia Nacional de Medicina. (s. f.). *Diccionario de Términos Médicos.* <https://dtme.ranm.es/index.aspx>
- Ribeiro, P. R., de Castro, R. D., & Fernandez, L. G. (2016). Chemical constituents of the oilseed crop *Ricinus communis* and their pharmacological activities: A review. *Industrial Crops and Products, 91, 358-376.* <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.07.010>
- Rivera, C. (2024). *Efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico mixto de Cinchona spp., Eucalyptus globulus y Zingiber officinale frente al ADN de Escherichia coli.*

- [Tesis de pregrado, UNSCH].
<https://repositorio.unsch.edu.pe/handle/20.500.14612/7254>
- Sabitha, Y., & Fatima, S. (2022). Evaluatoin of genotoxicity of *Ricinus communis* (leaves and seeds) by their silver nano-particles using comet assay. *Journal of Advanced Scientific Research*, 13(05), 146-150.
<https://doi.org/10.55218/JASR.202213518>
- Sánchez, Á., Fonseca, G., Capiro, N., & Fernández, D. (2000). Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de lantanas medicinales en Cuba. *Revista Cubana de Farmacia*, 34(1), 34-43.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152000000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Sitton, D., & West, C. A. (1975). Casbene: An anti-fungal diterpene produced in cell-free extracts of *Ricinus communis* seedlings. *Phytochemistry*, 14(9), 1921-1925.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)83098-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)83098-6)
- Sugisawa, A., & Umegaki, K. (2002). Physiological concentrations of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCg) prevent chromosomal damage induced by reactive oxygen species in WIL2-NS cells. *The Journal of nutrition*, 132(7), 1836-1839. <https://doi.org/10.1093/JN/132.7.1836>
- Tituaña Pulluquitin, G. I., Córdova Guambo, I. V., Tobar Jácome, M. C., & Lascano Sumbana, A. V. (2018). Estudio del proceso de obtención de extractos de plantas medicinales. *Revista Caribeña de Ciencias Sociales* (mayo).
<https://www.eumed.net/rev/caribe/2018/05/extractos-plantas-medicinales.html>
- Wachira, S. W., Omar, S., Jacob, J. W., Wahome, M., Alborn, H. T., Spring, D. R., Masiga, D. K., & Torto, B. (2014). Toxicity of six plant extracts and two pyridone alkaloids from *Ricinus communis* against the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Parasites and Vectors*, 7(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-312/FIGURES/2>
- Zheng, L., Dai, F., Zhou, B., Yang, L., & Liu, Z. L. (2008). Prooxidant activity of hydroxycinnamic acids on DNA damage in the presence of Cu(II) ions: Mechanism and structure–activity relationship. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 149-156. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2007.07.010>

ANEXOS

Anexo 1

Constancia de la clasificación taxonómica de la especie vegetal *Ricinus communis* "higuerilla".

CONSTANCIA

LA BIÓLOGA LAURA AUCASIME MEDINA ESPECIALISTA EN TAXONOMÍA Y SISTEMÁTICA DE PLANTAS DEJA CONSTANCIA:


Que, el Bachiller en Farmacia y Bioquímica, **Sr. Rolando, CERVANTES VARGAS**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	EUPHORBIALES
FAMILIA	:	EUPHORBIACEAE
GÉNERO	:	Ricinus
ESPECIE	:	<i>Ricinus communis L.</i>
N. V..	:	"higuerilla"

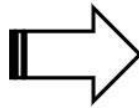
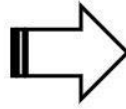
Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 14 de Febrero del 2 023


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

Anexo 2

Secado de la planta en estudio: Ricinus communis "higuerilla".



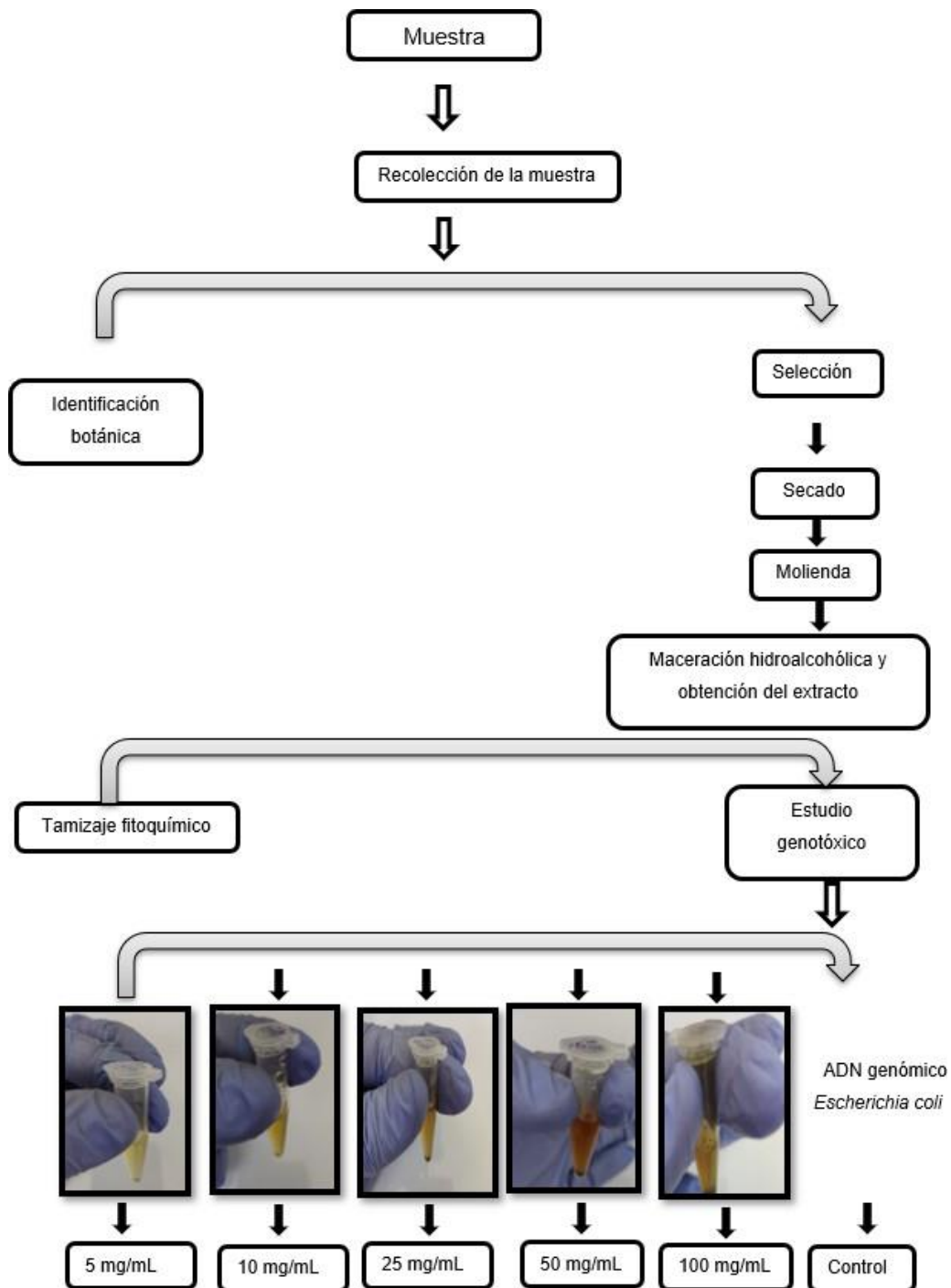
Anexo 3

Preparación de los extractos hidroalcohólicos *Ricinus communis* "higuerilla".



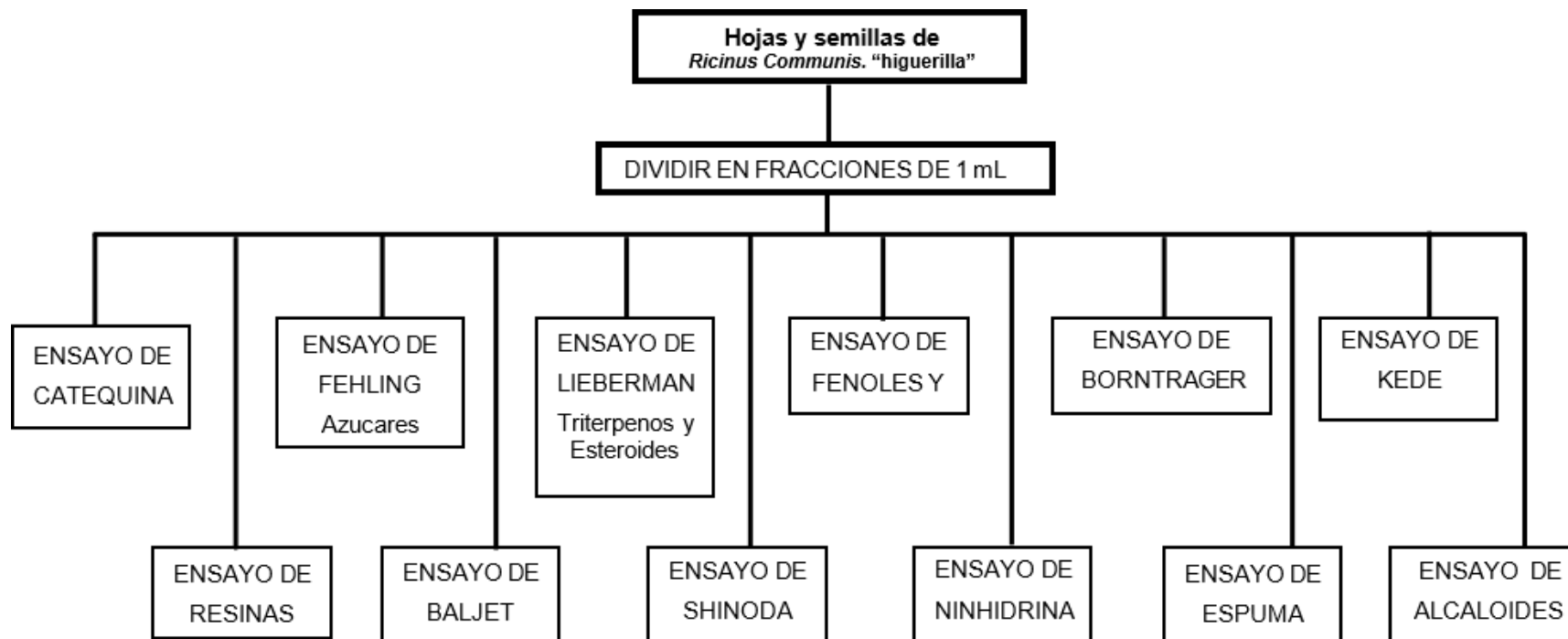
Anexo 4

Esquema de obtención del extracto hidroalcohólico, tamizaje fitoquímico y determinación del efecto genotóxico *Ricinus communis* "higuerilla". Ayacucho 2023.



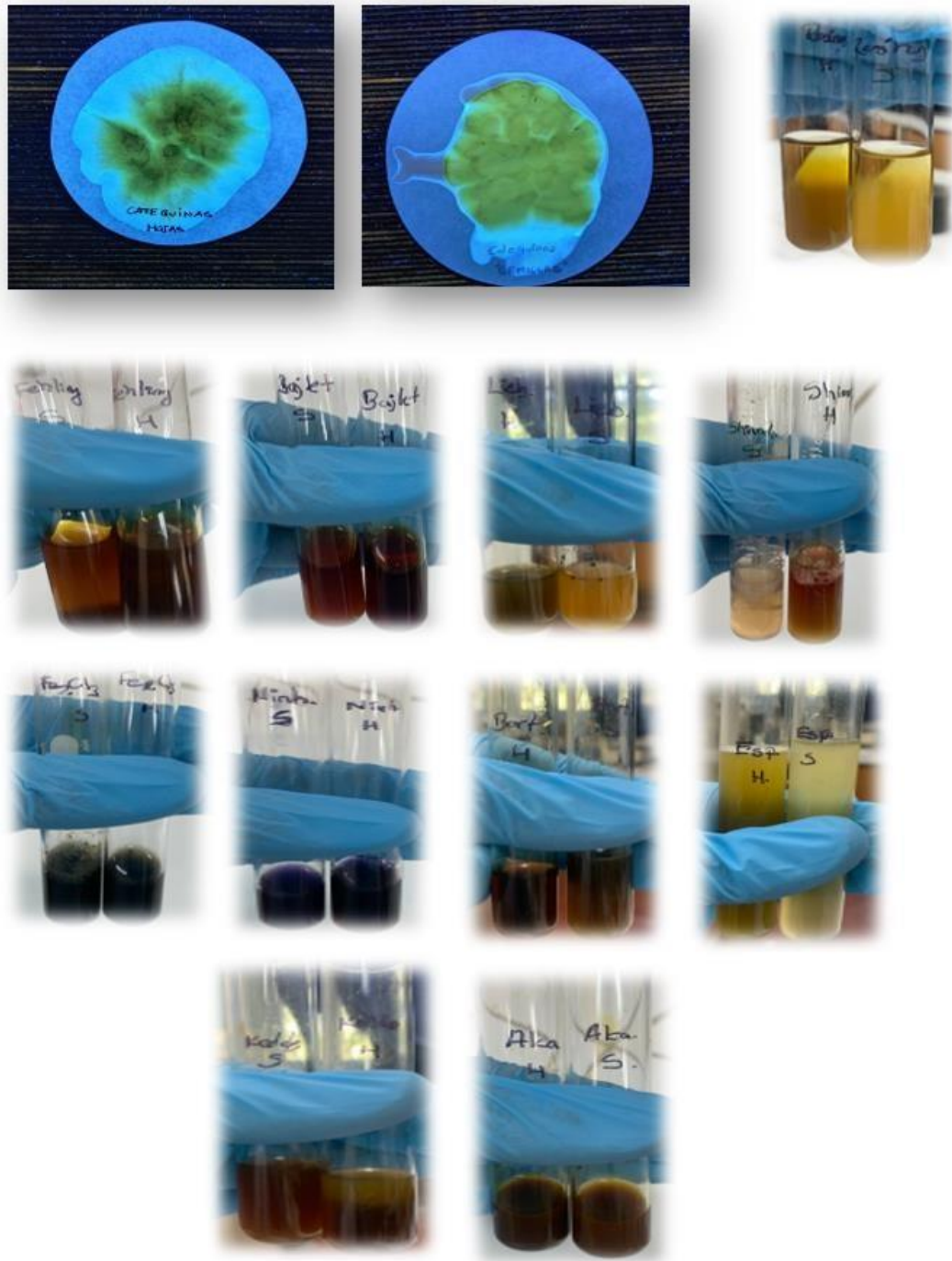
Anexo 5

Flujograma del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *Ricinus communis* "higuerilla".



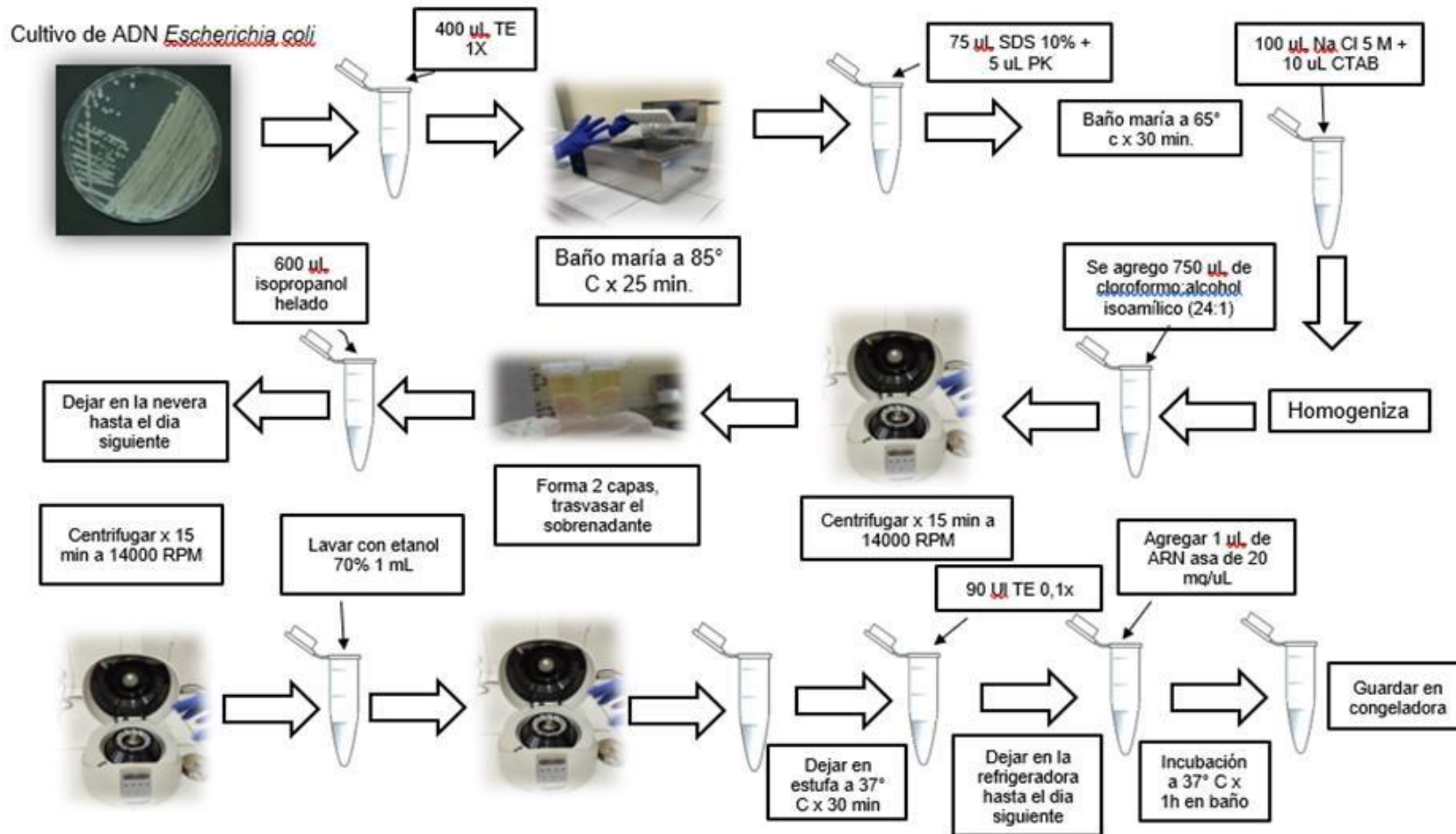
Anexo 6

Identificación de metabolitos secundarios de los extractos hidroalcohólicos de *Ricinus communis* "higuerilla".



Anexo 7

Protocolo de extracción de ADN genómico de *Escherichia coli*.



Anexo 8

Sembrado en el gel de agarosa al 1%, ADN genómico de Escherichia coli.



Anexo 9

Valores numéricos del ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de semillas de *Ricinus communis* “higuerilla” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, sobre el ADN genómico *Escherichia coli*, incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH.

Condiciones de la incubación	Tiempo	<i>Ricinus communis</i> “higuerilla”				
		Extracto Hidroalcohólico de semillas				
Temperatura	Hora	Concentración en mg/mL.				
°C	Hora	5	10	25	50	100
37	1	1	2	3	3	4
		1	2	2	3	4
		1	2	2	3	4
		1	2	3	3	4

Anexo 10

Prueba de Kruskal – Wallis para evaluar el grado de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de semillas de Ricinus communis “higuerilla”, según la concentración del extracto, frente a ADN genómico Escherichia coli, incubado a 37°C durante una hora. Ayacucho, 2023.

Hipótesis nula
Hipótesis alterna

H₀: Todas las medianas son iguales
H₁: Al menos una mediana es diferente

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	4	16.69	0.002
Ajustado para empates	4	17.90	0.001

La aproximación de chi-cuadrada podría no ser exacta cuando algunos tamaños de muestra sean menores que 5.

Trat.	Medianas	Ranks	
5	1.0	2.5	c
10	2.0	7.5	bc
25	2.5	10.5	abc
50	3.0	13.5	ab
100	4.0	18.5	a

Anexo 11

Valores numéricos del ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Ricinus communis* “higuerilla” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, sobre el ADN genómico *Escherichia coli*, incubado a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2023.

Condiciones de la incubación		<i>Ricinus communis</i> “higuerilla”				
		Extracto hidroalcohólico de hojas				
Temperatura °C	Tiempo Hora	Concentración en mg/mL.				
		5	10	25	50	100
37	1	0	0	1	1	2
		0	0	1	1	2
		0	0	1	1	2
		0	0	1	1	2

Anexo 12

Prueba de Kruskal – Wallis para evaluar el grado de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de hojas de Ricinus communis “higuerilla”, según la concentración de extracto, frente a ADN genómico Escherichia coli, incubado a 37°C durante una hora. Ayacucho, 2023.

Prueba

Hipótesis nula

H₀: Todas las medianas son iguales

Hipótesis alterna

H₁: Al menos una mediana es diferente

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	4	16.46	0.002
Ajustado para empates	4	19.00	0.001

La aproximación de chi-cuadrada podría no ser exacta cuando algunos tamaños de muestra sean menores que 5.

Comparaciones de a pares entre las medias de los rangos de tratamientos.

Trat.	Medianas	Ranks	
10	0.0	4.5	b
5	0.0	4.5	b
50	1.0	12.5	ab
25	1.0	12.5	ab
100	2.0	18.5	a

Anexo 13

Matriz de Definición y Operacionalización de Variables

Variables	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones	Indicadores	Valoración	Escala de Medición	Ítem del Instrumento
Variable Independiente: Concentración de las hojas y semillas de <i>Ricinus communis</i> . “higuerilla”.	Cantidad de extracto de hojas y semillas de <i>Ricinus communis</i> utilizado en el ensayo <i>in vitro</i> y la capacidad del extracto de <i>Ricinus communis</i> para causar daño al ADN de <i>Escherichia coli</i>	Cantidad de extracto de hojas y semillas de <i>Ricinus communis</i> utilizado en el ensayo <i>in vitro</i> y el grado de fragmentación del ADN genómico de <i>Escherichia coli</i> observado mediante electroforesis en gel de agarosa.	Concentración	Concentración en porcentaje (%) de las hojas y semillas.	5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL	Cuantitativo indirecta razón	Concentraciones del extracto: 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL
Variable Dependiente: Efecto genotóxico frente a ADN de <i>Escherichia coli</i>			Genotoxicidad	Grado de fragmentación del ADN genómico de <i>Escherichia coli</i> .	Ninguna, baja, media, alta, muy alta	ordinal	Observación de la fragmentación del ADN en el gel de agarosa

Anexo 14

Matriz de Consistencia.

Título: Efecto genotóxico in vitro del extracto hidroalcohólico de Ricinus communis. “higuerilla” frente al ADN de Escherichia coli. Ayacucho, 2023.

Autor: Rolando Cervantes Vargas

Formulación del Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Metodología
<p>Problema General ¿Tendrá efecto genotóxico las hojas y semillas de <i>Ricinus communis</i>? “higuerilla” frente a ADN de <i>Escherichia coli</i>?</p>	<p>Objetivo General Determinar la genotoxicidad <i>in vitro</i> de las hojas y semillas de <i>Ricinus communis</i>. “higuerilla”.</p>	<p>Hipótesis General Las hojas y semillas de <i>Ricinus communis</i>. “higuerilla”. Presenta efecto genotóxico en un ensayo <i>in vitro</i> frente a ADN de <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>Variable Independiente: Concentración de las hojas y semillas de <i>Ricinus communis</i>. “higuerilla”. Indicador: Concentración en porcentaje (%) de las hojas y semillas.</p>	<p>Tipo de Investigación: Básica – experimental. Diseño Experimental: El experimento se realizará bajo una guía del modelo <i>in vitro</i> para estudiar la actividad genotóxica. Población: Plantas de <i>Ricinus communis</i> “higuerilla”, que crece en la Ciudad Universitaria de la UNSCH, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, región Ayacucho Muestra: Muestreo aleatorio simple de <i>Ricinus communis</i>. “higuerilla, para la obtención directa del extracto, en la ciudad de Huamanga. Unidad Experimental: ADN genómico de <i>Escherichia coli</i>. a concentración de 1500 ng/μL por cada ensayo. Análisis estadístico: Paquete estadístico SPSS, Pruebas de Kruskal-Wallis</p>
<p>Problemas Específicos: ¿Cuáles son los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Ricinus communis</i> “higuerilla”? ¿Cuál es el efecto genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de las hojas y semillas de <i>Ricinus communis</i> “higuerilla” sobre el ADN de <i>Escherichia coli</i>?</p>	<p>Objetivos Específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Identificar los metabolitos secundarios presentes en las hojas y semillas de <i>Ricinus communis</i>. “higuerilla”. • Evaluar la genotoxicidad <i>in vitro</i> de las hojas y semillas de <i>Ricinus communis</i>. “higuerilla”. 	<p>Hipótesis Específicas El extracto hidroalcohólico de <i>Ricinus communis</i> “higuerilla” contiene metabolitos secundarios con potencial genotóxico. El extracto hidroalcohólico de las hojas y semillas de <i>Ricinus communis</i> “higuerilla” presenta un efecto genotóxico <i>in vitro</i> sobre el ADN de <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>Variables Dependientes: Efecto genotóxico frente a ADN de <i>Escherichia coli</i> Indicador: • Grado de fragmentación del Ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico de <i>Escherichia coli</i>.</p>	

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

RESOLUCIÓN DECANAL N° 519–2025-UNSCH-FCSA-D

BACHILLER: Rolando CERVANTES VARGAS

En la ciudad de Ayacucho, siendo las nueve de la mañana del día dieciséis de julio del dos mil veinticinco, se reunieron en el Aula J-201, los docentes miembros del jurado evaluador de sustentación, para el acto de sustentación de trabajo de tesis titulado: **Efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Ricinus communis* "higuerilla" frente al ADN de *Escherichia coli*. Ayacucho, 2023.** Presentado por el bachiller Rolando CERVANTES VARGAS para optar el título profesional de Químico Farmacéutico.

El Jurado evaluador de sustentación está conformado por:

Presidente (delegado por el Decano)	: Prof. Johnny Aldo Tinco Jayo
Miembros	: Prof. Edwin Carlos Enciso Roca
	: Prof. Kirianova Godoy Bautista
4to jurado	: Prof. Roxana León Aronés
asesor	: Prof. Tomás Yuret Miranda Tomasevich
secretaria Docente	: Prof. Priscila Licas Conde

Con el quorum de reglamento se dio por inicio la sustentación de tesis, el presidente de la comisión pide a la secretaria docente dar lectura a los documentos presentados por la recurrente, y da algunas indicaciones a la sustentante.

Da inicio la exposición el Bachiller: Rolando CERVANTES VARGAS, y una vez concluida la exposición, el presidente de la comisión solicita a los miembros del jurado evaluador realizar sus respectivas preguntas. Acto seguido, después de realizar algunas observaciones, da pase al asesor de tesis profesor Tomás Yuret Miranda Tomasevich para que pueda realizar algunas aclaraciones y comentarios.

Concluida la ronda de preguntas, el presidente invita al sustentante para abandonar el auditorio y se pueda proceder con la calificación.

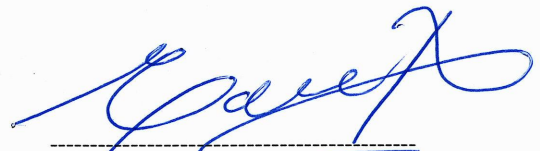
RESULTADO DE LA EVALUACIÓN FINAL

JURADOS	TEXTO	EXPOSICIÓN	PREGUNTAS	P.FINAL
Prof. Edwin Carlos Enciso Roca	16	16	16	16
Prof. Kirianova Godoy Bautista	16	15	14	15
Prof. Roxana León Aronés	17	17	16	17
PROMEDIO FINAL:			16	

De la evaluación realizada por los miembros del jurado calificador, llegaron al siguiente resultado: Aprobar al Bachiller Rolando CERVANTES VARGAS, quien obtuvo la nota final de **Dieciséis (16)** para la cual los miembros del jurado evaluador firman al pie del presente. Siendo las 10:50 horas del día, se da por concluido el presente acto académico.




Prof. Johnny Aldo Tinco Jayo
Presidente



Prof. Edwin Carlos Enciso Roca
Miembro




Prof. Kiranova Godoy Bautista
Miembro



Prof. Roxana León Aronés
Miembro



Prof. Tomás Yuret Miranda Tomasevich
Asesor



Prof. Priscila Licas Conde
Secretaria Docente

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

El Instructor en Segunda Instancia, en virtud de la RCU N.º 039-2021-UNSCH-CU, y en calidad de director de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, emite la presente

CONSTANCIA

DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

A Rolando CERVANTES VARGAS, Bachiller de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud, en mérito a que la tesis titulada: Efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Ricinus communis* "higuerilla" frente al ADN de *Escherichia coli*. Ayacucho, 2023.; ha alcanzado un índice de similitud de 20% (veinte); cumpliendo satisfactoriamente lo establecido en el Art. 13 del Reglamento de Originalidad de Trabajos de investigación de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga mediante el uso del SOFTWARE TURNITIN.

En ese sentido, se emite la presente constancia en señal de conformidad.

Ayacucho, 30 de junio de 2025.


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA


Marco R. Aronés Jara
DIRECTOR

Firmado
digitalmente por
Firma Director
Fecha: 2025.06.30
06:07:08 -05'00'

Efecto genotóxico in vitro del extracto hidroalcohólico de *Ricinus communis* “higuerilla” frente al ADN de *Escherichia coli*. Ayacucho, 2023.

por Rolando Cervantes Vargas

Fecha de entrega: 30-jun-2025 05:57a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2708329956

Nombre del archivo: 00_Tesis_Rolando_CERVANTES_VARGAS.pdf (1.91M)

Total de palabras: 16998

Total de caracteres: 91566

Efecto genotóxico in vitro del extracto hidroalcohólico de Ricinus communis "higuerilla" frente al ADN de Escherichia coli. Ayacucho, 2023.

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	12%
2	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	6%
3	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	repositorio.ucaldas.edu.co Fuente de Internet	<1%
5	rpmesp.ins.gob.pe Fuente de Internet	<1%
6	bioone.org Fuente de Internet	<1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo