

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE  
FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Comparación de la genotoxicidad *in vitro* de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", *Ficus carica* L. "higo", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto". Ayacucho, 2014.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICA

PRESENTADO POR:

**Bach. GUTIÉRREZ MEDINA, Mirtha Estela**

AYACUCHO - PERÚ

2015

ACTA DE SUSENTACIÓN DE TESIS  
R.D. N° 113 - 2015 - FCB-D  
Bachiller. Mirtha Estela GUTIÉRREZ MEDINA.

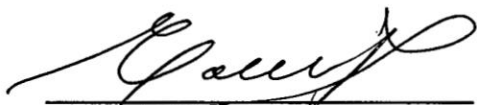
En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde con quince minutos del día veintinueve de mayo del año dos mil quince, en el auditorio del Centro Pre-Universitario de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, se reunió el Jurado Evaluador integrado por los profesores Dr. Edwin Carlos Enciso Roca en calidad de Presidente encargado mediante memorando N° 250-2015-UNSCH-FCB, el Mg. Saturnino Martín Tenorio Bautista como miembro, el Dr. Emilio Germán Ramírez Roca como miembro y el Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich como miembro y secretario docente encargado mediante Memorando N° 252-2015-UNSCH-FCB, con la finalidad de recepcionar la tesis titulada: Comparación de la genotoxicidad *in vitro* de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", *Ficus carica* L. "higo", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucalipto globulus* Labill "eucalipto". Ayacucho 2014, presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica Gutiérrez Medina Mirtha Estela quien pretende optar el título profesional de Químico Farmacéutica.

Se constató el expediente presentado con motivo de la sustentación la que esté en orden al cumplir con todo lo solicitado, motivo este para que el Presidente del Jurado Evaluador Dr. Edwin Carlos Enciso Roca, dé la autorización a la señorita sustentante para que inicie con su exposición, por lo mismo que inmediatamente procedió con su sustentación. Concluido con la exposición el señor presidente encargado del Jurado Evaluador, invitó a los profesores del Jurado para que puedan efectuar sus preguntas o solicitar las aclaraciones que crean por conveniente, las mismas que son respondidas por la sustentante. Concluida esta parte de las preguntas. El señor presidente invita a la sustentante y al público asistente puedan abandonar el auditorio momentáneamente, con la finalidad de evaluar la exposición y efectuar la calificación respectiva del mismo que se obtiene:

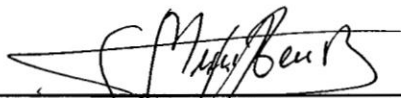
Miembro Jurado	Exposición	Rpta preguntas	Promedio
Dr. Edwin Carlos Enciso Roca	17	17	17
Mg. Saturnino Martín Tenorio Bautista	17	17	17
Dr. Emilio Germán Ramírez Roca	17	17	17
Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich	19	18	19
		Promedio:	18

Del mismo que se ha obtenido la nota de DIECIOCHO (18), que resulta siendo Aprobatoria, invitándose a la señorita sustentante y público asistente para que puedan ingresar al auditorio, con la finalidad de dar el resultado en forma pública, procediendo a la colocación de la medalla de la Universidad en reconocimiento a la nueva profesional Químico Farmacéutica, y procediendo a tomar el juramento Farmacéutico de ley.

El acto de sustentación terminó siendo las seis y treinta de la tarde, finalmente los miembros del Jurado Evaluador al pie del presente en reconocimiento y conformidad del mismo.



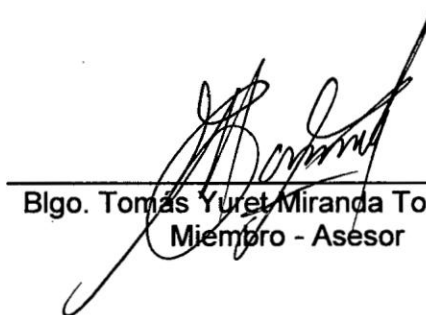
Dr. Edwin Carlos Enciso Roca  
Miembro – Presidente (e)



Mg. Saturnino Martín Tenorio Bautista  
Miembro



Dr. Emilio Germán Ramírez Roca  
Miembro



Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich  
Miembro - Asesor

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico a Exaltación y Sinforosa mis padres, quienes siempre han estado junto a mí, brindándome su apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi alma Mater la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga formador de excelentes profesionales al servicio de la región y el país.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, que me permitió realizar el trabajo.

A la Escuela de Formación profesional de Farmacia y Bioquímica, por darnos la oportunidad de formarnos como profesionales.

Al Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática por el apoyo en la ejecución y culminación del presente trabajo.

A los docentes que son los pilares de esta casa de estudios. Por el compromiso que tuvieron para con nosotros, de impartirnos sus conocimientos, enseñanzas, orientarnos, inculcarnos valores, virtudes durante el camino profesional.

Un reconocimiento especial al Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich por el apoyo incondicional, brindándome la oportunidad de recurrir a sus capacidades y experiencias científicas en un marco de confianza y amistad.

A todas las personas que me apoyaron, cuya ayuda fueron fundamentales para la concreción de la presente tesis.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
INDICE DE ANEXOS	xvii
RESUMEN	xxi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche".	10
2.3. <i>Ficus carica</i> L. "higo".	11
2.4. <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara".	14
2.5. <i>Eucaliptus globulus</i> Labill "eucalipto".	16
2.6. <i>Staphylococcus aureus</i> .	18
2.7. <i>Candida albicans</i> ATCC 40028.	19
2.8. <i>Leishmania sp</i> M 2903.	20
2.9. Linfocito humano.	21
2.10. Modelo tridimensional del ADN	21
2.11. Cuantificación y determinación de pureza de ADN	23
2.12. Evaluación genotóxica.	23
2.13. Electroforesis en gel.	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Lugar del trabajo de investigación.	27
3.2. Definición de la Población y Muestra.	27
3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos.	28
3.3.1. Recolección de muestra.	28
3.3.2. Obtención del látex.	28
3.3.3. Preparación del extracto hidroalcohólico.	28
3.3.4. Tamizaje fitoquímico del látex y el extracto hidroalcohólico.	29
3.4. Extracción de ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> .	29
3.5. Extracción de ADN genómico de <i>Candida albicans</i> .	30
3.6. Extracción de ADN genómico de <i>Leishmania sp</i> .	31

3.7. Extracción de ADN genómico de linfocito humano.	32
3.8. Cuantificación de ADN genómico <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Leishmania sp</i> y linfocito humano.	33
3.8.1. Por espectrofotometría.	33
3.8.2. Por electroforesis.	33
3.9. Ensayos de la genotoxicidad <i>in vitro</i>	34
3.10. Análisis de datos	37
IV. RESULTADOS	39
V. DISCUSIÓN	89
VI. CONCLUSIONES	103
VII. RECOMENDACIONES	105
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
IX. ANEXOS	113

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Preparación de las diluciones de ADN para patrones de banda en electroforesis.	34
Tabla 2. Preparación de las soluciones para la prueba de genotoxicidad <i>in vitro</i> de ADN genómico, por efecto de látex de plantas medicinales.	35
Tabla 3. Preparación de las soluciones para la prueba de genotoxicidad <i>in vitro</i> de ADN genómico, por efecto de látex de plantas medicinales.	35
Tabla 4. Valoración numérica de la genotoxicidad.	36
Tabla 5. Metabolitos secundarios presentes en el látex de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche". Ayacucho 2014.	40
Tabla 6. Metabolitos secundarios presentes en el látex de <i>Ficus carica</i> L. "higo". Ayacucho 2014.	41
Tabla 7. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara". Ayacucho 2014.	42
Tabla 8. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto". Ayacucho 2014.	43
Tabla 9. Cuantificación de ADN genómico extraído de <i>Staphylococcus aureus</i> por espectrofotometría ultra violeta. Ayacucho 2014.	44
Tabla 10. Cuantificación de ADN genómico extraído de <i>Candida albicans</i> ATCC 40028 por espectrofotometría ultra violeta. Ayacucho 2014.	46
Tabla 11. Cuantificación de ADN genómico extraído de <i>Leishmania sp</i> M 2903 por espectrofotometría ultra violeta. Ayacucho 2014.	48
Tabla 12. Cuantificación de ADN genómico extraído de linfocito humano por espectrofotometría ultra violeta. Ayacucho 2014.	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Electroforesis del ADN genómico extraído de <i>Staphylococcus aureus</i> . Ayacucho 2014.	45
Figura 2. Electroforesis del ADN genómico extraído de <i>Candida albicans</i> . Ayacucho 2014.	47
Figura 3. Electroforesis del ADN genómico extraído de <i>Leishmania sp.</i> Ayacucho 2014.	49
Figura 4. Electroforesis del ADN genómico extraído de linfocito humano. Ayacucho 2014.	51
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del látex de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" a concentraciones de 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.	52
Figura 6. Genotoxicidad del látex de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> , durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.	53
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del látex de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" a concentraciones de 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de <i>Candida albicans</i> ATCC a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.	54
Figura 8. Genotoxicidad del látex de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico del <i>Candida albicans</i> ATCC 40028, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.	55
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del látex de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" a concentraciones de 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de <i>Leishmania sp</i> M 2903 a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.	56

- Figura 10 Genotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Leishmania sp* M 2903, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 57
- Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a concentraciones de 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de linfocito humano a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 58
- Figura 12. Genotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 59
- Figura 13. Comparación de la genotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a cuatro diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ATCC 40028, *Leishmania sp* M 2903 y linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 60
- Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del látex de *Ficus crica* L. "higo" a concentraciones de 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 61
- Figura 15. Genotoxicidad del látex de *Ficus carica* L. "higo" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 62
- Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del látex de *Ficus crica* L. "higo" a concentraciones de 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de *Candida albicans* ATCC 40028 a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 63

- Figura 17. Genotoxicidad del látex de *Ficus carica* L. “higo” a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Candida albicans* ATCC 40028, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 64
- Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del látex de *Ficus carica* L. “higo” a concentraciones de 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de *Leishmania sp* M 2903 a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 65
- Figura 19. Genotoxicidad del látex de *Ficus carica* L. “higo” a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Leishmania sp* M 2903, con durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 66
- Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del látex de *Ficus carica* L. “higo” a concentraciones de 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de linfocito humano a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 67
- Figura 21. Genotoxicidad del látex de *Ficus carica* L. “higo” a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 68
- Figura 22. Comparación de la genotoxicidad del látex de *Ficus carica* L. “leche leche” a cuatro diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ATCC 40028, *Leishmania sp* M 2903 y linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 69
- Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a 1000 ng/μL, con durante una hora de incubación a 37°C. 70

- Figura 24. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 71
- Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de *Candida albicans* a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 72
- Figura 26. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Candida albicans* ATCC 40028, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 73
- Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de *Leishmania sp* M 2903 a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 74
- Figura 28. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Leishmania sp* M 2903, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 75
- Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de linfocito humano a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 76
- Figura 30. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 77

- Figura 31. Comparación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” a cuatro diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ATCC 40028, *Leishmania sp* M 2903 y linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 78
- Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill “eucalipto” a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 79
- Figura 33. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill “eucalipto” a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, con, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 80
- Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill “eucalipto” a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de *Candida albicans* a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 81
- Figura 35. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill “eucalipto” a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Candida albicans* ATCC 40028, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 82
- Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill “eucalipto” a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de *Leishmania sp* M 2903 a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 83
- Figura 37. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill “eucalipto” a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Leishmania sp* M 2903, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 84

- Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de linfocito humano a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 85
- Figura 39. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 86
- Figura 40. Comparación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a cuatro diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ATCC 40028, *Leishmania sp* M 2903 y linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014. 87

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de clasificación taxonómica de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche", para la evaluación de la genotoxicidad. Ayacucho 2014.	115
Anexo 2. Certificado de clasificación taxonómica de <i>Ficus carica</i> L. "higo", para la evaluación de la genotoxicidad. Ayacucho 2014.	116
Anexo 3. Certificado de clasificación taxonómica de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara", para la evaluación de la genotoxicidad. Ayacucho 2014.	117
Anexo 4. Certificado de clasificación taxonómica de <i>Eucaliptus globulus</i> Labill "eucalipto", para la evaluación de la genotoxicidad. Ayacucho 2014.	118
Anexo 5. Esquema de la obtención del látex y tamizaje fitoquímico para evaluar y comparar la genotoxicidad. Ayacucho 2014.	119
Anexo 6. Esquema de la obtención del extracto hidroalcohólico y tamizaje fitoquímico para evaluar y comparar la genotoxicidad. Ayacucho 2014.	120
Anexo 7. Características producidas en los ensayos para la identificación de los metabolitos secundarios. Ayacucho 2014.	121
Anexo 8. Extracción del látex de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" y <i>Ficus carica</i> L. Ayacucho 2014.	122
Anexo 9. Secado a temperatura ambiente de las vainas de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y hojas de <i>Eucaliptus globulus</i> Labill "eucalipto" para la obtención del extracto hidroalcohólico. Ayacucho 2014.	123
Anexo 10. Tamizaje fitoquímico (reacción de Shinoda y Cloruro férrico) del látex y el extracto hidroalcohólico de los frutos de <i>Ficus carica</i> L. "higo", vainas de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y hojas de <i>Eucaliptus globulus</i> Labill "eucalipto". Ayacucho 2014.	124

Anexo 11.	Cultivo de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>candida albicans</i> y obtención del ADN genómico para la evaluación de genotoxicidad de plantas medicinales en estudio. Ayacucho 2014.	125
Anexo 12.	Cuantificación por espectrofotometría UV de ADN genómico extraída de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>candida albicans</i> , <i>leishmania sp</i> y linfocito humano para la evaluación de genotoxicidad de plantas medicinales en estudio. Ayacucho 2014.	126
Anexo 13.	Ensayo <i>in vitro</i> y electroforesis en gel de agarosa al 1%, para la evaluación de genotoxicidad de plantas medicinales en estudio. Ayacucho 2014.	127
Anexo 14.	Registro fotográfico de la genotoxicidad de plantas medicinales evaluadas en gel de agarosa al 1%, con bromuro de etidio al 1%. Ayacucho 2014.	128
Anexo 15.	Valores numéricas del grado de genotoxicidad de las plantas medicinales en estudio, según el tipo de ADN y la concentración de látex y extracto hidroalcohólico.	129
Anexo 16.	Resultados de la prueba N par de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad de látex del tallo de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche", según el tipo de ADN. Ayacucho 2014.	130
Anexo 17.	Resultados da la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad de látex del tallo de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche", según el tipo de ADN y la concentración. Ayacucho 2014.	131
Anexo 18.	Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad de látex del tallo de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche", según el tipo de ADN. Ayacucho 2014.	132
Anexo 19.	Resultados de la prueba N par de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad de látex del fruto de <i>Ficus carica</i> L. "higo", según el tipo de ADN y la concentración. Ayacucho 2014.	133

Anexo 20.	Resultados da la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad de látex del fruto de <i>Ficus carica</i> L. "higo", según el tipo de ADN. Ayacucho 2014.	134
Anexo 21.	Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad de látex del fruto de <i>Ficus carica</i> L. "higo", según el tipo de ADN. Ayacucho 2014	135
Anexo 22.	Resultados de la prueba N par de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de la vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara", según el tipo de ADN. Ayacucho 2014.	136
Anexo 23.	Resultados da la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de la vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara", según el tipo de ADN y la concentración. Ayacucho 2014.	137
Anexo 24.	Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de la vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara", según el tipo de ADN. Ayacucho 2014.	138
Anexo 25.	Resultados de la prueba N par de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de la hoja de <i>Eucaliptus globulus</i> Labill "eucalipto", según el tipo de ADN. Ayacucho 2014.	139
Anexo 26.	Resultados da la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de la hoja de <i>Eucaliptus globulus</i> Labill "eucalipto", según el tipo de ADN y la concentración. Ayacucho 2014.	140
Anexo 27.	Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de la hoja de <i>Eucaliptus globulus</i> Labill "eucalipto", según el tipo de ADN. Ayacucho 2014.	141
Anexo 28.	Matriz de consistencia.	142

## RESUMEN

Se han detectado látex y extractos de plantas medicinales que poseen actividad embriotóxica y/o teratogénica, mutagénica y carcinogénica en productos de origen vegetal, encontrándose que existe una correlación positiva entre la ocurrencia de enfermedades y su consumo. Los objetivos planteados fueron comparar la genotoxicidad *in vitro* de las plantas medicinales: tallos de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", frutos de *Ficus carica* L. "higo", vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y hojas de *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto" e identificar sus metabolitos secundarios. Este estudio descriptivo, se desarrolló en el Centro de Investigación de Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, entre los meses de agosto a diciembre del 2014 en la ciudad de Ayacucho. El látex fue obtenido directamente de las plantas, realizando un corte del tallo de la "leche leche", base del fruto verde del "higo" (sicono) y extractos hidroalcohólicos de "tara y eucalipto" fueron obtenidos con alcohol a 80<sup>o</sup>, realizándose el tamizaje fitoquímico y la genotoxicidad a diferentes concentraciones, expuestos sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania sp* y linfocitos humano; mediante el "Método Tomasevich" propuesto por Miranda, cuya estimación del daño genotóxico *in vitro* fue determinado mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio y visualizado en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra UV solo TS. Los metabolitos secundarios identificados fueron: alcaloides, flavonoides fenoles y/o taninos, lactonas y/o cumarinas, saponinas y quinonas; hay similitudes y diferencias en la genotoxicidad según las concentraciones del: látex de "leche leche" influyen en el efecto genotóxico sobre ADN genómico de *Staphylococcus aureus* *Leishmania sp* y linfocito humano, pero no influye sobre ADN genómico de *Candida albicans*; látex de "higo" influyen estadísticamente en el efecto genotóxico sobre ADN genómico de linfocito humano pero no influyen sobre ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Leishmania sp*; extracto hidroalcohólico de "tara" y "eucalipto" influyen en el efecto genotóxico sobre ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania sp* y linfocito humano. En conclusión se demuestra que existe diferencias en la genotoxicidad *in vitro* de las plantas medicinales frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania sp* y linfocito humano: el látex de *ficus carica* L. "higo" muestra diferencia estadística al tipo de ADN según el organismo; mientras que el látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto" no muestran diferencias estadísticas al tipo de ADN según el organismo.

**Palabras clave:** Genotoxicidad, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania sp*, linfocito humano, "leche leche", "higo", "tara" y "eucalipto".

## I. INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un gran interés por los complementos alimenticios de origen vegetal, ya que se cree que dichos productos tienen la capacidad de disminuir los factores de riesgo para casi todas las enfermedades; esto permite que tengan una amplia acogida entre los consumidores que a menudo consideran que lo "natural" está libre de compuestos químicos y por lo tanto es "seguro" para la salud; premisa que debe reconsiderarse y controlarse conociendo de antemano que muchos ingredientes de origen botánico contienen toxinas que incluso pueden tener efectos genotóxicos, pues la integridad del ADN constituye un aspecto fundamental para la salud.<sup>1</sup>

La genética toxicológica estudia los efectos mutagénicos de sustancias químicas y radiaciones, así como las consecuencias para la salud humana de la exposición a mutágenos, considerando como tal a cualquier agente que induzca mutación genética aberraciones cromosómicas estructurales o numéricas, alteraciones al ADN (formación de aductos, alquilación e intercalamiento de bases), mecanismos de reparación (incremento de sensibilidad a los efectos de muchos mutágenos) y eventos de recombinación mitótica.<sup>2</sup>

Las pruebas de toxicidad se realizan con el fin de identificar posibles daños para el ser humano ya que, se han detectado que el látex de *Euphorbia peplus* L. es uno de una serie de plantas de la familia *Euphorbiaceae* que ha extraído la atención como un remedio casero para el cáncer de piel debido a su sabia lechosa. Sin embargo, una encuesta realizada por Peplin Biotech de las de 200 especies de familia *Euphorbiaceae* ha demostrado que sólo *Euphorbiapeplus* L. tiene los atributos deseados de eficacia anticancerígena *in vitro* e *in vivo*.<sup>3</sup>

Mientras tanto el látex de *Ficus carica* L. "higo" tiene un efecto irritante sobre la piel, debido a su contenido en furanocumarinas.<sup>4</sup>

También se han detectado que los extractos de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto", poseen actividad embriotóxica y/o teratogénica, se ha reportado actividad mutagénica y carcinogénica consustancias de origen vegetal (flavonoides, alcaloides y taninos), encontrándose que existe una correlación positiva entre la ocurrencia de enfermedades y tumores en la población.<sup>5</sup>

Los compuestos genotóxicos producen efectos que pueden manifestarse en el propio individuo o en su descendencia originando enfermedades genéticas. Tales razones justifican que las investigaciones de genotoxicidad sean tan necesarias y en este sentido se amplían los conocimientos de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", *Ficus carica* L. "higo", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" respecto a los posibles efectos perjudiciales sobre el ácido desoxirriboncléico (ADN).<sup>3</sup> Estas plantas han sido usadas en la medicina tradicional en el tratamiento de diversas afecciones de la piel y respiratorias respectivamente, las mismas que fueron demostradas por trabajos de investigación. Se emplea un sistema de ensayo a corto plazo *in vitro* utilizando el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania sp* y linfocito humano, como organismo para detectar daño genético. Como parte del estudio farmacológico y toxicológico de estas plantas, en el presente trabajo se pretende desarrollar los siguientes objetivos:

**Objetivo General:**

- Comparar la genotoxicidad *in vitro* de las plantas medicinales *Euphorbia peplus* L. "leche leche", *Ficus carica* L. "higo", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto", frente a ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Cándida albicans*, *Leishmania sp* y linfocitos humano.

**Objetivos Específicos:**

- Identificar los metabolitos secundarios en látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" y en extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto".
- Contrastar similitudes y diferencias de la genotoxicidad *in vitro* de los látex y extractos hidroalcohólicos de las plantas medicinales en estudio, frente a ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania sp* y linfocitos humano.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes

Uno de los problemas que actualmente enfrentan los tratamientos médicos a las infecciones crónicas bacterianas, micóticas, víricas y protozoarias que resultan ser prolongadas y en muchos casos sin resultados óptimos, se presenta el uso de productos de origen vegetal como una alternativa frente a este problema.<sup>6</sup>

Craig<sup>3</sup> en su estudio señala que el tratamiento tópico de cáncer de piel no melanoma; los carcinomas de células basales (BCC) y los carcinomas de células escamosas (SCC) son los cánceres humanos más comunes; planteando que como primera aplicación médica esta la *Euphorbia peplus* L. producto, es una serie de plantas de la familia *Euphorbiaceae* que ha atraído la atención como un remedio casero para el cáncer de piel debido a su savia lechosa. Sin embargo, una encuesta realizada por Peplin Biotech de más de 200 especies de la familia *Euphorbiaceae* ha demostrado que solo *Euphorbia peplus* L. tiene los atributos deseados de eficacia anticancerígena in vitro e in vivo.

Vega<sup>7</sup> en la evaluación del efecto citostático del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" en el meristemo radicular de *Allium cepa* L. "cebolla"; determinó mediante el método de la variación del índice mitótico con lectura entre 1000 a 3500 células por muestra, que según la prueba de Tukey la especie que tiene mayor efecto citostático fue la *Euphorbia peplus* L. (IM=0,32%). El tiempo de tratamiento de mayor antimicótica fue a las 8 horas con látex al 3% de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", seguido del látex de *Ficus carica* "higo" a las 24 horas.

Llanes<sup>8</sup> evaluó diferentes aspectos de la actividad inmunomoduladora de 24 extractos de 10 plantas de la familia *Euphorbiaceae* sobre células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de individuos sanos. Demostrando que los 24 extractos evaluados en este estudio presentaron actividad

inmunomoduladora directa sobre CMSP y quince de ellos tenían la capacidad de modular la actividad biológica de la PHA, CHX o LPS sobre CMSP. Al menos uno de los extractos de cada planta tiene actividad directa sobre las CMSP o modulan la actividad biológica de los compuestos utilizados.

Chacua<sup>4</sup> señala que el látex de los higos y de las hojas tiene un efecto irritante sobre la piel, debido a su contenido furocumarinas, por lo que se utiliza para ablandar y estimular los callos, durezas y verrugas.

Yoc et al<sup>9</sup> evaluaron la actividad biocida, citotóxica y genotóxica de tres extractos de plantas medicinales de la familia *Euphorbiaceae*. El único extracto que presentó actividad inhibitoria *in vitro* significativa contra bacterias y hongos fue *Euphorbia lancifolia* con una CMI de 1 mg/mL contra *Bacillus subtilis* y *Trichophyton mentagrophytes* ( $p=0,0312$ ). Para la determinación de citotoxicidad y genotoxicidad se utilizó el bioensayo de *Allium cepa* L. con extracto de *Cnidocolusaconitifolius* var. *mansa*, *Cnidocolusaconitifolius* var. *estrella* presentaron actividad citotóxica y genotóxica significativa a concentraciones menores de 1 mg/mL ( $p<0,0001$ ).

Pillaca<sup>10</sup> en su estudio demostró el efecto genotóxico *in vitro* del látex de plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo". Los resultados demuestran que el látex de estas dos plantas tienen efecto genotóxico sobre ADN genómico de linfocitos humano, donde el tiempo de incubación a una y cuatro horas, no influye en el efecto; mientras que las concentraciones de los extractos, sí influyen en el efecto genotóxico.

Mena<sup>11</sup> realizó la validación farmacológica del efecto analgésico y antiinflamatorio, de hoja de *Ficus carica* "higuera", de hoja de *Persea americana* "aguacate" y flor de *Calendula officinalis* "flor de muerto" en infusión acuosa (fase I); según los resultados obtenidos y la evaluación de los diseños experimentales por medio del promedio de área bajo la curva de los porcentajes de inflamación y la prueba de Dunnett, se determinó que las infusiones al 10% de hoja de *Ficus carica* "higo" y flor de *Calendula officinalis* "flor de muerto" a dosis de 750 y 1000 mg/kg de peso corporal presentaron efecto antiinflamatorio *in vivo* con significancia estadística ( $p<0.05$ ). Por el contrario la infusión al 10% de hoja de *Persea americana* "aguacate" no presentó efecto antiinflamatorio *in vivo* ( $p>0.05$ ).

Itzic<sup>12</sup> señala que la utilización de la planta de higo, es un alimento altamente energético laxante, demulcente y balsámico. La ficina le confiere propiedades

antiinflamatorias y digestivas; también se utiliza para las afecciones respiratorias: resfriados, gripe, faringitis bronquitis, enfisema, asma y otros como para la irritación gastrointestinal, inflamaciones locales: estomatitis, gingivitis, abscesos, forúnculos, quemaduras. El látex se emplea popularmente como antiverrucoso.

Silvers<sup>13</sup> realizó el estudio clínico de la actividad antifúngica del gel con tocte, higo, dulcamara y salvia en niños de la comunidad Sanjapamba con *Malassezia furfur* (hongo), evaluó como actúa el gel al aplicar en los rostros de los niños con *Malassezia furfur*, comprobándose que en la aplicación del control positivo con neo-nystasolona (crema antimicótica), con aplicación cada 24 horas reduce en un (95,15%) de igual forma con el gel da 96,87% de efecto sobre *Malassezia furfur* a los 15 días de tratamiento.

Kloucek et al<sup>14</sup> realizaron un ensayo antibacteriano sobre extractos etanólicos al 80% de nueve plantas obtenidos por maceración durante 5 días, una de las muestras ensayadas fue la *Caesalpinia spinosa* (vainas); se utilizaron cinco cepas Gram positivas y tres Gram negativas usando el método de microdilución del caldo de cultivo (broth microdilution). Los resultados son poco relevantes para la muestra mencionada a excepción del ensayo contra *Enterococcus faecalis* en el que se observó una CIM de 0,5 µg/ml, mientras que para *Bacillus cereus* fue de 8 µg/mL y de 16 µg/mL para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacteroides fragilis*.

Ferreira<sup>15</sup> estudió un extracto hexánico a base de *Caesalpinia spinosa*, fue ensayado para comprobar su actividad antifúngica como una alternativa del control de la enfermedad de fusariosis en diversos cultivos así como las manchas de Phoma en las hojas de las plantaciones de café. Los autores consideran que podría ser una alternativa ya que los extractos inhibieron el crecimiento micelial en el rango de 3,95% a 32,20% para el Phoma tarda y de 7,29% a 33,83% para el *Fusarium solani*.

Shibata<sup>16</sup> realizó un estudio que consistió en el aislamiento del galato de etilo como componente activo de la vaina de tara, lo que condujo a que los autores hicieran ensayos comparativos con diferentes galatos de alquilo, demostrando que la longitud de la cadena alquílica juega un rol importante en esta actividad biológica.

De la Cruz<sup>17</sup> determinó el efecto del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" sobre la viabilidad de *Streptococcus β* hemolítico. Encontrándose que la actividad antibacteriana del extracto de *Caesalpinia*

*spinosa* frente a *Streptococcus*  $\beta$  hemolítico aumenta a medida que se eleva (25% a 100%) la concentración del extracto.

Mendoza<sup>18</sup> demostró que la lectina de semillas de *Caesalpinia spinosa* purificada y caracterizada a través de extracción salina que mediante el análisis en SDS-PAGE purificada era homogénea, capaz de aglutinar eritrocitos del grupo sanguíneo humano "B" Rh+ con una CMI de 3,86  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y esta actividad fue inhibida por D-glucosa, D-manosa, D-maltosa, D-glucosamina, N-acetil glucosamina (3,25 mM) y el agente quelante EDTA (0,31 mM), lo que sugiere que puede ser considerada como una lectina tipo C. La comparación de la secuencia aminoacídica con otras secuencias de vegetales determinó que la lectina de *Caesalpinia spinosa* tiene homología con lectinas de la familia Leguminosae.

Escobar<sup>19</sup> determinó el efecto antibacteriano del extracto alcohólico en diferentes concentraciones de *Caesalpinia spinosa* sobre la viabilidad de *Corynebacterium diphtheriae* usando inóculos estandarizados con el Nefelómetro de McFarland N° 0,5; encontrándose que el promedio de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos con las diferentes concentraciones ensayadas varía de 34,11 a 43,55 mm. A medida que se aumenta la concentración del extracto alcohólico de *Caesalpinia spinosa* se obtiene mayor diámetro de halo de inhibición.

Añanca<sup>20</sup> determinó el efecto antibacteriano del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa*, en concentraciones que corresponden a 17,5, 16,25, 15, 13,75, 12,5, 11,25, 10, 8,75, 7,5, 6,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, usando inóculos estandarizados con el Nefelómetro de McFarland N° 0,5. Se encontró que se inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* cuyo CMI fue de 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el CMB fue de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; para la inhibición de *Staphylococcus pyogenes* el CMI fue de 13,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el CMB fue de 16,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se determinó que el extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* "tara" tiene actividad antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*.

Sampaio<sup>21</sup> en este estudio determinó la actividad antimicrobiana del extracto de la *Caesalpinia ferrea Martius* contra los microorganismos patógenos orales más comunes. Los valores de la concentración mínima inhibitoria para *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis* y *Lactobacillus sp* fueron de 25.0, 40.0, 66.0, 100.0, 66.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Se utilizó la clorhexidina como control positivo y solución salina como control

negativo. El extracto de *Caesalpinia ferrea Martius* inhibió el crecimiento *in vitro* de las bacterias patógenas orales.

Miyamoto et al<sup>22</sup> evaluaron la genotoxicidad del aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, usando un ensayo de segregación somática y una cepa diploide de los hongos *Aspergillus nidulans*, heterocigotos para los marcadores nutricionales y de color de conidios. Los principales compuestos de la muestra actual de aceite esencial fueron eucaliptol (49,0%),  $\alpha$ -pineno (8,9),  $\beta$ -pineno (1,5), globulol (6,9),  $\alpha$ -eudesmol (1,12), spathulenol (1,42),  $\gamma$ -cadineno (1,45), trans- $\beta$ -elemenone (1,23) y aromandendrene (2,3), por un total de 74% de aceite. Aceite en 0,12 y 0,25 l/mL fue encontrado para aumentar la inestabilidad mitótica de la cepa diploide original y el número de recombinantes mitóticos diploides de *Aspergillus nidulans*. La genotoxicidad del aceite se asoció con la inducción de sobrecruzamiento mitótico.

Damjanovic et al<sup>23</sup> en la investigación realizada con *Eucalyptus globulus* Labillen Montenegro, analizaron por gas cromatografía-espectrometría de masas y su actividad antimicrobiana se evaluó contra 17 microorganismos, incluyendo bacterias que causan intoxicación alimentaria y el deterioro. Mientras que el resultado en la identificación de un total de 11 constituyentes, cineol (85,8%),  $\alpha$ -pineno (7,2%) y  $\beta$ -mirceno (1,5%) son los componentes principales. Los resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana reveló que el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labilltiene lugar una fuerte actividad antimicrobiana, especialmente contra *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*. La concentración mínima inhibitoria reveló la menor actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonela infantis* (3,13 mg/mL) mientras que la mayor actividad fue contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus pyogenes* (0,09 mg/mL).

Orihuela et al<sup>24</sup> evaluaron el efecto citotóxico y genotóxico del extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* "tara" en células del meristemo radicular de *Allium cepa* "cebolla", se utilizaron vainas de "tara" colectadas en la provincia Tarma, Junín, a partir de las cuales se preparó un extracto acuoso. Se hicieron diluciones al 0,01%, 0,1% y 1% con las cuales fueron tratados bulbos de cebolla durante tres días. El control positivo fue CuSO<sub>4</sub> 0,01M y el control negativo fue agua potable esterilizada con radiación UV. La citotoxicidad se evidenció mediante la diferencia de longitudes de las raíces antes y después de los tratamientos.

Luego, con dichas raíces se hicieron preparaciones citogenéticas que permitan evidenciar la genotoxicidad mediante daños visibles en la cromatina. La citotoxicidad se cuantificó mediante porcentajes de inhibición de crecimiento de raíces, los cuales fueron de 27,63%, 83,33% y 94,30% para las concentraciones 0,01%, 0,1% y 1%, respectivamente. Para la genotoxicidad, el porcentaje de células normales fue de 75% y 14 % para las concentraciones 0,01% y 1%, respectivamente. Se concluye que el extracto acuoso de "tara" produce citotoxicidad en raíces de cebolla, directamente proporcional a la concentración, y la genotoxicidad del extracto es mayor a concentraciones de 0,1% y 1%.

Ayala<sup>25</sup> en su estudio demostró el efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antibacterianas *Spartium junceum* L. "retama", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto". Los resultados demuestran que los extractos hidroalcohólicos de estas dos plantas tienen efecto genotóxico sobre ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, donde el tiempo de incubación a una y cuatro horas, no influye en el efecto; mientras que las concentraciones de los extractos, sí influyen en el efecto genotóxico.

Carballo et al<sup>26</sup> realizaron un estudio a nivel genotóxico de las plantas medicinales: *Chenopodium multifidum* L. (Chenopodiaceae); *Lithraea molleoides* Vell. Engl. (Anacardiaceae); *Styphnolobium japonicum* L Schott. (Fabaceae); *Prosopis alba* Gris (Mimosaceae); *Schkuhria pinnata* (Lam.) (Asteraceae); *Solanum sysimbriifolium* Lam. (Solanaceae), mediante el ensayo de electroforesis de una sola célula. Se determinó que cuatro de ellas, *Chenopodium multifidum* (paico); *Schkuhria pinnata* (canchalagua), *Solanum sysimbriifolium* (espino colorado) y *Lithraea molleoides* (molle de beber), indujeron daño al ADN, induciendo roturas de cadena simple y doble.

Brugés et al<sup>27</sup> realizaron una evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. a la cual se evaluó la toxicidad de extractos y fracciones utilizando como organismos de prueba *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* y *Artemia salina*. La actividad biológica fue evaluada mediante la prueba de sensibilidad a antimicrobianos y la genotoxicidad con el ensayo Cometa. Los ensayos de toxicidad aguda con los organismos de prueba muestran que los extractos acuosos son prácticamente no tóxicos (CL50 >1000 ppm). Los extractos etanólicos y las fracciones de acetato de etilo y cloroformo presentaron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* que puede ser atribuida a los metabolitos secundarios

(terpenoides, flavonoides) que están presentes en esta especie. Los extractos etanólicos presentaron una importante actividad genotóxica sobre los linfocitos en el ensayo Cometa, siendo el extracto etanólico de raíces el que presenta mayor genotoxicidad (CL50 35 ppm).

Reyes<sup>28</sup> demostró que el ácido malínico posee un potente y selectivo efecto anticancerígeno, apoptótico y diferenciador sobre células de carcinoma de colon, utilizando dos líneas celulares de cáncer de colon, HT29 Caco-2, que difieren en la expresión de ciertos oncogenes y dos líneas celulares normales de intestino, IEC-6 y IEC-18. Este efecto cancerígeno se produce, fundamentalmente, a través de los eventos como es de citotoxicidad y genotoxicidad, esta última mediante un estudio de electroforesis en gel de agarosa del ADN.

Guevara et al<sup>29</sup> evaluaron el extracto fluido obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. en un sistema de ensayo a corto plazo *in vitro* utilizando *Aspergillus nidulans* cepa UH-223 para conocer la potencialidad del extracto como reductor del crecimiento de las colonias e inductor de daño genético en este microorganismo. Los estudios se realizaron por el método de incorporación en placa y como resultado se obtuvo una disminución considerable del tamaño de las colonias del microorganismo a causa del efecto tóxico del extracto y a su vez aumentó el índice de segregación mitótica como expresión de genotoxicidad para el microorganismo de ensayo, se obtuvieron valores incluso superiores al control positivo utilizado.

Reynoso<sup>30</sup> evaluó la genotoxicidad de compuestos aislados (lupina, esparteína y flavonoides) de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*, utilizando la prueba de cometa alcalino en linfocitos humanos y en los núcleos estaminales de *Tradescantia* (*Tradescantia subacaulis* y *Tradescantia hirsutiflora*, clon 4430) a concentraciones de (0,01, 0,1, 0,5 y 1,0 mM). La migración de la cauda en los núcleos estaminales de *Tradescantia* expuestos a los extractos de *Lupinus mexicanus* (19,12 a 25,99  $\mu$ ), *Lupinus montanus* (15,29 a 24,28  $\mu$ ) y la lupanina (12,33 a 32,06  $\mu$ ) mostraron significancia estadística ( $p < 0,01$ ) respecto al testigo negativo y por tanto, genotoxicidad en todas las concentraciones 0,01 a 1,0 mM. La esparteína no presentó diferencia estadística significativa ( $p > 0,05$ ) en las concentraciones 0,01 mM (5,96  $\mu$ ), 0,1 mM (5,48  $\mu$ ) y 1,0 mM (5,44  $\mu$ ), solo en la concentración de 0,5 mM (7,01  $\mu$ ) con respecto al testigo negativo. Los flavonoides tampoco fueron capaces de inducir actividad genotóxica (5,73  $\mu$ )

( $p > 0,05$ ) en la concentración de 1,0 mM y el resto de las concentraciones si mostraron diferencia significativa con el testigo negativo.

## **2.2 *Euphorbia peplus* L. “leche leche”.**

### **2.2.1 Clasificación taxonómica**

Se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Rosidae
Orden	:	Euphorbiales
Familia	:	Euphorbiaceae
Género	:	Euphorbia
Especie	:	<i>Euphorbia peplus</i> L.
Nombre Vulgar	:	“leche leche”

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH (2014) (Anexo 1)

### **2.2.2 Descripción botánica**

Es una planta anual con una longitud de 30 cm el tallo varía de rojo a verde en la base cerca de la cima, las ramas desarrollan a medida que madura, las hojas: tienen una longitud de 1-3 cm, forma (oval aguda), patrón (alteran a lo largo del tallo, pero opuestas en la parte superior de la planta), las flores son amarillo-verdoso, los frutos tienen tres lóbulos que contienen las semillas. Crecen en zonas templadas subtropicales el suelo es calcáreo arenoso. Se ubican: preferiblemente en las sombras (jardines), bordes de caminos, tierras cultivadas, campos húmedos y acequias.<sup>31</sup>

### **2.2.3 Usos tradicionales**

La parte utilizada de *Euphorbia peplus* L. “leche leche” en medicina casera es el látex, con propiedad antimicótica, anticancerígena, purgante en pocas gotas, como bactericida, para extirpar verrugas, como cicatrizante de heridas, como antiséptico, etc. Al contacto con la piel puede producir dermatitis y por fotosensibilización (exposición prolongada al sol). Debe evitarse el contacto con los ojos que puede producir desde irritaciones hasta ceguera. Afecta al aparato digestivo, a los riñones y al hígado, en personas que ingieran el látex, pudiendo causar la muerte.<sup>8</sup>

La familia Euphorbiaceae como plantas de uso medicinal, descritas a continuación: *Acalypha indica* Vell., es aplicada por vía tópica para el tratamiento de enfermedades de la piel. *Euphorbia antiquorum* Wall., es ingerido en dosis bajas de látex seco que ayuda al libre movimiento de las extremidades. El tallo de *Euphorbia tirucalli* Thunb., se prepara en infusión para tratar enfermedades de la piel en niños. El aceite extraído de las semillas de *Ricinus communis* L. alivia el dolor de estómago al aplicarse en el abdomen en el caso de *Ricinus communis*. *Croton socotranus* Balf. f. y *Euphorbia socotrana* Balf. f. son utilizadas para el tratamiento de enfermedades y heridas de la piel<sup>10</sup>. *Croton reflexifolius* Kunth., *Euphorbia pulcherrima* Willd ex Klotzsch y *Jatropha gaueri* Greenm., son utilizadas para el tratamiento de enfermedades dermatológicas y tumores en la piel.<sup>32,33</sup>

#### 2.2.4 Composición química

Principios activos; alcaloides (euphorbina), dihidroxicumarina, esteroides diterpenos, ingenol 3-angelate (PEP005).<sup>34</sup>

De la especie *Euphorbia peplus* L. se aislaron derivados de jatropano, ingenanos y pepluanos.<sup>35</sup>

### 2.3 *Ficus carica* L. “higo”.

#### 2.3.1 Clasificación taxonómica.

Se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Sub clase	: Hamamelidaeas
Orden	: Urticales
Familia	: Moraceae
Género	: Ficus
Especie	: <i>Ficus Carica</i> L.
Nombre Vulgar	: “higuera”

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH (2014) (Anexo 2)

#### 2.3.2 Descripción botánica

Árbol de pequeño porte, caducifolio, de tronco corto, grueso, con la corteza de color gris. Ramificada desde la base con frecuencia en estado natural. Copa

redondeada, amplia, muy densa y de muy buena sombra. Hojas de gran tamaño, alternas, de 10 a 20 cm de longitud, anchas y largamente pecioladas, con cinco lóbulos de 3 a 7 cm, con la base truncada o redondeada, de margen algo dentado. Limbo áspero al tacto, de color verde oscuro en el haz y más claro y tomentoso en el envés, con la nerviación destacada. Especie dioica, las flores, son muy pequeñas, se encuentran en el inferior de un receptáculo carnoso llamado sicono (higo) que vienen a ser los frutos grandes y auxiliares, solitarios o en pares. La forma varía desde globosa a aplanada y se conocen con el nombre de higo que contienen semillas en forma de núcula, y el color puede variar de verde a púrpura verdusco. La pulpa es comestible y de agradable sabor.<sup>36</sup>

Se encuentran fundamentalmente en las regiones tropicales o subtropicales de nuestro país. En general están muy aprovechadas en jardinería, especialmente en su época juvenil como plantas de maceta en interior.<sup>37</sup>

### **2.3.3 Usos tradicionales**

De gran eficacia contra todos los problemas relacionados con la respiración (dolores de garganta, problemas pulmonares y tos). Llevan gran cantidad de lignina, una fibra alimentaria que no se puede digerir, facilitando así problemas de estreñimiento. Son los higos una gran fuente de energía dado la cantidad de carbohidratos que presentan. La cantidad de calcio que tienen es sumamente interesante por ser muy similar a la de la leche siendo de este modo muy beneficiosos para las aftas bucales, gingivitis y abscesos. El hierro que presentan puede ayudar mucho en personas con anemia o trastornos en la asimilación de hierro. Son muy útiles ante una regla menstrual dolorosa, además higo es una fuente muy rica de benzaldehído, un agente anticancerígeno. Contiene enzimas y flavonoides que ayudan en el proceso.<sup>4</sup>

La parte utilizada del *Ficus carica* L. es el látex, se usan para el tratamiento de las verrugas de piel, generando una desaparición y rápida cicatrización. Dadas sus excelentes cantidades de hierro, puede utilizarlos en ensalada como fuente complementaria de este mineral. Muy útiles en la preparación de repostería cortados en trozos pequeños. Es muy aconsejable preparar mermelada.<sup>13</sup>

El látex que emanan sus hojas puede usarse como analgésico contra picaduras de insectos y para la maceración de carne, aunque produce alergias en determinadas personas. De las hojas se puede obtener un tinte negro para el cabello.<sup>38</sup>

### 2.3.4 Composición química

*Ficus carica* L. tiene numerosos compuestos bioactivos, como mucílagos, flavonoides, vitaminas, enzimas, nicotínicos ácido y tirosina. Ficus, estigmasterol, psoraleno, taraxasterol, beta-sitosterol, rutina, sapogeninas, acetato calotropenyl, lepeolacetate y ácido oleanólico, sistosterol están presentes en la hoja.<sup>38</sup>

Tallo: campesterol, hentriacontanol, estigmasterol, euphorbol y su exacosanate, y taraxerone.<sup>37</sup>

Hojas: humedad 67,6%; proteína 4,3%; grasa 1,7%; fibra cruda 4,7%, cenizas 5,3%, extracto libre de nitrógeno 16,4%; pentosanas 3,6%; caroteno, bergaptene, estigmasterol, sitosterol, y la tirosina. ficusin, taraxasterol, beta-rutina, sapogeninas, acetato Calotropenyl, epeolacetate y oleanólico.<sup>37</sup>

Látex: caucho (2,4%), resina, albúmina, cerin, azúcar y ácido málico, renina, enzimas proteolíticas, diastasa, esterasa, lipasa, catalasa, peroxidasa.<sup>37</sup>

Semilla: contienen 30% de un aceite fijo que contiene los ácidos grasos; ácido oleico 18,99%; linoleico 33,72%; linolénico 32,95%; palmítico 5,23%; esteárico 2.1 8%; araquídico 1,05%. Es un aceite comestible y puede ser utilizado como un lubricante.<sup>37</sup>

### 2.3.5 Propiedades fitofarmacológicas

Actividad hepatoprotectora: Reversión significativa de bioquímicos, histológicos y cambios funcionales inducidos por donde éter de petróleo extraer el tratamiento en ratas tratadas rifampicina, lo que indica prometedora actividad hepatoprotectora.<sup>38</sup>

Actividad hipoglucémica: El extracto de la hoja inducida por un hipoglucemiante significativa efecto de la administración oral o intraperitoneal en ratas diabéticas por estreptozotocina. La pérdida de peso fue impedido en las ratas diabéticas tratadas y la supervivencia índice fue significativamente alterada por la insulina en plasma niveles. Los resultados muestran que *Ficus carica* extracto acuoso tiene una clara actividad hipoglicemiante.<sup>38</sup>

Actividad anticancerígena: Compuestos activos Bio como 6 - O-acil- $\beta$ -D-glucosil- $\beta$ - aislado como un potente agente citotóxico del látex de *Ficus carica* L. tanto lo natural y la sintética mostraron efectos inhibitorios *in vitro* en la proliferación de diversas líneas celulares de cáncer.<sup>38</sup>

Actividad antioxidante: Los potenciales electores que promueven la salud de frutos fueron estudiados con seis variedades de higuera comerciales difieren en

el color (negro, rojo, amarillo y verde) se analizaron los polifenoles y flavonoides totales, capacidad antioxidante, y el perfil de antocianinas. En la misión de color oscuro y el rojo. Brow-Turquía variedades, la fracción antocianina aportaron 36 28% de la capacidad total de antioxidante, C3R (cianidina-3 - O-rutinósido) aportaron el 92% del total la capacidad antioxidante.<sup>38</sup>

Actividad antipirética: el extracto de etanol de *Ficus carica* L., a dosis de 100, 200 y 300 mg/kg mostró significativa dependiente de la dosis reducción de la temperatura corporal normal y la levadura provocado a temperatura elevada. El efecto extender hasta cinco horas después de la administración del fármaco cuando se compara a la de paracetamol (150 mg/kg).<sup>38</sup>

Actividad antibacteriana: el extracto de metanol de (PRM, 0,156 a 5 mg/mLMB, 0,313 a 5 mg/mL) mostraron una fuerte actividad antibacteriana contra las bacterias orales. Los efectos de combinación de extracto de metanol con ampicilina y gentamicina fueron sinérgica contra bacterias orales.<sup>38</sup>

Actividad fungicida: metanólico, hexanoico, acetato clorofórmico y acetato extractos de *Ficus carica* L., látex fueron investigados por sus propiedades antimicrobianas *in vitro* contra cinco especies bacterianas y siete cepas de hongos.<sup>38</sup>

## **2.4 *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara".**

### **2.4.1 Clasificación taxonómica**

Se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Sub clase	: Rosidae
Orden	: Fabales
Familia	: Caesalpinaceae
Género	: <i>Caesalpinia</i>
Especie	: <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze
Nombre Vulgar	: "tara"

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH (2014) (Anexo 3)

### **2.4.2 Descripción botánica**

Es un árbol pequeño, de dos a tres metros de altura, de fuste corto, cilíndrico y a veces tortuoso, y su tronco está provisto de una corteza gris espinosa, con

ramillas densamente pobladas. En muchos casos las ramas se inician desde la base dando la impresión de varios tallos. La copa de la tara es irregular, aparasolada y poco densa, con ramas ascendentes. Sus hojas son en forma de plumas, ovoides y brillante ligeramente espinosa de color verde oscuro. Sus flores son de color amarillo rojizo, dispuestos en racimos. Sus frutos son vainas explanadas e indehiscentes de color naranja, contienen de 4 a 7 granos de semilla redondeada, pero conforme madura va tomando tonalidades que van del amarillo al anaranjado- rojizo y de textura esponjosa. Sus semillas son pequeñas. Inflorescencia con racimos terminales ubicadas en la mitad distal, flores hermafroditas, zigomorfas, cáliz irregular provisto de un sépalo muy largo de alrededor de 1 cm, con numerosos apéndices en el 22 borde, cóncavo, corola con pétalos libres de color amarillento, dispuestas en racimos con pedúnculos pubescentes, articulado debajo de un cáliz corto y tubular; los pétalos son aproximadamente dos veces más grandes que los estambres.<sup>39</sup>

La tara crece en los climas secos, cálidos y sub cálidos de la costa, en la vertiente occidental de los andes y valles interandinos. La tara es una especie muy plástica en clima y suelo. En Perú, la tara se distribuye en los departamentos de Ancash, Apurímac, Ayacucho, Cuzco, Huánuco, Junín, Moquegua, Tacna y Lima.<sup>40</sup>

### **2.4.3 Usos Tradicionales**

La tara tiene diversos usos tradicionales, la infusión de las vainas maduras se utiliza para la amigdalitis en forma de gárgaras, la infusión de las hojas se utiliza para la estomatitis, la cocción de las ramas tiernas se usa como abortivo, igualmente se prepara una bebida que se toma como depurativo del colesterol, el cocimiento de las vainas se usan para secar las llagas de las piernas. En general es también muy utilizada para el tratamiento de infecciones vaginales y micóticas, para el lavado de ojos inflamados, para el dolor de estómago y diarreas, para el reumatismo y resfriado, para curar úlceras, como cicatrizante, entre otros. En la cosmética se utiliza para la evitar la caída del cabello, para su tintura y para la elaboración de champús y bronceadores; también se usa como biocida contra piojos y otros insectos. A pesar del uso tan amplio no se encuentra literatura científica que avale estos usos tradicionales. Igualmente las recetas son solamente "recetas caseras".<sup>41</sup>

#### 2.4.4 Composición química

Hojas: Contiene glicósidos, gomas, mucilagos, taninos (12.7% en la forma de taninos gálicos), antraquinonas: reina, sennósido, agliconas libres, C-glicósidos, aloe-emodina e iso-emodina, esteroides y flavonoides.<sup>42</sup>

Vainas: contiene taninos hidrolizables (galotaninos) en un rango de 40% a 60% según las condiciones ecológicas en las que vegeta, la hidrólisis de estos taninos conduce a la separación del ácido gálico; así mismo se han aislado galato de etilo y cuatro galatos del ácido quínico correspondiendo a los ésteres metílicos de 4,5-di-O-galoilquinico y de 3,4,5- tri-O-galoilquinico, y a los ácidos 3,4-di-O-galoilquinico y 3,4,5-tri-O-galoilquinico.<sup>42</sup>

Semillas: del endospermo se ha separado la goma o hidrocoloide galactomanánico en la que los componentes monoméricos galactosa y manosa se encuentran en una relación de 41:70. La viscosidad intrínseca permitió determinar su peso molecular promedio en 351400, así mismo la goma da lugar a soluciones acuosas con característica de fluido pseudoplástico con una viscosidad promedio de 4000 cp.<sup>42</sup>

### 2.5 *Eucalyptus globulus* Labill“eucalipto”.

#### 2.5.1 Clasificación taxonómica

Se ubica en la siguiente categoría:

División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Sub clase	: Rosidae
Orden	: Myrtales
Familia	: Myrtaceae
Género	: Eucalyptus
Especie	: <i>Eucalyptus globulus</i> Labill
Nombre Vulgar	: “eucalipto”

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH (2014) (Anexo 4).

#### 2.5.2 Descripción botánica

Los eucaliptos son árboles perennes, de porte recto pudiendo llegar a medir hasta 60 m de altura, la corteza exterior (ritidoma) es marrón clara con aspecto de piel y se desprende a tiras dejando manchas grises o parduscas sobre la corteza interior, más lisa.<sup>43</sup>

Las hojas jóvenes de los eucaliptos son sésiles, ovaladas y grisáceas, alargándose y tornándose coriáceas de un color verde azulado brillante de adultas; contienen un aceite esencial, de característico olor balsámico, que es un poderoso desinfectante natural. Presenta flores blancas y solitarias con el cáliz y la corona unidos por una especie de tapadera que cubre los estambres y el pistilo (de esta peculiaridad procede su nombre, eu-kalypto en griego significa "bien cubierto") la cual, al abrirse, libera multitud de estambres de color amarillo. Los frutos son grandes cápsulas de color casi negro con una tapa gris azulada que contiene gran cantidad de semillas.<sup>43</sup>

El eucalipto es originario de Australia y de Tasmania. Actualmente, crece en todas las regiones de clima subtropical. Habita en zonas bajas próximas al litoral hasta los 300 msnm.<sup>43</sup>

### **2.5.3 Usos tradicionales:**

El aceite esencial de eucalipto es antitusivo con un efecto algo inferior a la codeína, mucolítico y expectorante, aumentando el volumen de producción del flujo del tracto respiratorio. Es también antiséptico. El extracto acuoso de la hoja tiene propiedades hipoglucemiantes. También tiene propiedades repelentes de insectos. Indicaciones terapéuticas. Se utiliza la hoja en catarros del tracto respiratorio. El aceite esencial administrado indistintamente de forma interna o externa, está indicado en el tratamiento sintomático de los catarros de las vías respiratorias altas y congestión nasal, mientras que la aplicación tópica se emplea también para afecciones reumáticas.<sup>40</sup>

### **2.5.4 Composición química:**

Las hojas contienen aceite esencial en una cantidad que varía entre el 1,5 y el 3 %, en el aceite esencial el eucaliptol (1,8-cineol) representa el 75-85 %; otros componentes activos en la hoja son los taninos, ácidos polifenólicos, flavonoides, ceras.<sup>44</sup>

En el aceite esencial se han identificado los monoterpenos canfeno, cineol, paracimeno; euglobal IB, IC y II A, alfa y betafelandreno, geraniol y su acetato, isofenchona, limoneno, mirceno, alfa y betapineno, trans-pineocarvol, terpineol, el alfa-isómero y su acetato, y valeraldehído; además de los sesquiterpenos aromandreno, allo-aromandreno, cariofileno, euglobal III, IV A y IV B, globulol, epiglobulol, ledol y viridiflorol. Además se han detectado en las hojas los

flavonoides crisin, eucaliptín, hiperósido, procianidín B-2 galoil, prodelfinidín B-2 galoil, prodelfinidín B-5, y su digaloil, quercetín, iso quercetín, rutín, sewderoxilín y 8-demetil sideroxilín.<sup>45</sup>

## 2.6 *Staphylococcus aureus*

Son cocos gram positivos, de 0.5-1.5 µm de diámetro, catalasa positivos, que se encuentran microscópicamente aislados, en pares, tétradas o formando racimos irregulares, inmóviles, facultativamente anaerobios, no formadores de esporas, generalmente no posee una membrana externa capaz de proteger el citoplasma bacteriano, que tienen una gruesa capa de peptidoglicano y que presentan ácidos teicoicos en su superficie.<sup>46</sup>

Una especie representativa viene a ser el *Staphylococcus aureus*, es un coco que crece agrupado en racimos (de ahí su raíz "Staphylo"), es aerobio y anaerobio facultativo por lo que puede crecer tanto en una atmósfera con oxígeno y también sin el mismo, no presenta movilidad ni forma cápsula. Es capaz de crecer hasta con un 10% de sal común. Por esto puede crecer en el agua del mar. Produce la fermentación láctica. Es catalasa positivo y coagulasa positivo, es la única especie estafilocócica humana que produce coagulasa, esta enzima es también producida por *Staphylococcus hyicus* y *Staphylococcus intermeidius*, pero estas son cepas de animales y no están asociadas a infecciones humanas. El *Staphylococcus aureus* es un agente patogénico que actúa como microorganismo saprófito, se encuentra en la piel del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas de la piel caen puede causar enfermedad. Estas bacterias también viven sin causar daño en los pasajes nasales. Pueden causar desde infecciones leves y graves e incluyen abscesos, impétigos, forúnculos, carbunco e infecciones sistémicas "graves que pueden asociarse con exfoliación superficial de la epidermis". Puede producir enfermedades que pone en peligro la vida como neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome del shock tóxico (SST) y sepsis.<sup>30</sup>

La patogenicidad de *Staphylococcus aureus* se manifiesta por elaborar una variedad de toxinas extracelulares, incluyendo alfa-, beta-, sigma- hemilisin, coagulasas, hialuronidasas, exfoliatina, leucocidina y lipasa. La coagulasa puede proteger a las células bacterianas de la fagocitosis cubriendo los neutrófilos con fibrina, la proteína A, un componente de la pared celular puede unirse a la región Fc, de las moléculas de la inmunoglobulina e interferir en la opsonización y

fagocitosis. Las hialuronidasas son enzimas que hidrolizan el cemento intercelular de los tejidos, facilitando la diseminación de los microorganismos. Las exfoliatinas también tienen esta capacidad, pero su acción está limitada al estrato granuloso de la piel, produciendo ampollas y escaras en la epidermis. Las leucocidinas son exotoxinas que ejercen efectos tóxicos directos sobre los neutrófilos, granulación de los lisosomas celulares y muerte celular. Las cepas recuperadas de carbunclos y forúnculos en general producen lipasas capaces de hidrolizar los lípidos de la piel, lo que permite la diseminación de los microorganismos. Las enteroxinas estafilocócicas, un grupo de proteínas termoestables de cadena simple con un peso molecular de 28000 a 35000 dalton, se dividen en siete tipos: A, B, C, C2, D, E y F. Las enterotoxinas A y B habitualmente se asocian con envenamiento estafilocócico de alimentos humanos; la enterotoxina B por lo común es producida por cepas relacionadas con infecciones hospitalarias.<sup>47</sup>

## **2.7. *Candida albicans.***

Las especies de *Candida* son levaduras unicelulares. Aunque su poder patógeno es conocido desde la época de Hipócrates, su interés creciente comienza a partir de 1940 con la introducción de la antibioterapia.<sup>48</sup>

Se cultiva con facilidad en todos los medios y sobre un substrato sólido y forma colonias redondeadas blanco grisáceas, como si estuviera recubierta de azúcar en el plazo de 48 horas. Crecen bien en aerobiosis a temperatura ambiente (25°C a 30°C) y al 37°C. Las especies saprofitas no crecen a altas temperaturas.<sup>47</sup>

La *candida albicans* es una levadura, tiene una pared celular bastante compleja compuesta por B-glucanos, mannoпротеínas y una pequeña cantidad de quitina. El mayor componente son los carbohidratos que conforman alrededor del 80 a 90% de peso de húmedo de la célula, un 2% de líquidos y un 3 a 6% de proteínas.<sup>49</sup>

La principal fuente de infección de los seres humanos es la vía endógena; la *candida albicans* es comensal de la piel del tubo digestivo. De las vías respiratorias superiores y del tracto genital femenino, la piel y las mucosas intactas son la primera barrera de la defensiva frente a su infección. También es posible la transmisión inter humano y a partir de ambientes hospitalarios.<sup>50</sup>

Las infecciones localizadas se observa en pacientes que sufren de alteraciones de las barreras naturales de la defensa, siendo factores que predisponen a padecer la enfermedad. Debilidad general, el uso de catéteres urinarios o intravenosos, el uso de antibióticos de amplio espectro que alteran la flora normal, tratamiento con corticosteroide.<sup>51</sup>

En la fase de terminación la presencia de tubos germinativos constituye el inicio del crecimiento micelial de *Candida albicans* y se acompaña de una adherencia y virulencia aumentada, la formación de hifas de *Candida* en condiciones ambientales favorables (temperatura de 37°C y PH, 7), produce una capa superficial adicional en comparación con la fase de blastospora que es la responsable del aumento de adherencia tanto a distintos polímeros como a las células de la mucosa. Esta capa adicional está formada de fibrillas, compuestas de manoproteínas de distinto peso molecular, que son retenidas sobre la superficie plástica.<sup>52,53</sup>

## **2.8 *Leishmania sp.***

La *Leishmania sp* es un protozoo dimórfico de género *Leishmania* que pertenece al reino Protista, subreino Protozoa, orden Kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae. En la actualidad el género *Leishmaniase* divide en dos subgéneros según su desarrollo en el intestino de los flebótomos vectores: *Leishmania* en el intestino medio o anterior y *Viannia* en el intestino posterior, medio y anterior de los flebótomos.<sup>54,55</sup>

Son cuatro las formas clínicas de las *Leishmaniasis*: cutánea, cutaneomucosa, visceral y difusa. Las dos primeras son las más frecuentes en el Perú. La difusa se presenta rara vez y la visceral no ha sido descrita formalmente en el país.<sup>56</sup>

En general, *Leishmania sp* transmite indirectamente entre huéspedes por medio de moscas de arena del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, que son vectores biológicos. Cada especie de *Leishmania* se adapta a la transmisión en ciertas especies de moscas de arena. Sólo las hembras se alimentan con sangre. La actividad de las moscas ocurre cuando el clima es húmedo y no hay viento ni lluvia.<sup>57</sup>

Para el diagnóstico molecular se cuenta como método de referencia con la reacción en cadena de la polimerasa-18S, que amplifica un fragmento de 115 pb de la región 18S del gen que codifica el ARN ribosomal, y cuyos valores de sensibilidad y especificidad son adecuados: (S: 92% en sangre, 92,9% en

médula ósea y E: 99,6 en personas procedentes de áreas no endémicas). Posteriormente, se informó una sensibilidad de 93,2% en casos de enfermedad cutánea y mucocutánea, y de 86% en enfermedad visceral, siendo la especificidad de 95 % en personas de área endémica y de 98,3% para personas procedentes de áreas no endémicas.<sup>58</sup>

El tratamiento se divide en dos: de primera línea Antimonio N-Metil glutamine (Glucantime) y de segunda línea Anfotericin B (Fungizone).<sup>59</sup>

## **2.9 Linfocito humano.**

Los linfocitos constituyen el 25% de los leucocitos sanguíneos, y el 99% de las células linfáticas. Existen unos 10 billones de linfocitos en el cuerpo humano, que equivalen a la masa del cerebro.<sup>60</sup>

Células linfoides: desde el punto de vista funcional podemos encontrar tres tipos de células linfoides; los linfocitos originados de la médula ósea, cuyo órgano sinónimo en las aves se denomina Bursa de Fabricio y por esta razón se nombran linfocitos B, los que se originan del Timo, los linfocitos T Los linfocitos T y B son los responsables de la respuesta inmune específica.

Linfocitos B. reconocen al antígeno en forma soluble, por medio de sus inmunoglobulinas de membrana (mIg), que forman parte del complejo receptor de las células B (BCR). En cada linfocito hay unas 150.000 moléculas de mIg (de las clases M y D), que han sido sintetizadas por él. Todas estas moléculas poseen la misma especificidad antigénica.<sup>60</sup>

Linfocitos T: poseen un receptor de membrana (TCR) asociado no covalentemente al llamado complejo CD3, lo que conjuntamente se denomina complejo receptor de las células T. Existen dos tipos de TCR, que definen dos poblaciones diferentes de linfocitos T, las denominadas TCR2 y TCR1.<sup>60</sup>

## **2.10 Modelo tridimensional del ADN**

En 1953, Watson y Crick postularon un modelo tridimensional para la estructura de ADN que estaba de acuerdo con todos los datos disponibles. Consiste en dos cadenas helicoidales de ADN enrolladas alrededor del mismo eje, que forman una doble hélice dextrógira. Los esqueletos hidrofílicos formados por unidades alternas de desoxirribosas y grupos fosfato cargados negativamente se hallan en el exterior de la doble hélice, en contacto con el agua circundante. Las bases purínicas y pirimidínicas de ambas cadenas están apiladas en el interior de la

doble hélice, con sus estructuras en anillo hidrofóbicas y prácticamente planas situadas a muy corta distancia las unas de las otras y en posición perpendicular con relación al eje longitudinal de la hélice.<sup>61</sup>

La relación espacial entre las dos cadenas da lugar a la formación de un surco mayor y un surco menor en la doble hélice. La doble hélice o el dúplex de DNA se mantiene por dos tipos de fuerzas: enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias e interacciones por apilamiento de bases.<sup>61</sup>

Las dos hebras tienen orientación antiparalela; o sea que sus direcciones 5' → 3' son opuestas. Las hebras mantienen un registro exacto debido al apareamiento regular de las hebras: A se aparea con T a través de dos enlaces de hidrógeno; G se aparea con C mediante tres enlaces de hidrógeno. Esta complementariedad de pares de bases es consecuencia del tamaño, la forma y la composición química de las bases. La presencia de miles de estos enlaces de hidrógeno en una molécula de DNA contribuye en gran parte a la estabilidad de la doble hélice. Las interacciones hidrofóbicas y de van der Waals entre los pares de bases adyacentes apilados también contribuyen a la estabilidad de la estructura del DNA.<sup>62</sup>

En principio, dos hebras de polinucleótidos pueden formar una hélice que gira hacia la derecha o hacia la izquierda, dado que la geometría de la columna vertebral de azúcar-fosfato se mas compatible con el DNA natural, es una hélice que gira hacia la derecha. Los patrones de difracción por rayos X del DNA indican que las bases apiladas están separadas por un espacio regular de 0,34 nm, a lo largo del eje de la hélice. La hélice completa un giro cada 3,4nm; en consecuencia, hay unos 10 pares por giro. Esto se denomina la forma B del DNA, la forma normal presente en la mayoría del DNA celular.<sup>62</sup>

Las dos cadenas antiparalelas de polinucleótidos en el DNA en doble hélice no son idénticas ni en secuencia ni en composición de bases. En cambio, son complementarias entre ellas, la característica fundamental del modelo de las dos hebras de DNA. El proceso de copia de la estructura (replicación) podría proceder de una manera lógica a través de (1) separación de las dos hebras y (2) la síntesis de una hebra complementaria para cada una de ellas mediante las concatenadas de nucleótidos en la secuencia especificada por las reglas de apareamiento de bases comentadas anteriormente. Cada hebra preexistente podría funcionar como un molde para dirigir la síntesis de la hebra complementaria.<sup>61</sup>

## **2.11 Cuantificación y determinación de pureza de ADN**

La pureza del ADN es un factor muy importante para los subsecuentes análisis moleculares. Existen en general métodos diferentes para medir la cantidad de ácidos nucleicos en solución entre los cuales podemos mencionar al método de absorbancia y el de fluorescencia.<sup>66</sup>

### **2.11.1 Espectrofotometría**

La capacidad que tiene el ADN de absorber luz a una determinada longitud de onda (260 nm) permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico de la muestra. Si la densidad óptica (OD) es 1, corresponde a aproximadamente 50 µg/mL de cadena doble de ADN, entonces calculamos la concentración de ADN que tenemos en nuestras muestras, midiendo simplemente su absorbancia, sin necesidad de realizar una curva patrón. Las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 (principalmente por residuos de triptófano), así las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existen algún contaminante proteico. El cálculo de una relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm es una manera común para hacer un estimado de la pureza o evaluar la contaminación de una preparación de ADN con proteínas de ácido nucleico, esta relación debe estar entre los valores de 1,8 y 2,0. Si la muestra es pura, el primer método comúnmente usado para la cuantificación es el de espectrofotometría.<sup>66</sup>

## **2.12 Evaluación genotóxica**

La genética toxicológica estudia los efectos mutagénicos de sustancias químicas y radiaciones, así como las consecuencias para la salud humana de la exposición a mutágenos, considerando como tal a cualquier agente que induzca mutaciones génicas (cambio de uno o pocos pares de bases), aberraciones cromosómicas estructurales (cambios en la estructura) o numéricas (aneuploidías y poliploidías por afecciones en los componentes del aparato mitótico o meiótico) o alteraciones al ADN (formación de aductos, alquilación de bases, intercalamiento de bases), a los mecanismos de reparación (incrementando la sensibilidad a los efectos de muchos mutágenos), a los eventos de recombinación mitótica.<sup>63</sup>

Las plantas medicinales no llevan una indicación metodológica especial para su evaluación genotóxica, por lo que deben ser sometidas a las mismas regulaciones que rigen los fármacos en general. La evaluación genotóxica de

extractos de plantas medicinales deben ser realizadas, en primera instancia, mediante ensayos *in vitro*, validados internacionalmente, que midan el daño en los niveles de mutaciones genéticas y cromosómicas.<sup>63</sup>

En el mundo las guías o rutas críticas para los estudios genotóxicos persiguen como objetivo fundamental evidenciar qué tipo o a qué nivel de organización del ADN opera el daño causado por el compuesto evaluado. En concordancia con ello se reconocen cuatro niveles: mutación génica (nivel I), mutación cromosómica (nivel II), daño primario del ADN (nivel III), transformaciones celulares (nivel IV), entre otras alteraciones<sup>64</sup>. Los ensayos pertenecientes a los dos primeros niveles son muy variados y ampliamente utilizados, en especial las pruebas *in vitro* que se caracterizan por tener una alta sensibilidad y precisión.<sup>37</sup> En los últimos años las pruebas para medir daño a nivel primario del ADN, han alcanzado gran importancia entre los análisis de genotoxicidad.<sup>65</sup>

Si los resultados *in vitro* son negativos, debe continuarse, en segunda instancia, con ensayos *in vivo* que respondan a los mismos niveles de daño genético que se evaluaron *in vitro*. Una vez evaluados los niveles génico y cromosómico, con ensayos *in vitro* e *in vivo*, se deben incluir ensayos que midan daño primario al ADN y de acuerdo con el resultado obtenido, se debe tomar la decisión de realizar ensayos que midan otras alteraciones y carcinogenicidad. En cualquiera de los ensayos y niveles de daño evaluados se deben emplear protocolos estandarizados (validados internacionalmente) que tomen en consideración las dosis, el tipo de exposición y la vía de administración propuesta para el fármaco.<sup>63</sup>

Con el fin de detectar en sus etapas iniciales la acción sobre el material genético se utilizan las siguientes determinaciones *in vitro* que son muy utilizadas en el campo de la investigación científica para detectar genotoxicidad inicial: aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas; micronúcleos, síntesis de ADN no programada y electroforesis de una célula (ensayo del cometa).<sup>63</sup>

### **2.13 Electroforesis en gel**

La electroforesis en gel es un modo conveniente de cuantificar el ADN y analizar su estado físico al mismo tiempo, se puede visualizar si existen contaminantes que pueden estar presentes en la muestra de ADN o si está degradado. Es la aplicación de las técnicas de separación de macromoléculas en un campo

eléctrico en función de su tamaño y carga eléctrica superficial, se define como el método de separación de sustancias cargadas al aplicar un campo eléctrico, de modo que se diferencian en el comportamiento en un campo eléctrico. Aquellas partículas cargadas positivamente (cationes) migrarán hacia el cátodo y las cargadas negativamente (aniones) hacia el ánodo.<sup>66</sup>

Entre las macromoléculas, las más utilizadas son las proteínas seguidas de los ácidos nucleicos, ya que ambos tipos presentan una carga importante, algo que no presentan los lípidos, sin contar con que son insolubles. El método consiste en inmovilizar las muestras en estudio en un material gelatinoso (gel). El gel se somete a una corriente eléctrica durante un período de tiempo determinado. Cada muestra comenzará a migrar a través de los poros del gel con una velocidad diferencial, que dependerá de la carga eléctrica y del tamaño molecular. Cuando las separaciones se han completado se interrumpe el paso de corriente y las muestras separadas se tiñen para visualizarse. Cada muestra se encontrará a una distancia distinta respecto al origen.<sup>66</sup>

Los ácidos nucleicos presentan carga y son solubles ya que tienen un grupo fosfato, parte que confiere la carga, y está presente de forma regular en la estructura. Los ácidos nucleicos tienen la capacidad de migrar en un campo eléctrico y por tanto, son susceptibles de ser separados por electroforesis. El gel se encuentra sumergido en un electrolito tamponado con tris-Borato (no glicina), para garantizar que los ácidos nucleicos estén cargados negativamente; por esto a la técnica se le denomina electroforesis de inmersión. Las moléculas migrarán hacia el polo positivo, de modo que viajarán en esa dirección por el gel, separándose por tamaño ( $n^0$  de nucleótidos), a la hora de cargar la muestra se colocan unos marcadores de frente (6X loading dye) que nos permita detener la electroforesis en el momento que lo creamos oportuno. Para visualizar las bandas, hay que teñir el gel o marcar radiactivamente las moléculas. El método más utilizado en geles de agarosa es el bromuro de etidio, el cual se comporta como un agente intercalante, de modo que además de disminuir la densidad de la molécula, tiene la capacidad de emitir luz cuando se le excita con luz ultravioleta. Hay que tener cuidado con este compuesto ya que es altamente cancerígeno.<sup>66</sup>

La electroforesis en gel es muy utilizada en la detección, control de pureza, caracterización, cuantificación (por comparación con controles) así como preparación y purificación (por extracción de bandas desde el gel) de moléculas

y fragmentos de DNA y RNA. Tiene dos mecanismos de separación: la electroforesis, que separa por la relación carga/tamaño y el tamizado por el gel, que separa mayormente por tamaño. Los geles más comunes son agarosa y poliacrilamida.<sup>66</sup>

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Lugar de trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación se desarrolló entre los meses de agosto a diciembre del 2014. La obtención de los extractos y tamizaje fitoquímico de las plantas en estudio, la extracción de ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ATCC 40028, *Leishmania sp* M 2903 y linfocito humano, los ensayos de genotoxicidad se realizaron en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

#### 3.2 Definición de población y muestra

##### 3.2.1 Población:

Plantas de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", *Ficus carica* L. "higo", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto", que crecen en los diferentes pisos ecológicos de la comunidad de Colpa del distrito de Acos Vinchos, provincia de Huamanga, región de Ayacucho, Perú.

##### 3.2.2 Muestra:

- 1000  $\mu$ L de látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche".
- 1000  $\mu$ L de látex de *Ficus carica* L. "higo".
- 500 g de vainas secas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara".
- 500 g de hojas de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto".

Las muestras fueron obtenidas en la comunidad de Colpa del distrito de Acos Vinchos, provincia de Huamanga, región Ayacucho e inmediatamente transportadas a los laboratorios del Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la UNSCH.

### **3.3 Diseño metodológico para la recolección de datos**

#### **3.3.1 Recolección de la muestra.**

Las muestras de la *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" fueron recolectadas en la comunidad de Colpa del distrito de Acos Vinchos de la provincia de Huamanga, región Ayacucho, en horas de la mañana y fueron inmediatamente transportadas al laboratorio para los ensayos respectivos. Todas ellas en buen estado de conservación.

En el caso de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" las muestras fueron recolectadas en la comunidad de Colpa en horas de la mañana y fueron inmediatamente transportadas al Laboratorio, donde fueron secadas a temperatura ambiente bajo sombra previamente acondicionada, teniendo como base papel Kraft que fue cambiada constantemente y volteando la muestra para un secado uniforme, evitando el deterioro por la humedad y separando aquellas que cambien de color o muestren signos de alteración. Una vez secada la muestra, se trituró empleando un mortero, con la finalidad de reducir hasta un polvo fino y se procedió a realizar la preparación de los extractos hidroalcohólico.

Para la identificación taxonómica se emplearon muestras con hojas, tallos, flores, vainas y frutos lo que corresponde a cada planta, lo cual se realizó en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas por la Blga. Laura Aucasime Medina (Anexo 1, 2, 3 y 4).

#### **3.3.2 Obtención del látex**

El látex de "leche leche" se obtuvo realizando cortes en los tallos verdes, para dejar caer en tubos eppendorf estériles de 1,5 mL; para el caso del higo se realizó un corte en la base del fruto verde (sicono), para dejar caer el látex en tubos eppendorf estériles de 1,5 mL.

#### **3.3.3 Preparación del extracto hidroalcohólico**

Los 500 g de muestra seca y pulverizada de cada planta medicinal en estudio de tara y eucalipto, se maceró en un frasco de vidrio color ámbar por siete días, para ello se utilizó 1 L de alcohol 80° y cubrir a la muestra por lo menos con 1 cm de diferencia; durante el proceso se agitó el frasco por 15 min dos veces al día para que el alcohol se distribuya homogéneamente en la muestra. Las muestras en maceración se mantuvieron en un lugar fresco y oscuro. Luego se procedió a

filtrar con ayuda del papel filtro, finalmente se llevó a un evaporador rotatorio Buchi-3000 a presión reducida y se concentró a sequedad en una estufa Memmert. A partir de las cuales se realizó el tamizaje fitoquímico.

### **3.3.4 Tamizaje fitoquímico del látex de *Euphorbia peplus* L. “leche leche”, *Ficus carica* L. “higo” y extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” y *Eucaliptus globulus* Labill “eucalipto”.**

Se realizó una marcha fitoquímica cualitativa a los látex y extractos hidroalcohólicos obtenidos de las plantas medicinales en estudio, para identificar los diferentes metabolitos secundarios, que se fundamentan en los cambios estructurales ocasionados en los metabolitos presentes, como aparición o desaparición de una coloración, formación o dilución de un precipitado o desprendimiento de gas. Las reacciones de identificación, se realizó siguiendo la metodología propuesta por según Lock<sup>67</sup> y Miranda<sup>68</sup> (Anexo 5,6 y7).

### **3.4 Extracción de ADN genómico de *Staphylococcus aureus*.**

A partir de esta etapa del estudio se desarrolló en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática, se realizó la reactivación y cultivo de la cepa *Staphylococcus aureus* en caldo Trypticase soya y luego en Agar Trypticase soya, respectivamente, con la finalidad de obtener una masa celular bacteriana y extraer el ADN genómico con el siguiente protocolo:<sup>69</sup>

1. Se colocó 400 µL de buffer TE 1X a un tubo eppendorf de 1,5 mL y en ella se transferió con un asa de kolle aproximadamente 100 mg de masa celular del cultivo joven de *Staphylococcus aureus*.
2. Se añadió 60 µL de Lisozima (10 mg/mL) e incubó a 37°C por 2 h en baño maría.
3. Luego se añadió SDS/proteinasa K (75 µL SDS 10% + 5 µL PK 10 mg/mL) e incubó a 65°C por 15 min.
4. Se aumentó 100 µL NaCl 5M más 5 µL de CTAB (N-cetil-N,N,N-Trimetil bromuro de amonio), e incubó a 65°C por 15 min.
5. Se agregó 750 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó agitando suavemente con la mano durante 5 min y se centrifugó a 14 000 rpm por 15 min.
6. Luego de la formación de dos capas en el tubo eppendorf, se trasvasó cuidadosamente el sobrenadante a otro tubo eppendorf.

7. Se agregó 600  $\mu$ L de isopropanol helado al 100%, luego se llevó a refrigeración a  $-20^{\circ}\text{C}$  por una noche.
8. Se centrifugó a 14 000 rpm por 15 min y se descartó el sobrenadante.
9. Se añadió 1000  $\mu$ L de etanol al 70%, se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min.
10. Se descartó el sobrenadante y se rehidrató el sedimento con 100  $\mu$ L de agua bidestilada estéril, luego se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

### **3.5 Extracción de ADN genómico de *Candida albicans* ATCC 40028.**

A partir de esta etapa del estudio se desarrolló en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática, se realizó la reactivación y cultivo de la cepa *Candida albicans*, en caldo Trypticase soya y luego en Agar Sabouraud, con la finalidad de obtener una masa celular bacteriana y se extrajo el ADN genómico con el siguiente protocolo<sup>69</sup>:

1. Se colocó 400  $\mu$ L de buffer TE 1X a un tubo eppendorf de 1,5 mL y en ella se transfirió con un asa de kolle aproximadamente 100 mg de masa celular del cultivo joven de *Candida albicans* y se incubó a  $85^{\circ}\text{C}$  por 25 min.
2. Se adicionó SDS/proteinasa K (100  $\mu$ L SDS 10% + 5  $\mu$ L PK 10 mg/mL) y se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  por 30 min.
3. Se aumentó 100  $\mu$ L NaCl 5M más 5  $\mu$ L de CTAB (N-cetil-N, N, N-Trimetil bromuro de amonio) y se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  por 15 min.
4. Se agregó 750  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó agitando suavemente con la mano durante 5 min y se centrifugó a 14 000 rpm por 15 min.
5. Luego de la formación de dos capas en el tubo eppendorf, se trasvasó cuidadosamente el sobrenadante a otro tubo eppendorf.
6. Se adicionó 600  $\mu$ L isopropanol helado al 100%, luego se llevó a refrigeración a  $-20^{\circ}\text{C}$  por una noche.
7. Se centrifugó a 14 000 rpm por 15 min y se descartó el sobrenadante.
8. Se añadió 1000  $\mu$ L de etanol al 70%, se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min.
9. Se descartó el sobrenadante y se dejó en la estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min.
10. Se rehidrató el sedimento con 90  $\mu$ L de TE 0,1X, luego se dejó en incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 h para que el ADN se disperse en el buffer.
11. Se agregó 1  $\mu$ L ARNasa de 20 mg/  $\mu$ L, se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 h y luego se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

### **3.6 Extracción de ADN genómico de *Leishmania sp* M 2903.**

#### **3.6.1 Obtención de parásitos a partir de cultivo.**

A los parásitos crecidos en los frascos de cultivo, se les agregó 5 mL de solución salina estéril. La fase líquida fue filtrada por una doble capa de gasa para atrapar el residuo del medio de cultivo, sobre tubos de centrifugación fríos. A los tubos se les agregó 5 mL de solución salina y después se centrifugó a 4°C a 5000 rpm por 15 min. El sobrenadante se descartó agregando al pellet 10 mL de solución salina fría, se volvió a suspender el pellet suavemente y se centrifugó como la vez anterior, este lavado se repitió por tres veces, luego del cual nuevamente se suspendió el pellet en 1 mL de solución salina fría, se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se guardó el pellet a -70°C.

#### **3.6.2 Obtención de ADN genómico de *Leishmania sp* M 2903**

A partir de esta etapa del estudio se desarrolló en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática, se realizó la reactivación del cultivo, el pellet del parásito fue descongelado y resuspendido con el siguiente protocolo.<sup>69</sup>

1. Se colocó 1 mL de buffer de digestión (100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl).
2. Se añadió 1 mL de SDS/proteinasa K (SDS 1% + proteinasa K 1 mg/mL) y se incubó a 55°C por 5 h en baño maría con agitación suave ocasional.
3. Luego se añadió 5 µL de ARNasa (100 µg/mL) y se incubó a 50°C por 2 h.
4. Se agregó 100 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) mezclándose por inversión cuidadosamente, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min y se trasvasó la fase acuosa a otro tubo eppendorf.
5. Se repitió el procedimiento 4 una vez más luego solamente con cloroformo.
6. Luego de la formación de dos capas en el tubo eppendorf, se trasvasó cuidadosamente el sobrenadante a otro tubo eppendorf.
7. Se añadió 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto helado. Se dejó precipitar el ADN a -20°C por 2 h.
8. Se centrifugó a 12 000 rpm por 30 min, el pellet se lavó dos veces con etanol al 70% y se dejó secar a 40°C hasta que el alcohol se evaporó totalmente.
9. Se descartó el sobrenadante y se rehidrató el sedimento con 1 mL de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) y almacenado a 4°C.

### **3.7 Extracción de ADN genómico de linfocito humano:**

Se solicitó la donación de seis unidades de bolsa colectora de sangre fraccionada conteniendo el paquete de glóbulos blancos, para el desecho, se consiguió en donación del Banco de Sangre del Hospital Regional de Ayacucho "Miguel Ángel Mariscal Llerena", para la obtención del ADN de linfocitos con el siguiente protocolo descrito en Miranda.<sup>68</sup>

1. Se transfirió 1 mL de sangre (paquete globular) a un tubo de centrifuga con tapa rosca y se adicionó 9 mL del tampón Tris- HCl 50 mM (pH 7.7) precalentado a 37°C.
2. Se homogenizó e incubó a 37°C por 30 min, se centrifugó a 2500 rpm por 10 min para sedimentar los linfocitos.
3. Se descartó el sobrenadante aspirándolo con una pipeta Pasteur dejando 1 mL del centrifugado en la parte inferior del tubo.
4. Se repitió dos veces los procedimientos 1 (esta vez con 5 mL de tampón Tris – HCl 50 mM (pH 7,7), 2 y 3 hasta obtener un preparado claro.
5. Se adicionó a 1 mL del centrifugado, 9 mL de solución salina (NaCl al 0.85%), se homogenizó y centrifugó a 2500 rpm por 10 min.
6. Se aspiró y descartó el sobrenadante dejando solo el sedimento, se re-suspendió el paquete celular en 0,4 mL de la solución "High TE" (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 100 mM). Luego se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL.
7. Se adicionó 0,4 mL de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 40 mM; SDS al 1%; NaCl 10 mM) precalentada a 50°C.
8. Se adicionó 7 µL de la solución de proteinasa K (20 mg/mL) e incubó por una noche a 53°C.
9. Se adicionó 750 µL de la solución de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) y se homogenizó por inversión delicadamente durante 10 min.
10. Se instaló el tubo en la microcentrifuga a 14 000 rpm por 10 min para separar las fases, luego se aspiró la fase superior acuosa que contiene el DNA y se transfirió a un tubo nuevo de microcentrifuga de 1,5 mL.
11. A la fase acuosa, se adicionó 750 µL de la solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y homogenizó por inversión durante 5 min. Nuevamente se centrifugó por 10 min a 14 000 rpm, se aspiró la fase acuosa que contiene el DNA y transfirió a un tubo nuevo de microcentrifuga de 1,5 mL.
12. Se adicionó la solución de acetato de sodio 3M pH 5,2 en cantidad 20 µL.

13. Se agregó 600  $\mu\text{L}$  de alcohol isopropílico helado y se dejó en reposo por 1 h en hielo. Luego se centrifugó a 14 000 rpm por 15 min.
14. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se enjuagó el sedimento con 1 mL de etanol al 70%.
15. Se centrifugó nuevamente a 14 000 rpm por 10 min eliminando el alcohol y dejando secar el sedimento a temperatura ambiente.
16. Se re-suspendió el sedimento con 80  $\mu\text{L}$  de la solución "Low TE" (Tris HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) y se guardó en la nevera hasta su posterior análisis.

### **3.8 Cuantificación de ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ATCC 40028, *Leishmania sp* M 2903 y linfocito humano.**

#### **3.8.1 Por espectrofotometría.**

Procedimiento:

1. Se homogenizó las muestras de ADN con una micropipeta de 100  $\mu\text{L}$ , manteniendo el tipo dentro de la muestra, luego presionando y retrocediendo el pulsador lentamente de manera uniforme unas 10 veces.
2. Se preparó el espectrofotómetro UV marca Eppendorf Bio Photometer plus, con la opción de cuantificar el ADN.
3. Para limpiar la superficie de muestra del adaptador se depositó 2  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril y se absorbió el agua utilizando papel tizú, para mejor limpieza se repitió por dos veces.
4. Nuevamente se depositó 2  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril sobre la superficie del adaptador, se colocó la tapa de factor 50 – Lp 0,2 mm y se presionó la opción BLANK para calibrar y obtener "cero de Absorbancia" (0,000 A°).
5. Se absorbió el agua utilizando papel tizú, luego se depositó 2  $\mu\text{L}$  de la muestra de ADN, se colocó la tapa y presionó la opción SAMPLE para ver el resultado de la cuantificación y pureza de ADN en la pantalla del equipo; luego se absorbió la muestra con papel "tizú".
6. Se repitió los pasos 4 y 5 para la cuantificación de cada muestra de ADN.
7. Terminada la cuantificación de ADN, se depositó 2  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril, se secó con papel "tizú" y se apagó el equipo.

#### **3.8.2 Por electroforesis.**

A partir del ADN cuantificado por espectrofotometría, se realizó diluciones siguiendo los siguientes pasos:

1. Conociendo la concentración de ADN de una muestra, se realizó diluciones sucesivas al décimo con agua bidestilada estéril, hasta obtener una concentración final de 10 ng/μL, en un volumen final de 100 μL.
2. A partir de ésta dilución de la muestra de ADN, se procedió a preparar volúmenes de carga para electroforesis en gel de agarosa al 1%, según la siguiente tabla:

Tabla 1. Preparación de las diluciones de ADN para patrones de banda en electroforesis.

ADN stock (10 ng/μL)	Buffer Loading 6X(μL)	Volumen final de carga(μL)	Concentración final de ADN(ng)
4	2	6	60

3. Se cargó todo el contenido de las mezclas a cada uno de los pocillos del gel de agarosa al 1%, en sus respectivos carriles.
4. Luego se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se dejó correr a 50 voltios por dos horas.
5. Se coloreó el gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% por 10 min y dos enjuagues suaves con agua corriente, luego se visualizó por radiación en UV en el sistema de registrador de imágenes marca Biometra UV solo TS. Adicionalmente se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; en ambos casos para visualizar las bandas de ADN a diferentes concentraciones.

### 3.9 Ensayos de la genotoxicidad *in vitro*:

Se desarrolló siguiendo el "Método Tomasevich" descrito en Miranda;<sup>68</sup> con las siguientes fases:

#### 3.9.1 Fase I: cuantificación y preparación Stock de ADN genómico.

El ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania sp* y linfocito humano obtenido, fue cuantificado por espectrofotometría UV en eppendorf bio photometer plus; luego se preparó un stock de ADN a concentración de 10 ng/μL en un volumen final de 100 μL, para cada planta medicinal en estudio.

#### 3.9.2 Fase II: Prueba de genotoxicidad *in vitro* en ADN genómico en estudio.

**Con látex:** Se preparó las soluciones del látex de cada planta medicinal, a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, con agua bidestilada estéril.

Se acondicionó las soluciones de genotoxicidad *in vitro* de ADN genómico, de acuerdo al detalle siguiente:

Tabla 2. Preparación de las soluciones para la prueba de genotoxicidad “*in vitro*” de ADN genómico, por efecto de látex de plantas medicinales.

Condiciones		Soluciones para prueba de genotoxicidad <i>in vitro</i>				
Nº de tubo		1	2	3	4	5
Stock de ADN (1 000 ng/µL)		14	14	14	14	14
Volumen en µL						
Látex	Concentración (%)	10	25	50	100	-
	Volumen (µL)	0,6	1,5	3	6	-
Agua bidestilada estéril		5,4	4,5	3	-	6
Volumen total (µL)		20	20	20	20	20
Incubación a 37°C (h)		1				

Se realizó cuatro repeticiones de las pruebas de genotoxicidad *in vitro*, de cada planta medicinal en estudio.

**Con extracto hidroalcohólico:** Se preparó las soluciones de los extractos hidroalcohólico de cada planta medicinal en estudio, a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, con agua bidestilada estéril.

Se acondicionó las soluciones de genotoxicidad *in vitro* de ADN genómico, de acuerdo al detalle siguiente:

Tabla 3. Preparación de las soluciones para la prueba de genotoxicidad *in vitro* de ADN genómico, por efecto de extractos de plantas medicinales.

Condiciones		Soluciones para prueba de genotoxicidad <i>in vitro</i>				
Nº de tubo		1	2	3	4	5
Stock de ADN (1 000 ng/µL)		14	14	14	14	14
Volumen en µL						
Extracto hidroalcohólico	Concentración(mg/mL)	5	10	50	100	-
	Volumen (µL)	6	6	6	6	-
Agua bidestilada estéril		-	-	-	-	6
Volumen total (µL)		20	20	20	20	20
Incubación a 37°C (h)		1				

Se realizó cuatro repeticiones de las pruebas de genotoxicidad *in vitro*, de cada planta medicinal en estudio.

### 3.9.3 Fase III: Electroforesis para la detección de genotoxicidad.

Se preparó el gel de agarosa al 1% y se colocó en una cámara de electroforesis Biometra.

Para el volumen de carga en gel de agarosa, de los productos de la reacción de genotoxicidad, se utilizó las siguientes cantidades: 1  $\mu\text{L}$  de loading (colorante señalizador de migración de las bandas), 4  $\mu\text{L}$  de la solución para la prueba de genotoxicidad *in vitro* y 2  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril, con volumen final de 7  $\mu\text{L}$ , se mezcló y se cargó en el respectivo pozo del gel de agarosa para electroforesis. Se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se corrigió a 30 voltios (V) por 5 h.

### 3.9.4 Fase IV: Radiación UV para la visualización de genotoxicidad.

Luego del tiempo de corrido electroforético, se sumergió el gel de agarosa en una solución de bromuro de etidio al 1% durante 10 min aproximadamente, se enjuagó con abundante agua corriente y se hizo la lectura por radiación en UV en el sistema de registrador de imágenes marca Biometra UV solo TS, adicionalmente se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; para visualizar los fragmentos del ADN producto de la digestión.

### 3.9.5 Fase V: Interpretación y clasificación del registro visual de genotoxicidad.

La escala de los valores numéricos correspondientes a los niveles de fragmentación del ADN como producto de la genotoxicidad, fueron visualizados en el registro fotográfico, fue basado en la clasificación del "ensayo cometa" propuesto por Speit (1995) y Collins (2004), en tesis de Mónica Marisol Larrea Poma.<sup>44</sup>

Tabla 4. Valoración numérica de la genotoxicidad.

CLASE	GENOTOXICIDAD
0	fragmentación de ADN < 5%
1	fragmentación de ADN entre 5 a 20%
2	fragmentación de ADN entre 20 a 40%
3	fragmentación de ADN entre 40 a 95%
4	fragmentación de ADN > 95%

### **3.10 Análisis Estadístico**

Los datos fueron agrupados y presentados en tablas, expresados en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. La comparación de genotoxicidad se evaluó mediante el paquete estadístico SPSS, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para más de dos muestras independientes. El valor de  $p \leq 0,05$ , se consideró como el nivel estadísticamente significativo.

#### **IV. RESULTADOS**

Tabla 5. Metabolitos secundarios presentes en el látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche". Ayacucho 2014.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Mayer	+++	Precipitado blanco
Flavonoides	Shinoda	+++	Anaranjado rojizo
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	++	Precipitado azul
Saponinas	Espuma	++	Espuma
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	+	Precipitado naranja

Leyenda:

(+) : Leve

(++) : Moderada

(+++): Abundante

Tabla 6. Metabolitos secundarios presentes en el látex de *Ficus carica* L. "higo". Ayacucho 2014.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Mayer	+++	Precipitado blanco
Flavonoides	Shinoda	++	Marrón claro
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	++	Precipitado naranja

Leyenda:

(+) : Leve

(++) : Moderada

(+++): Abundante

Tabla 7. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara". Ayacucho 2014.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Wagner	+++	Precipitado blanco
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración naranja
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+++	Coloración azul
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	+++	Precipitado naranja
Quinonas	Borntrager	+++	Coloración roja

Leyenda:

(+) : Leve

(++) : Moderada

(+++): Abundante

Tabla 8. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto". Ayacucho 2014.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Wagner	+++	Precipitado blanco
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración roja
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+++	Verde intensa
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	++	Precipitado naranja
Quinonas	Borntrager	++	Coloración roja

Leyenda:

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

Tabla 9. Cuantificación de ADN genómico extraído de *Staphylococcus aureus* por espectrofotometría UV. Ayacucho 2014.

Muestra	Concentración ADN (µg/mL)	ADN	Proteínas	Pureza de ADN
		A 260	A 280	A260/A280
1	1907,6	0,763	0,399	1,91
2	2280,0	0,912	0,480	1,90
3	2446,2	0,978	0,557	1,76
4	1634,7	0,654	0,352	1,86
5	1558,3	0,583	0,300	1,94
6	2212,8	0,885	0,485	1,82

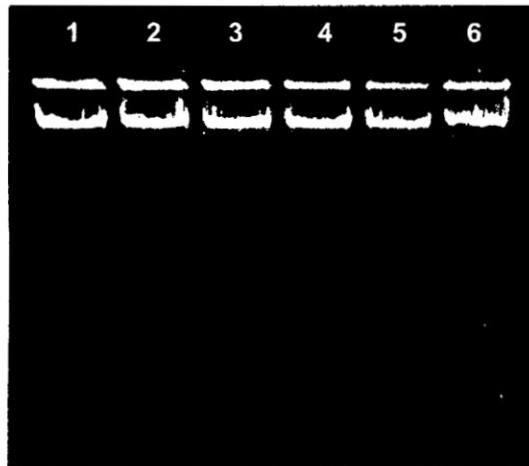


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de seis muestras del ADN genómico extraído de *Staphylococcus aureus*. Ayacucho 2014.

Leyenda:

Carril 1: cultivo 1

Carril 2: cultivo 2

Carril 3: cultivo3

Carril 4: cultivo 4

Carril 5: cultivo 5

Carril 6: cultivo 6

Volumen de carga:

Muestra (4  $\mu$ L) + colorante de carga (1  $\mu$ L) + agua bidestilada estéril (2  $\mu$ L) =7  $\mu$ L

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por dos horas.

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

Tabla 10. Cuantificación de ADN genómico extraído de *Candida albicans* ATCC 40028 por espectrofotometría UV. Ayacucho 2014.

Muestra	Concentración ADN ( $\mu\text{g/mL}$ )	ADN	Proteínas	Pureza de ADN
		A 260	A 280	A260/A280
1	1122,8	0,449	0,215	2,09
2	3520,8	1,408	0,693	2,00
3	3577,7	1,431	0,721	1,98
4	1483,5	0,803	0,422	1,90
5	3857,8	1,543	0,785	1,96
6	2439,9	0,976	0,485	2,01

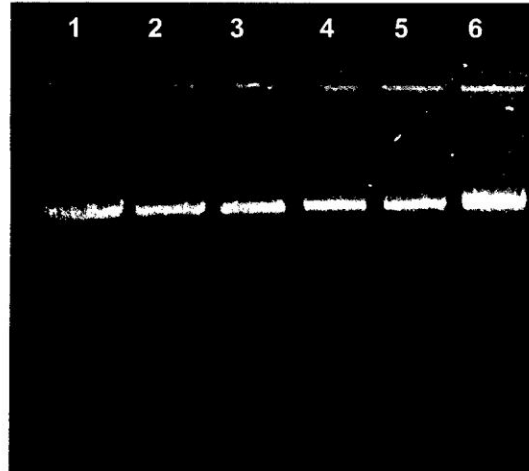


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de seis muestras del ADN genómico extraído de *Candida albicans* ATCC 40028. Ayacucho 2014.

**Leyenda:**

Carril 1: cultivo 1

Carril 2: cultivo 2

Carril 3: cultivo3

Carril 4: cultivo 4

Carril 5: cultivo 5

Carril 6: cultivo 6

Volumen de carga:

Muestra (4  $\mu\text{L}$ ) + colorante de carga (1  $\mu\text{L}$ ) + agua bidestilada estéril (2  $\mu\text{L}$ ) =7  $\mu\text{L}$

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por dos horas.

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

Tabla 11. Cuantificación de ADN genómico extraído de *Leishmania spM 2903* por espectrofotometría UV. Ayacucho 2014.

Muestra	Concentración ADN (µg/mL)	ADN	Proteínas	Pureza de ADN
		A 260	A 280	A260/A280
1	1514,2	0,606	0,334	1,81
2	1718,3	1,058	0,580	1,82
3	1095,0	0,438	0,265	1,66
4	1795,2	1,518	0,848	1,79
5	1617,7	1,431	0,795	1,80
6	2272,3	1,069	0,582	1,83

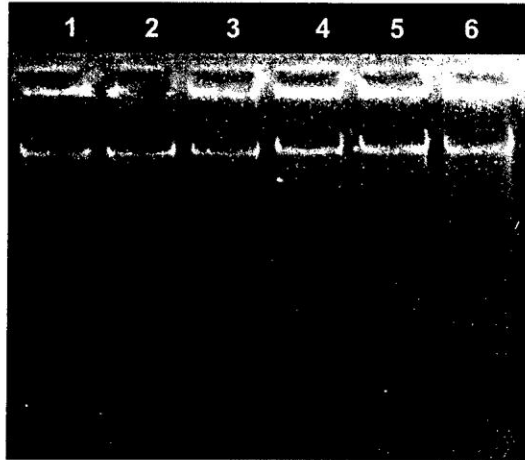


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de seis muestras del ADN genómico extraído de *Leishmania sp* M 2903. Ayacucho 2014.

Leyenda:

Carril 1: cultivo 1.

Carril 2: cultivo 2.

Carril 3: cultivo3

Carril 4: cultivo 4.

Carril 5: cultivo 5.

Carril 6: cultivo 6.

Volumen de carga:

Muestra (4  $\mu$ L) + colorante de carga (1  $\mu$ L) + agua bidestilada estéril(2  $\mu$ L) = 7  $\mu$ L

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por dos horas.

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

Tabla 12. Cuantificación de ADN genómico extraído de linfocito humano por espectrofotometría UV. Ayacucho 2014.

Muestra	Concentración ADN (µg/mL)	ADN	Proteínas	Pureza de ADN
		A 260	A 280	A260/A280
1	3306,4	2,123	1,353	1,57
2	2776,4	1,111	0,824	1,35
3	1389,6	0,556	0,264	2,10
4	2672,3	1,069	0,532	2,01
5	2731,7	1,093	0,596	1,85
6	1634,7	0,654	0,352	1,86

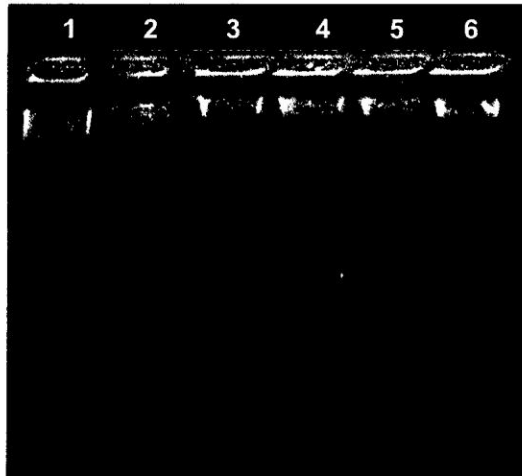


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de seis bolsas colectoras de sangre del ADN genómico extraído de linfocito humano. Ayacucho 2014.

**Leyenda:**

Carril 1: ADN genómico de bolsa 1.

Carril 2: ADN genómico de bolsa 2.

Carril 3: ADN genómico de bolsa 3.

Carril 4: ADN genómico de bolsa 4.

Carril 5: ADN genómico de bolsa 5.

Carril 6: ADN genómico de bolsa 6.

Volumen de carga:

Muestra (4  $\mu$ L) + colorante de carga (1  $\mu$ L) + agua bidestilada estéril(2  $\mu$ L) = 7  $\mu$ L

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por dos horas.

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

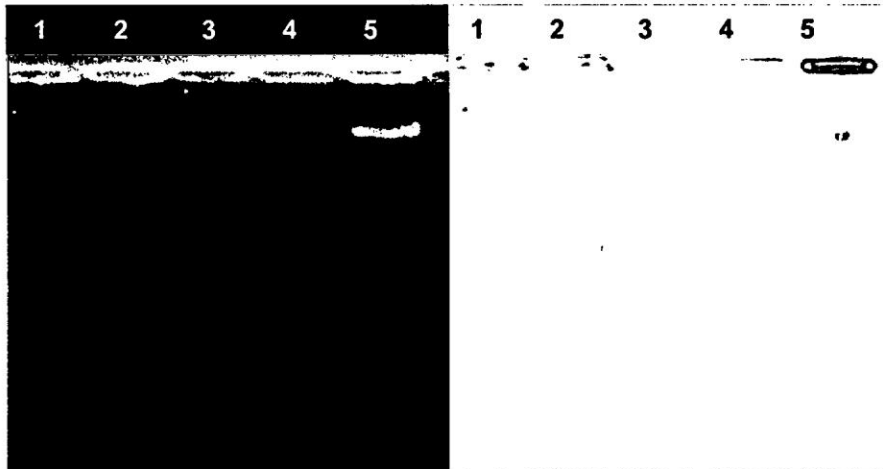


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100% frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

Leyenda:

Carril 1: Con 10% de látex.

Carril 2: Con 25% de látex.

Carril 3: Con 50% de látex.

Carril 4: Con 100% de látex.

Carril 5: ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a 1000 ng/μL (control).

Volumen de carga:

Muestra (4 μL) + colorante de carga (1 μL) + agua bidestilada estéril (2 μL)=7 μL.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

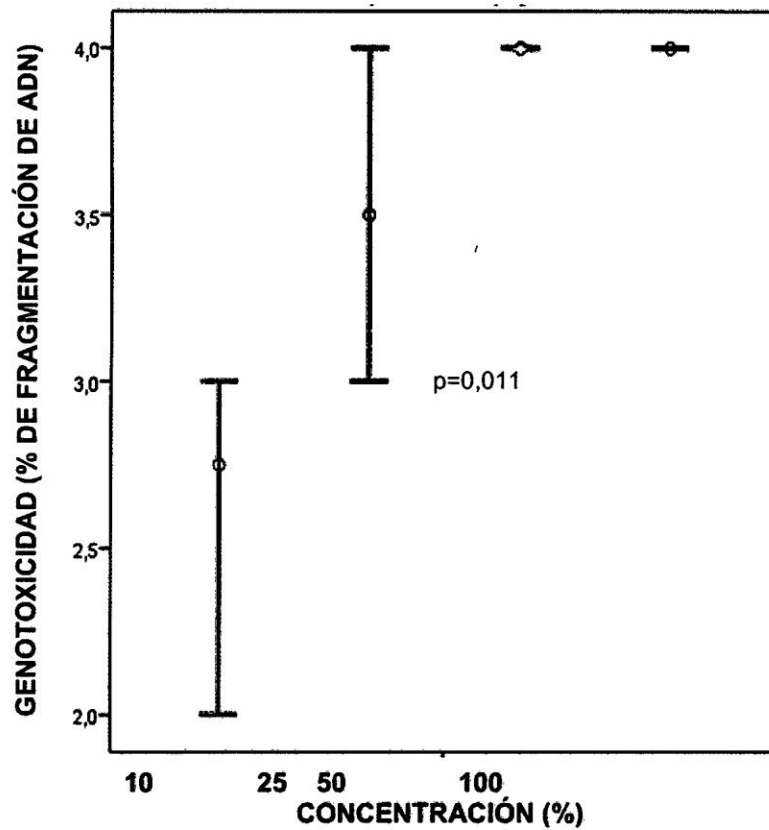


Figura 6. Genotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

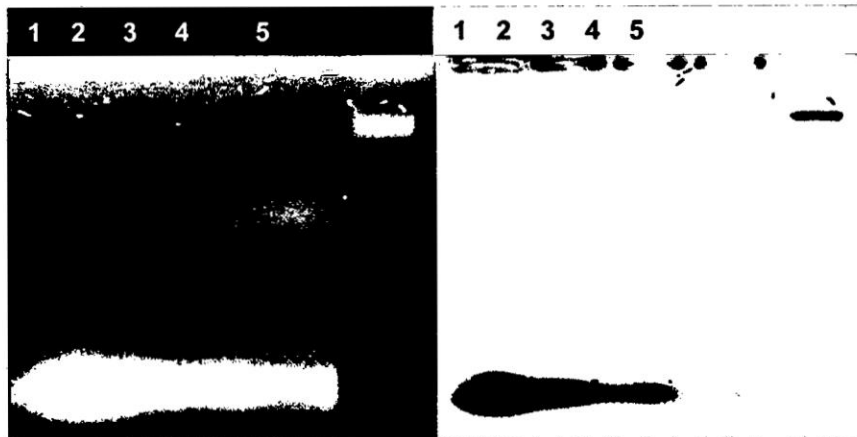


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de lagenotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de *Candida albicans* ATCC 40028a 1000 ng/ $\mu$ L, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

**Leyenda:**

Carril 1: Con 10% de látex.

Carril 2: Con 25% de látex.

Carril 3: Con 50% de látex.

Carril 4: Con 100% de látex.

Carril 5: ADN genómico de *Candida albicans* 40028 a 1000 ng/ $\mu$ L (control).

**Volumen de carga:**

Muestra (4  $\mu$ L) + colorante de carga (1  $\mu$ L) + agua bidestilada estéril (2  $\mu$ L)=7  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

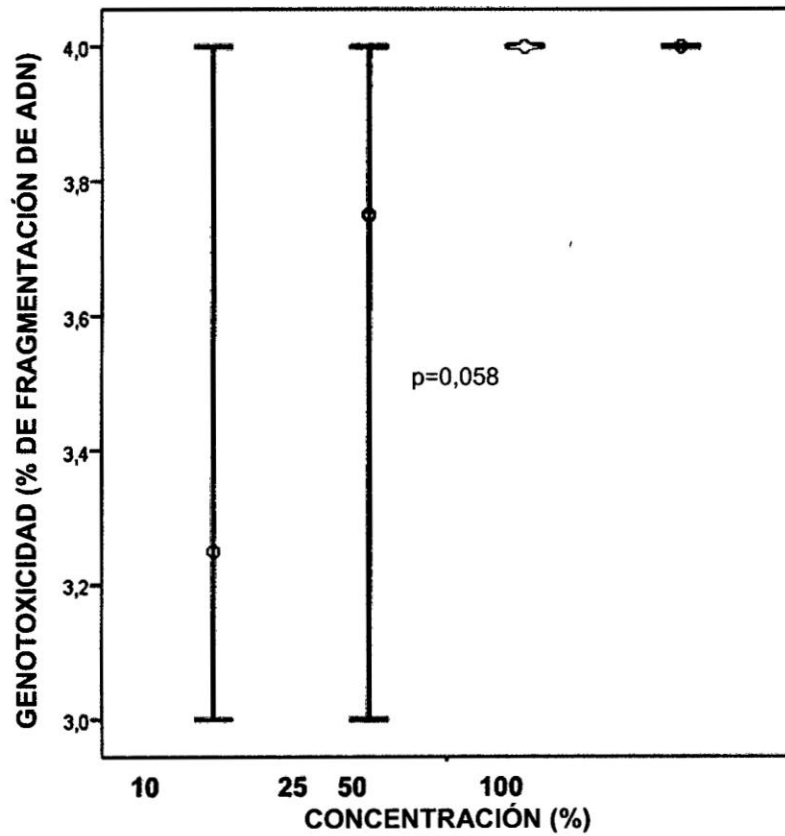


Figura 8. Genotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico del *Candida albicans* ATCC 40028, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

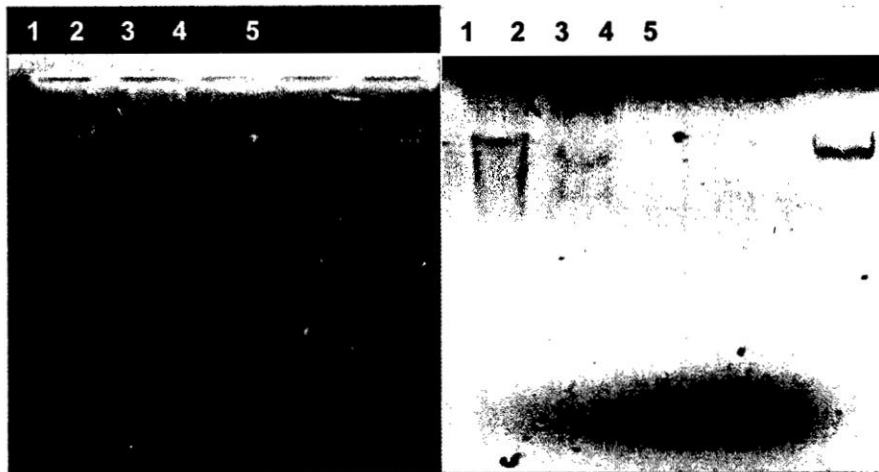


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de lagenotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de *Leishmania sp* M2903a 1000 ng/ $\mu$ L, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

Leyenda:

Carril 1: Con 10% de látex.

Carril 2: Con 25% de látex.

Carril 3: Con 50% de látex.

Carril 4: Con 100% de látex.

Carril 5: ADN genómico de *Leishmania sp* M2903a 1000 ng/ $\mu$ L (control).

Volumen de carga:

Muestra (4  $\mu$ L) + colorante de carga (1  $\mu$ L) + agua bidestilada estéril (2  $\mu$ L)=7  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

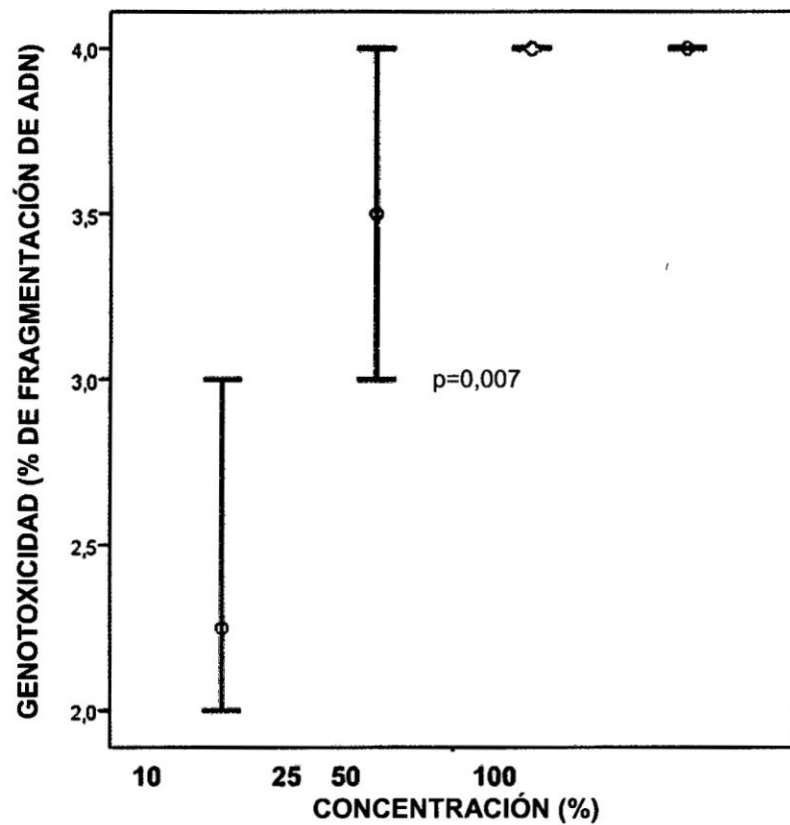


Figura 10. Genotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. “leche leche” a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Leishmania* sp M2903, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

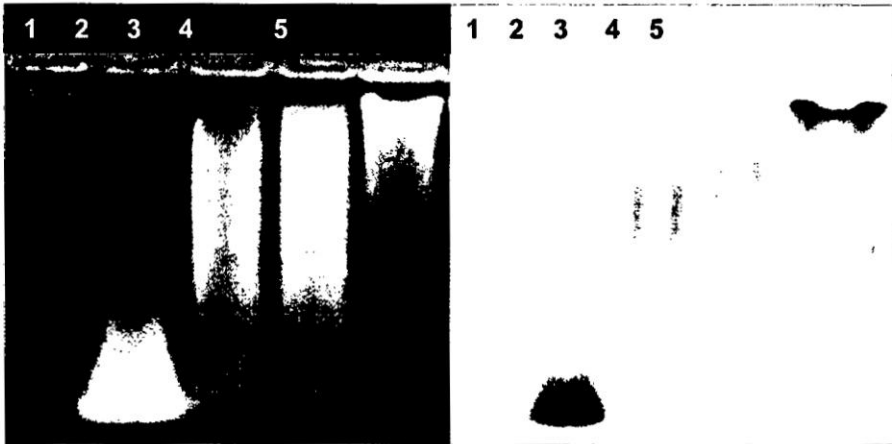


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de lagenotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10%, frente al ADN genómico de linfocito humano a 1000 ng/ $\mu$ L, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

**Leyenda:**

Carril 1: Con 100% de látex.

Carril 2: Con 50% de látex.

Carril 3: Con 25% de látex.

Carril 4: Con 10% de látex.

Carril 5: ADN genómico de linfocito humano a 1000 ng/ $\mu$ L (control).

Volumen de carga:

Muestra (4  $\mu$ L) + colorante de carga (1  $\mu$ L) + agua bidestilada estéril (2  $\mu$ L)=7  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

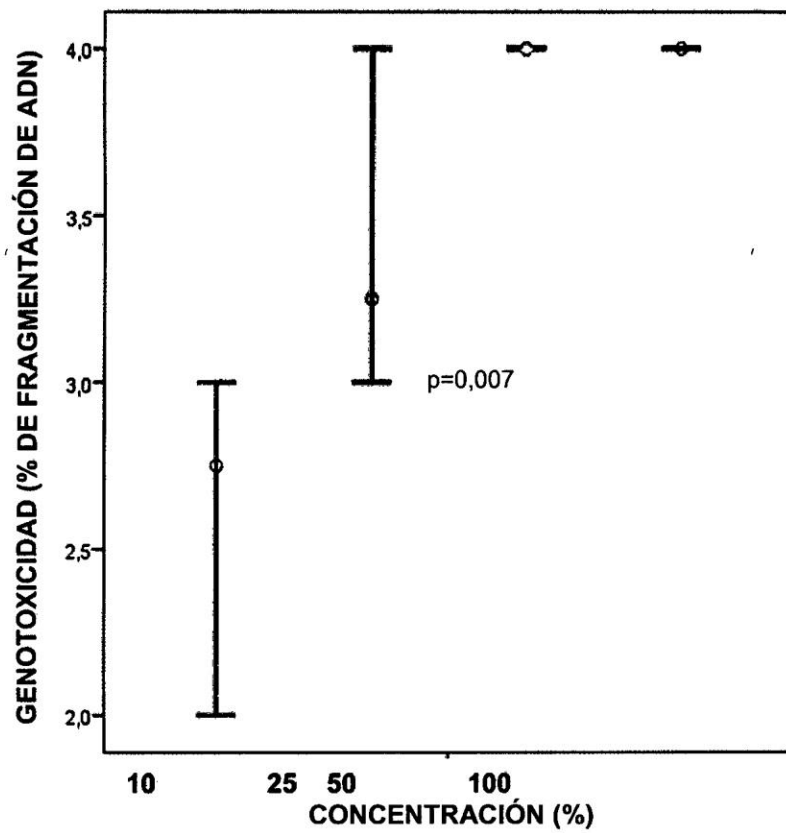


Figura 12. Genotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

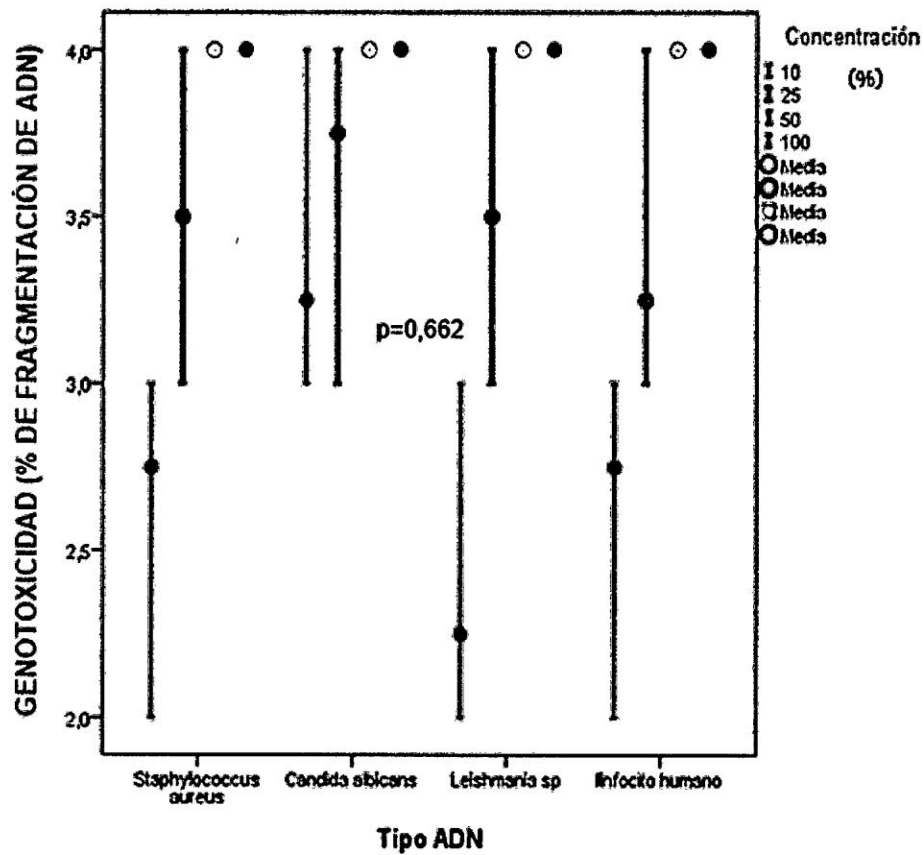


Figura 13. Comparación de la genotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a cuatro diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ATCC 40028, *Leishmania* sp M2903 y linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

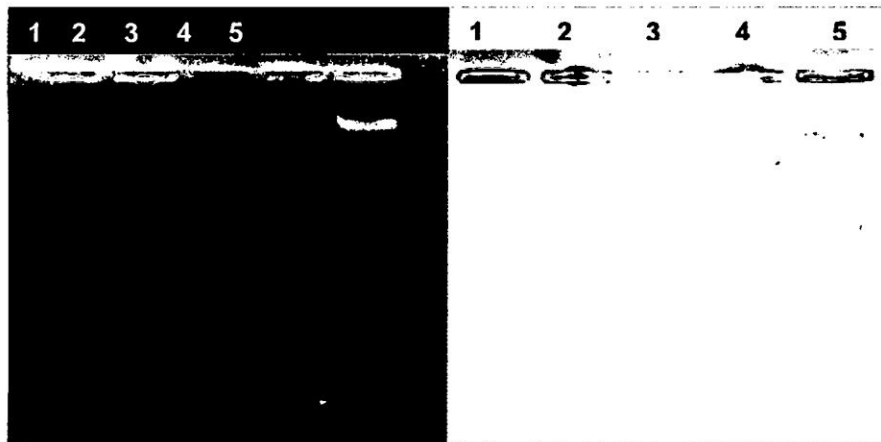


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de lagenotoxicidad del látex de *Ficus crica* L. "higo" a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100% frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

Leyenda:

Carril 1: Con 10% de látex.

Carril 2: Con 25%de látex.

Carril 3: Con 50%de látex.

Carril 4: Con 100%de látex.

Carril 5: ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a 1000 ng/μL (control).

Volumen de carga:

Muestra (4 μL) + colorante de carga (1 μL) + agua bidestilada estéril (2 μL)=7 μL.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

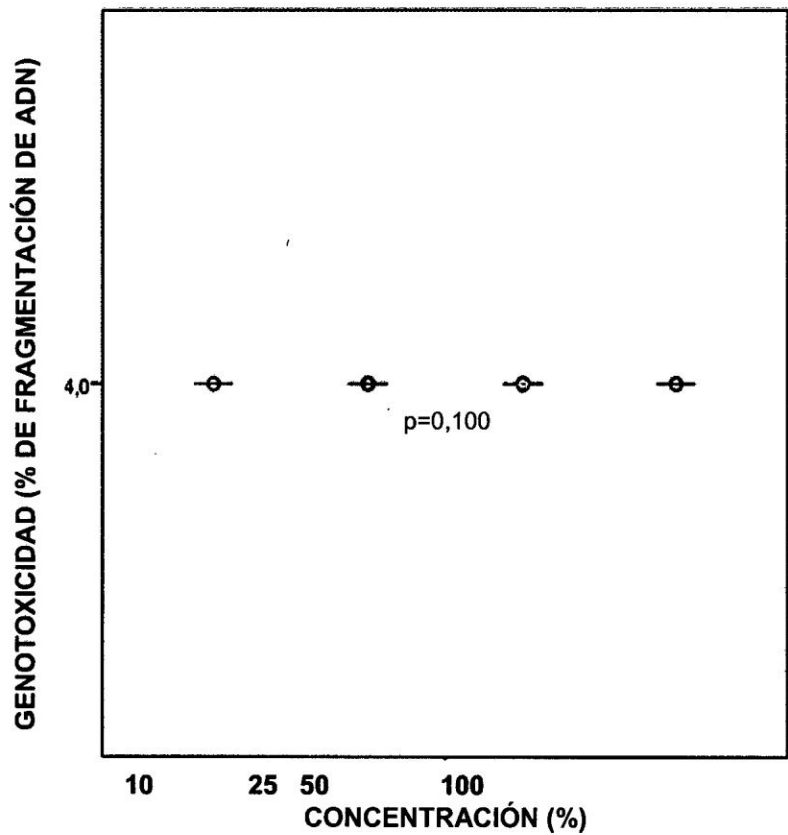


Figura 15. Genotoxicidad del látex de *Ficus carica* L. "higo" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

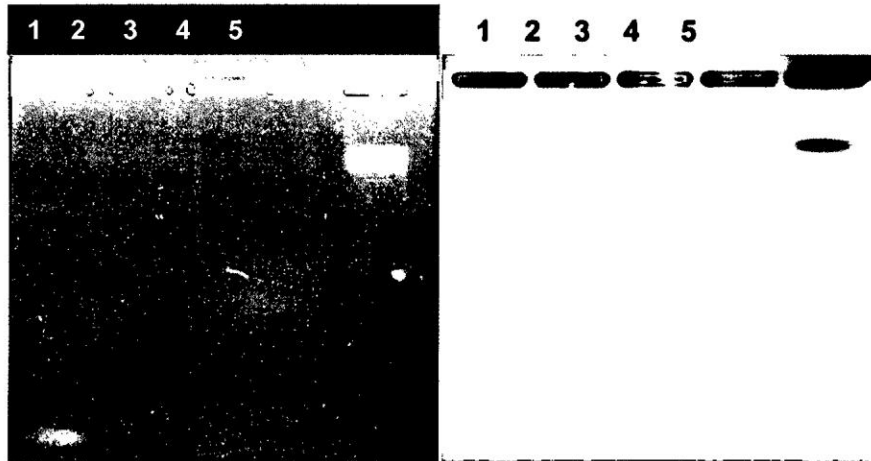


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del látex de *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de *Candida albicans* ATCC 40028a 1000 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

**Leyenda:**

Carril 1: Con 10% de látex.

Carril 2: Con 25% de látex.

Carril 3: Con 50% de látex.

Carril 4: Con 100% de látex.

Carril 5: ADN genómico de *Candida albicans* 1000 ng/μL (control).

Volumen de carga:

Muestra (4 μL) + colorante de carga (1 μL) + agua bidestilada estéril (2 μL)=7 μL.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

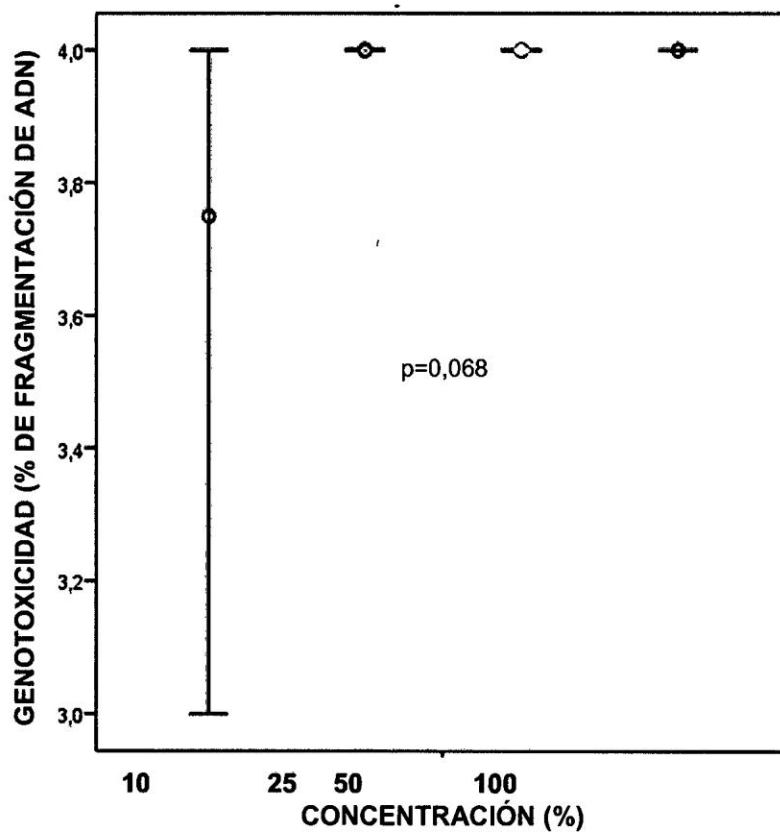


Figura 17. Genotoxicidad del látex de *Ficus carica*L. "higo" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Candida albicans* ATCC 40028, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

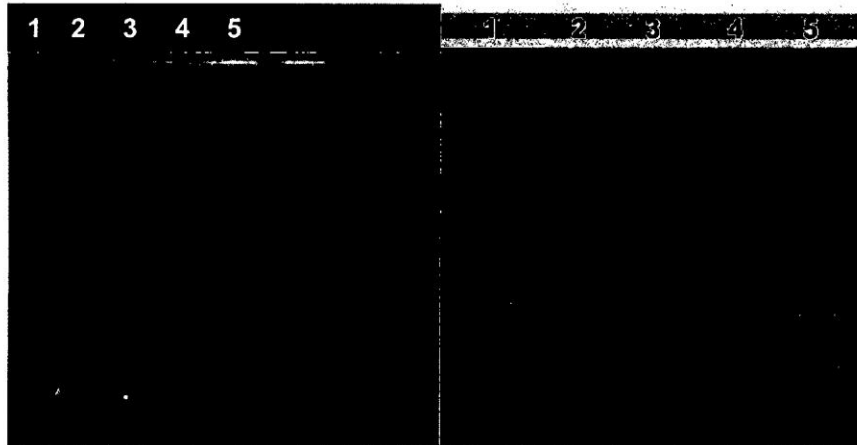


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del látex de *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de *Leishmania sp* M2903 a 1000 ng/ $\mu$ L, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

**Leyenda:**

Carril 1: Con 10% de látex.

Carril 2: Con 25% de látex.

Carril 3: Con 50% de látex.

Carril 4: Con 100% de látex.

Carril 5: ADN genómico de *Leishmania sp* M2903a 1000 ng/ $\mu$ L (control).

Volumen de carga:

Muestra (4  $\mu$ L) + colorante de carga (1  $\mu$ L) + agua bidestilada estéril (2  $\mu$ L)=7  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

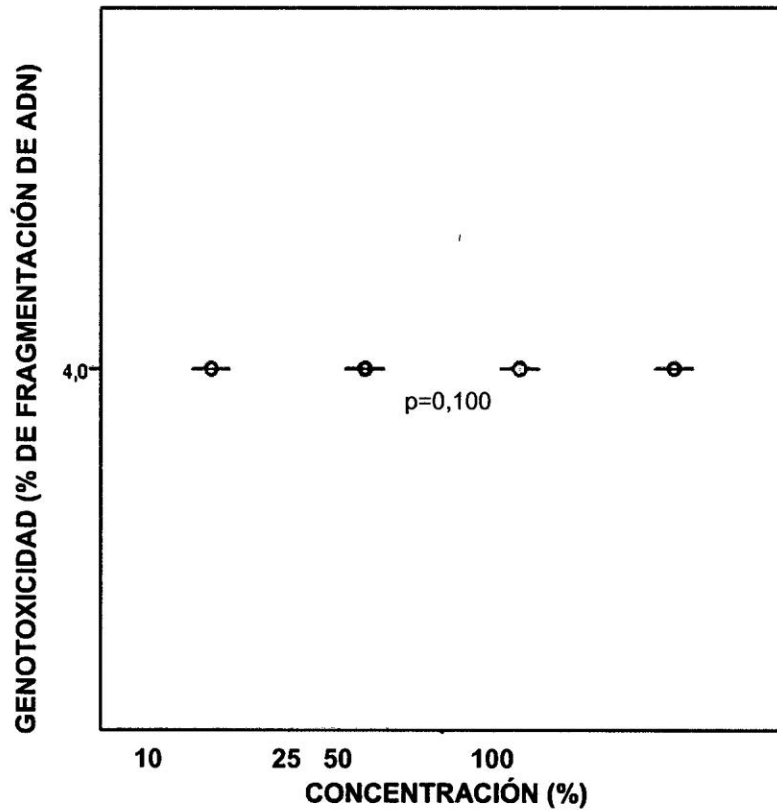


Figura 19. Genotoxicidad del látex de *Ficus carica* L. "higo" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Leishmania* sp M2903, con durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

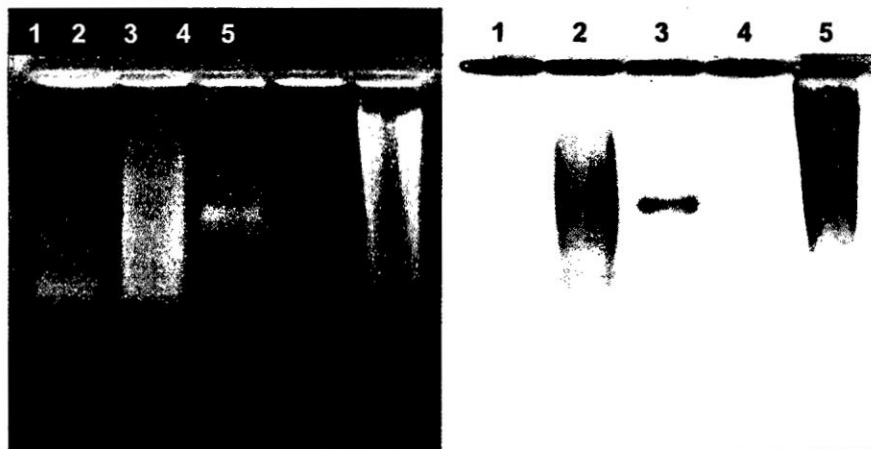


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del látex de *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 25%, 10%, 50% y 100%, frente al ADN genómico de linfocito humano a 1000 ng/ $\mu$ L, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

Leyenda:

Carril 1: Con 25% de látex.

Carril 2: Con 10% de látex.

Carril 3: Con 50% de látex.

Carril 4: Con 100% de látex.

Carril 5: ADN genómico de linfocito humano a 1000 ng/ $\mu$ L (control).

Volumen de carga:

Muestra (4  $\mu$ L) + colorante de carga (1  $\mu$ L) + agua bidestilada estéril (2  $\mu$ L)=7  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

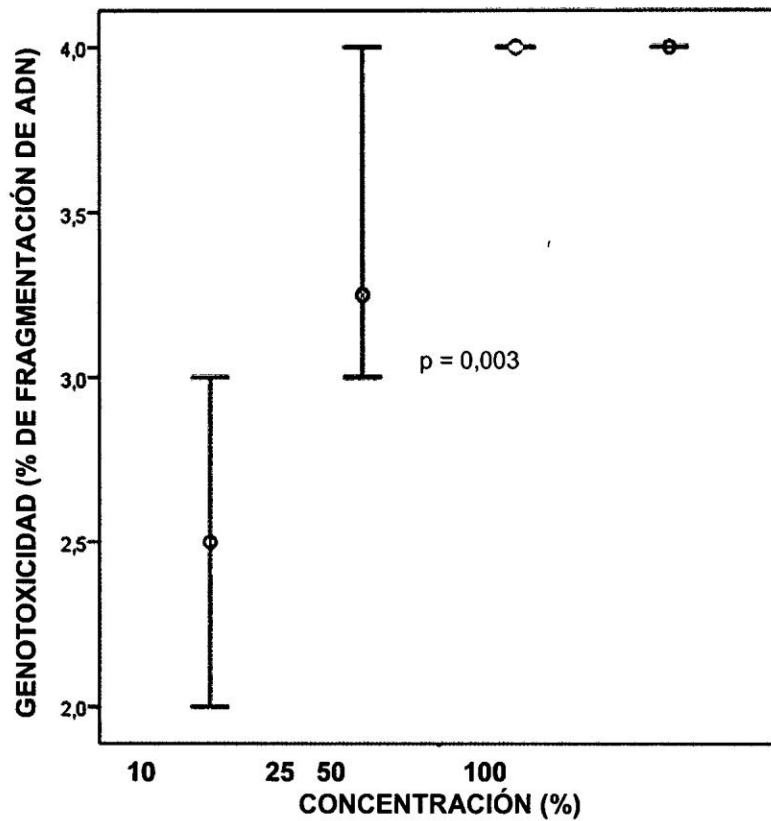


Figura 21. Genotoxicidad del látex de *Ficus carica* L. "higo" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

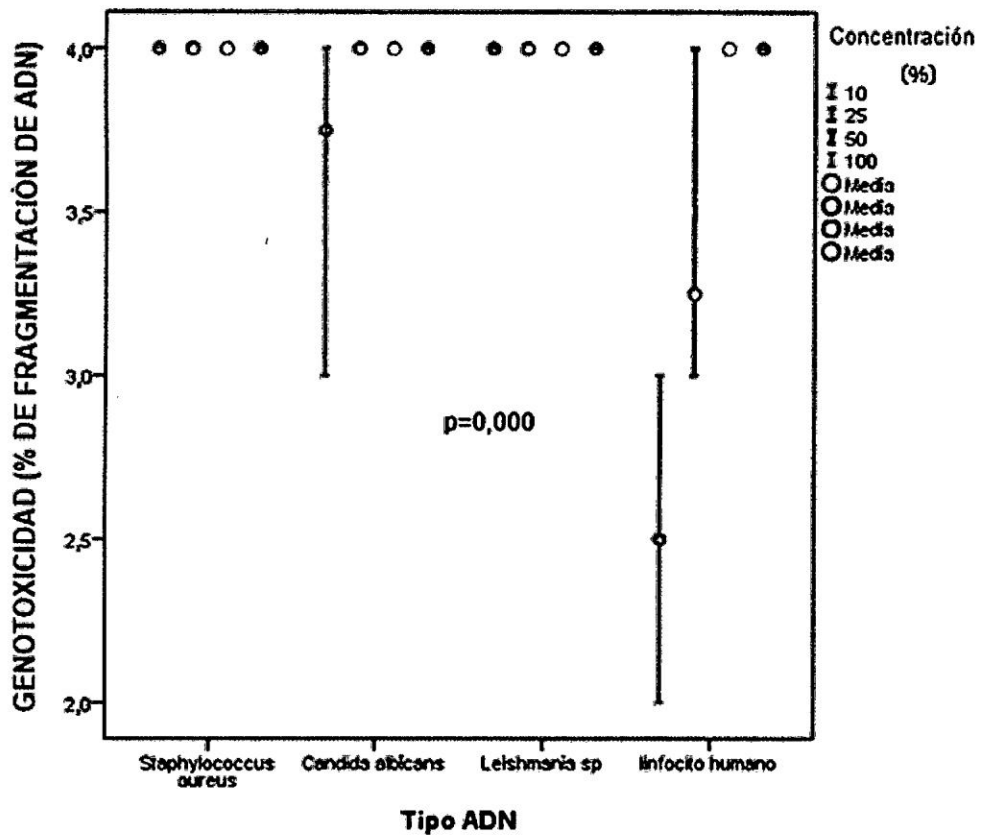


Figura 22. Comparación de la genotoxicidad del látex de *Ficus carica* L. "higo" a cuatro diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ATCC 40028, *Leishmania sp* M 2903 y linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

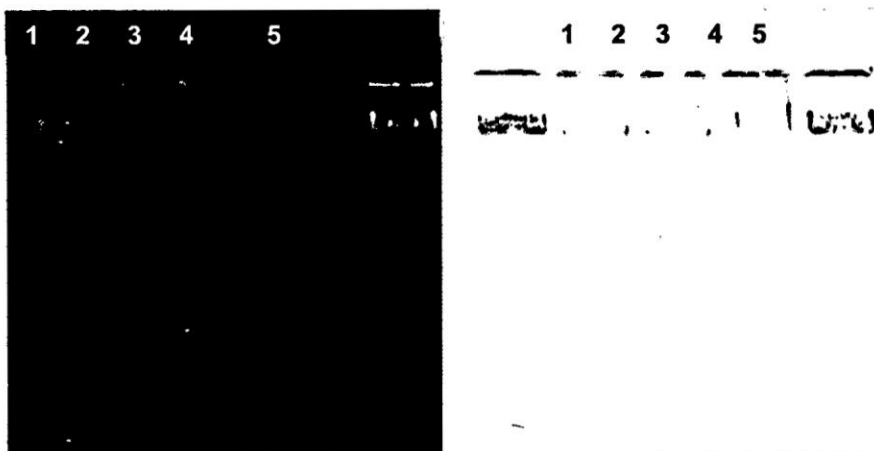


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de ligenotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a 1000 ng/ $\mu$ L, con durante una hora de incubación a 37°C.

**Leyenda:**

Carril 1: Con 5 mg/mL de extracto.

Carril 2: Con 10 mg/mL de extracto.

Carril 3: Con 50 mg/mL de extracto.

Carril 4: Con 100 mg/mL de extracto.

Carril 5: ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a 1000 ng/ $\mu$ L (control).

**Volumen de carga:**

Muestra (4  $\mu$ L) + colorante de carga (1  $\mu$ L) + agua bidestilada estéril (2  $\mu$ L) = 7  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

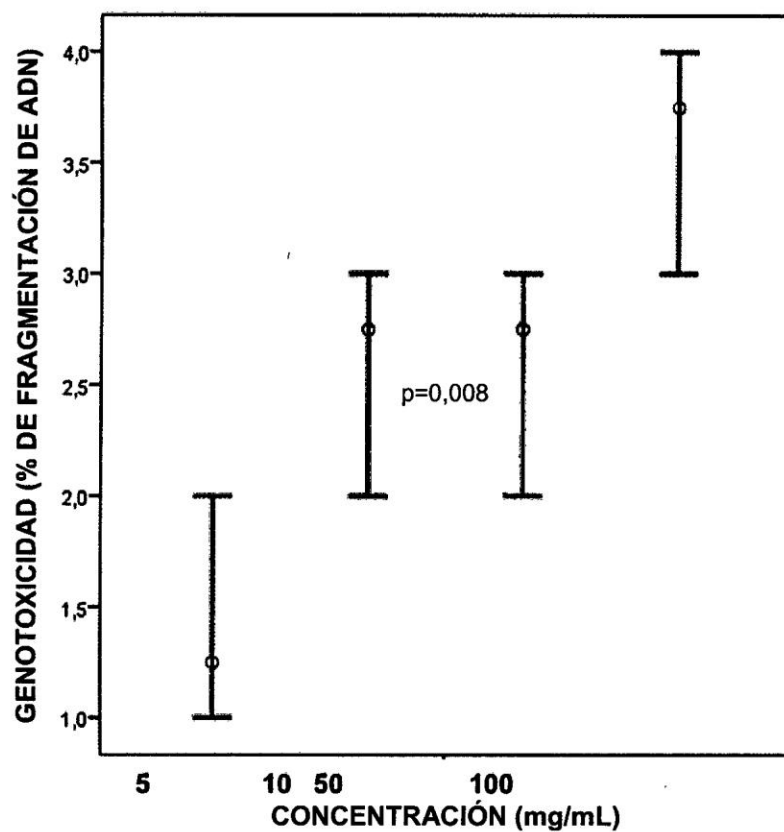


Figura 24. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

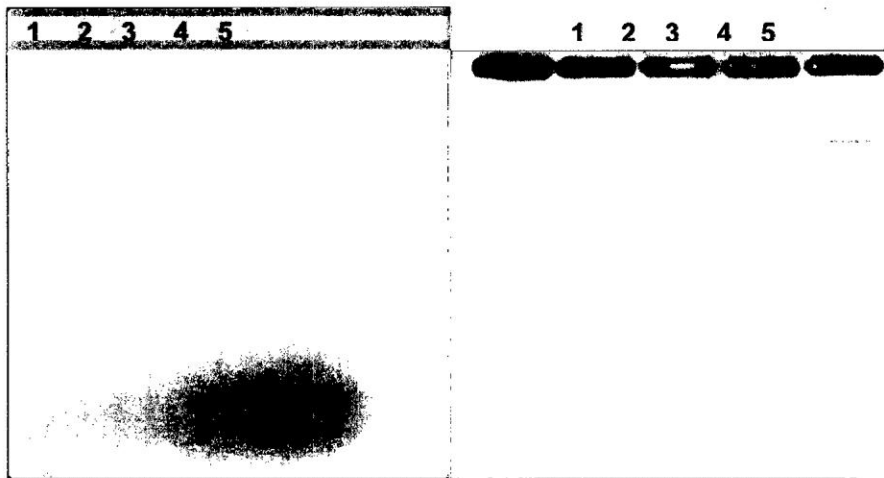


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de lagenotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de *Candida albicans* 1000 ng/ $\mu$ L, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

Leyenda:

Carril 1: Con 5 mg/mL de extracto.

Carril 2: Con 10 mg/mL de extracto.

Carril 3: Con 50 mg/mL de extracto.

Carril 4: Con 100 mg/mL de extracto.

Carril 5: ADN genómico de *Candida albicans* a 1000 ng/ $\mu$ L (control).

Volumen de carga:

Muestra (4  $\mu$ L) + colorante de carga (1  $\mu$ L) + agua bidestilada estéril (2  $\mu$ L)=7  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

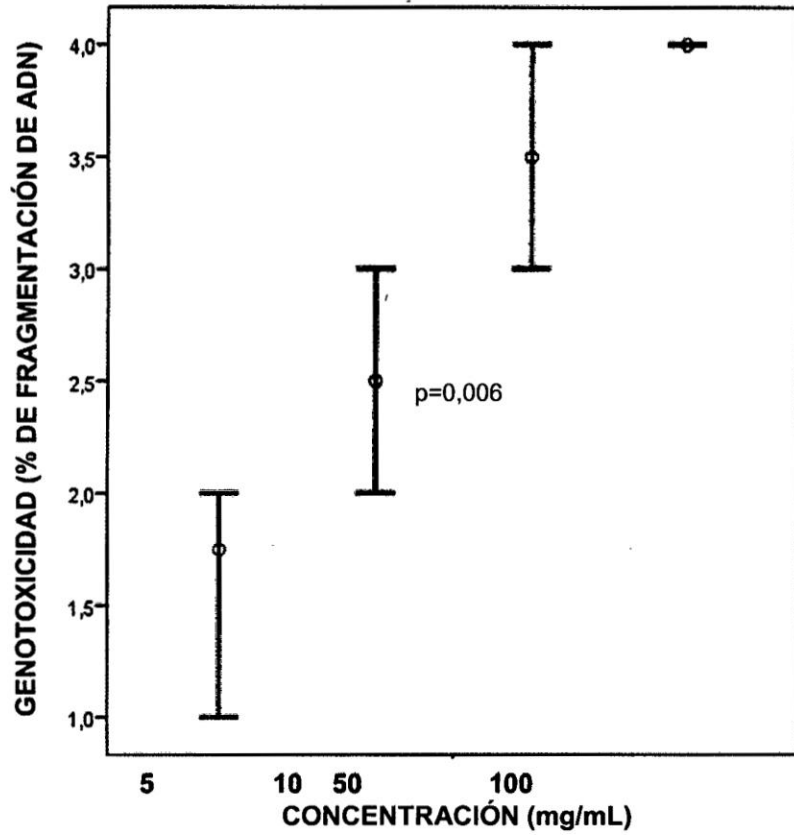


Figura 26. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Candida albicans* ATCC 40028, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

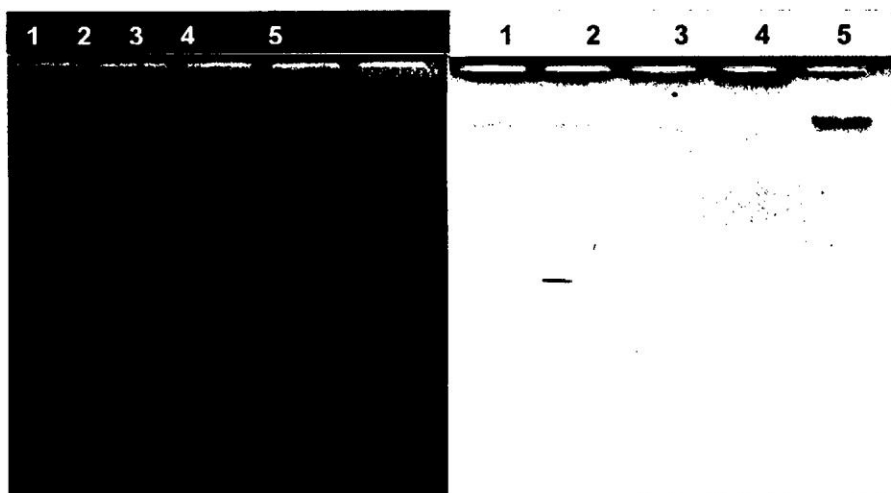


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de *Leishmania sp* M2903 a 1000 ng/ $\mu$ L, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

**Leyenda:**

Carril 1: Con 5 mg/mL de extracto.

Carril 2: Con 10 mg/mL de extracto.

Carril 3: Con 50 mg/mL de extracto.

Carril 4: Con 100 mg/mL de extracto.

Carril 5: ADN genómico de *Leishmania sp* M2903 a 1000 ng/ $\mu$ L (control).

**Volumen de carga:**

Muestra (4  $\mu$ L) + colorante de carga (1  $\mu$ L) + agua bidestilada estéril (2  $\mu$ L)=7  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

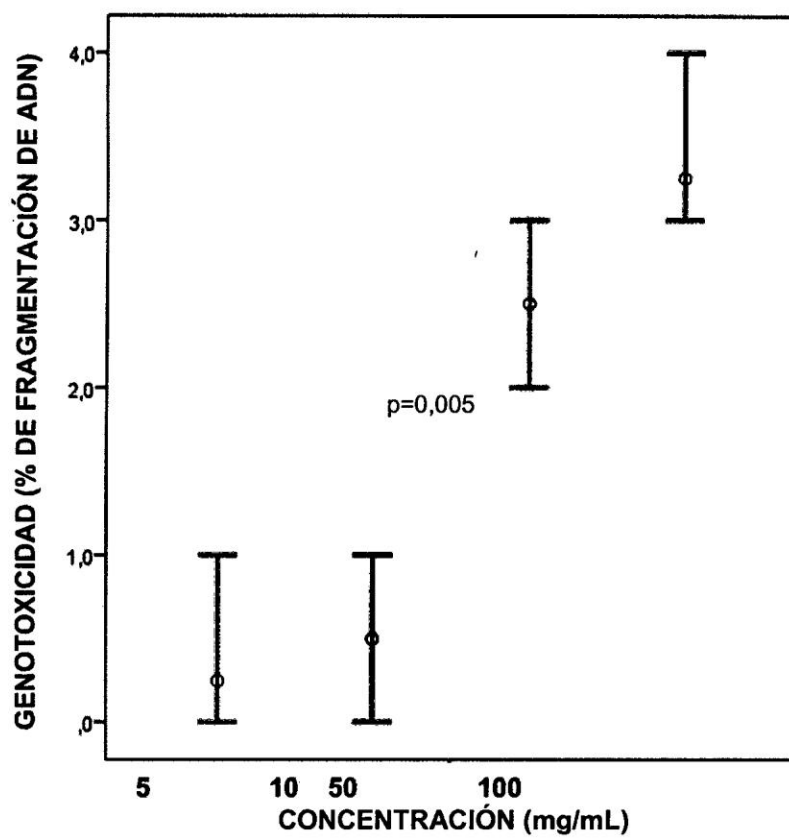


Figura 28. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Leishmania sp* M 2903, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

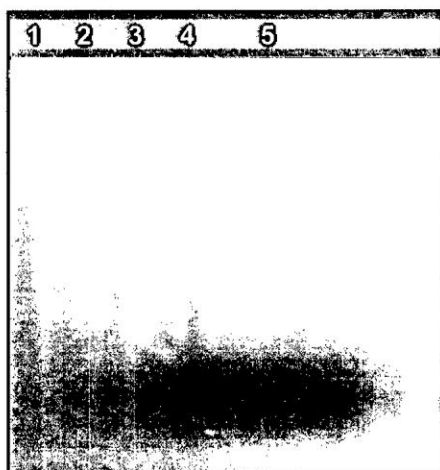


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de lagenotoxicidad del extractoalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de linfocito humano a 1000 ng/ $\mu$ L, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

Leyenda:

Carril 1: Con 5 mg/mL de extracto.

Carril 2: Con 10 mg/mL de extracto.

Carril 3: Con 50 mg/mL de extracto.

Carril 4: Con 100 mg/mL de extracto.

Carril 5: ADN genómico linfocito humano a 1000 ng/ $\mu$ L (control).

Volumen de carga:

Muestra (4  $\mu$ L) + colorante de carga (1  $\mu$ L) + agua bidestilada estéril (2  $\mu$ L)=7  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

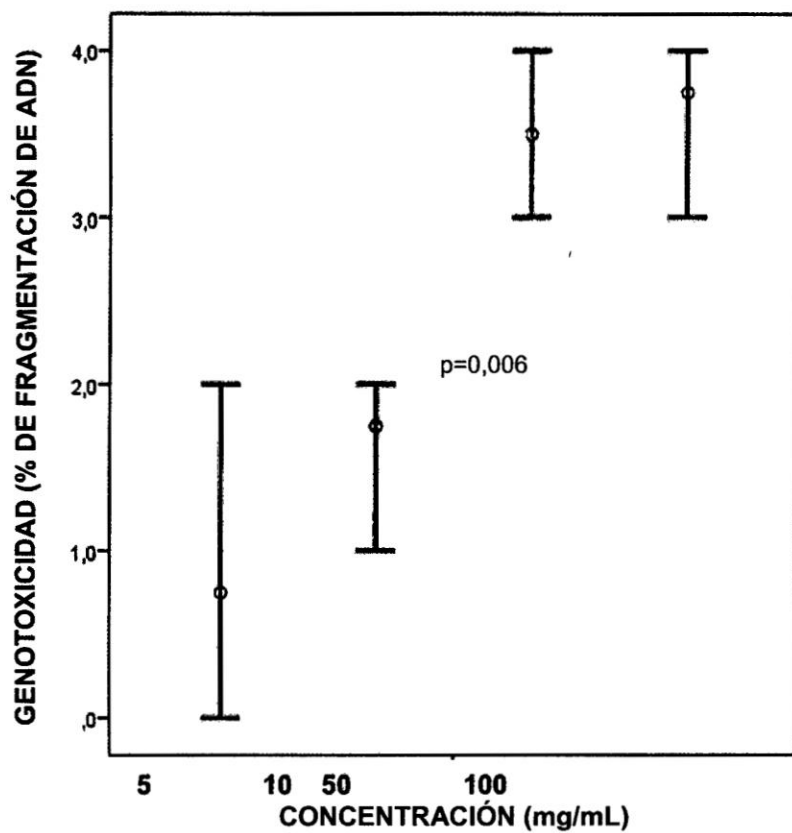


Figura 30. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

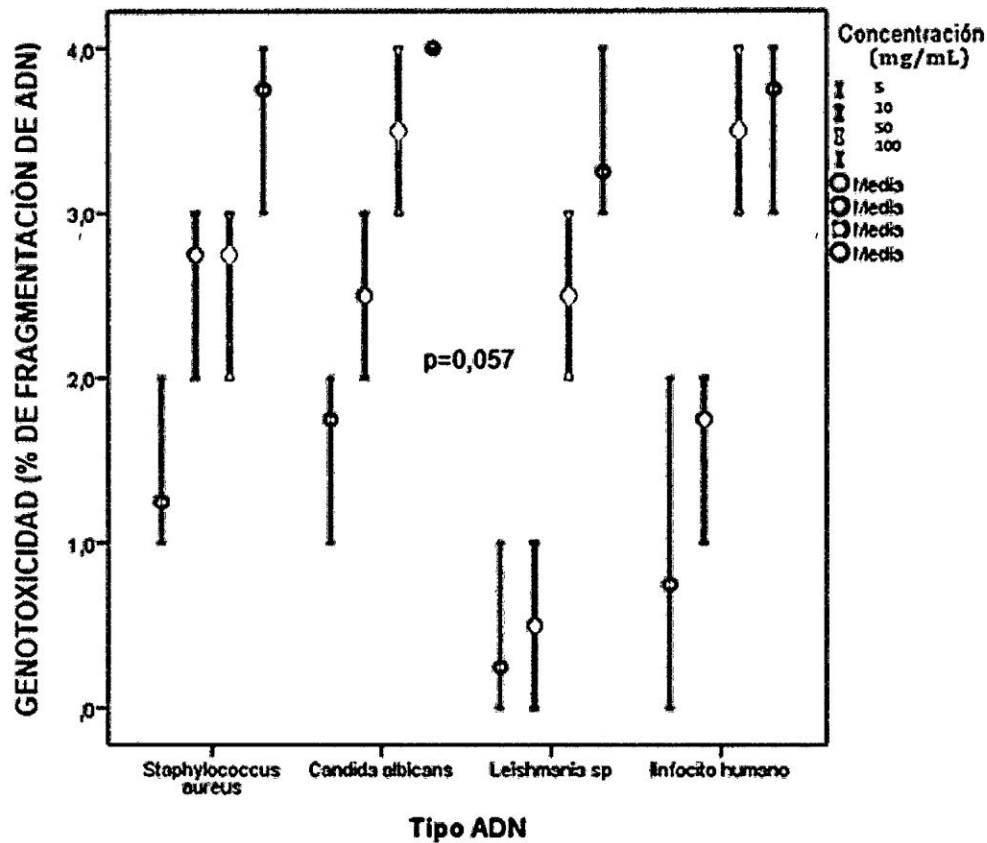


Figura 31. Comparación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a cuatro diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ATCC40028, *Leishmania* spM2903 y linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

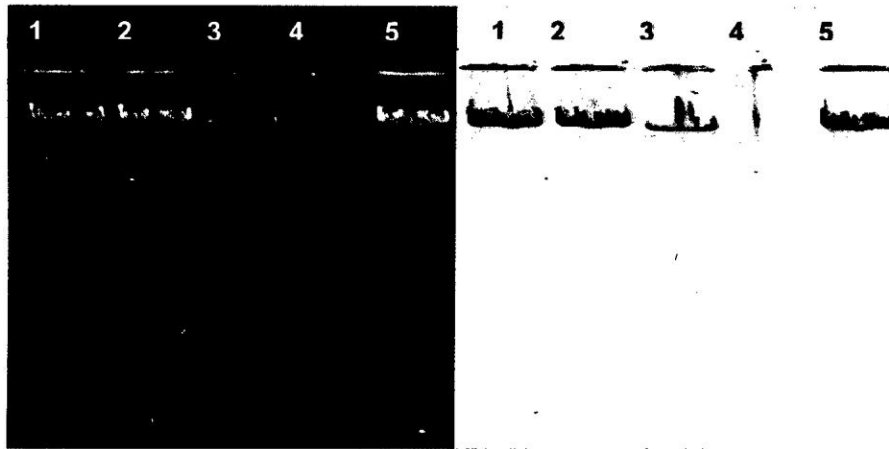


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a 1000 ng/ $\mu$ L, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

**Leyenda:**

Carril 1: Con 5 mg/mL de extracto.

Carril 2: Con 10 mg/mL de extracto.

Carril 3: Con 50 mg/mL de extracto.

Carril 4: Con 100 mg/mL de extracto.

Carril 10: ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a 1000 ng/ $\mu$ L (control).

Volumen de carga:

Muestra (4  $\mu$ L) + colorante de carga (1  $\mu$ L) + agua bidestilada estéril (2  $\mu$ L) = 7  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

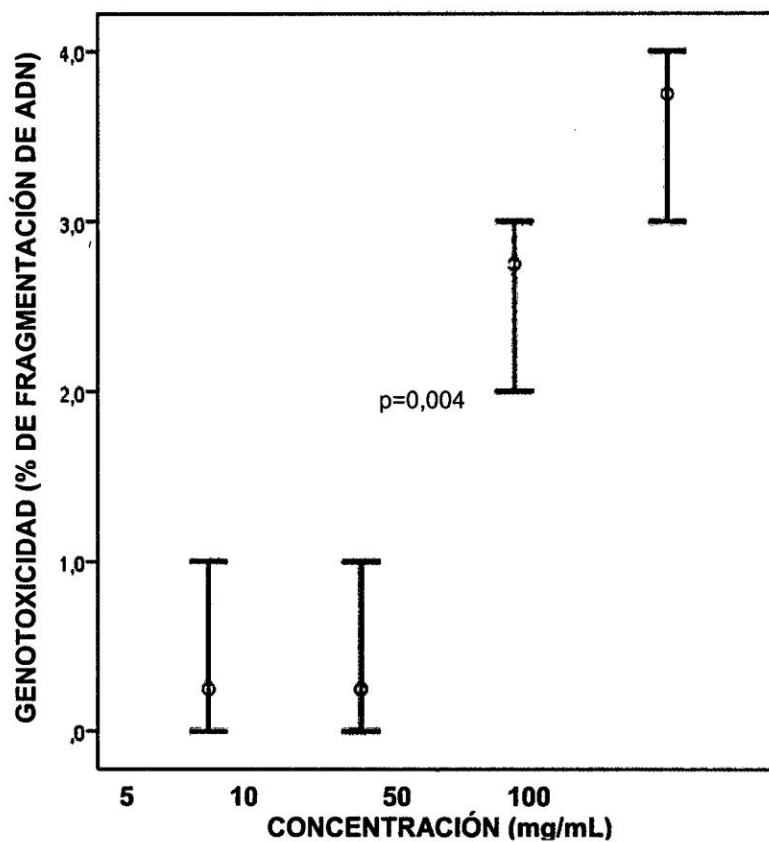


Figura 33. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

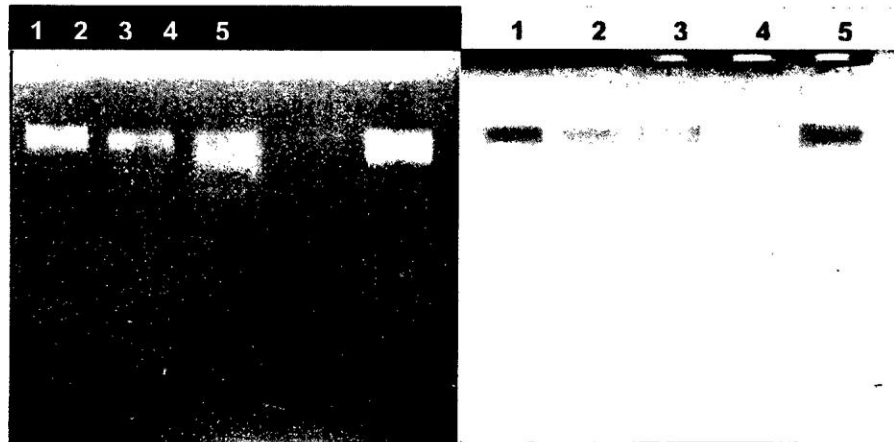


Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de *Candida albicans* ATCC 40028 a 1000 ng/ $\mu$ L, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

**Leyenda:**

Carril 1: Con 5 mg/mL de extracto.

Carril 2: Con 10 mg/mL de extracto.

Carril 3: Con 50 mg/mL de extracto.

Carril 4: Con 100 mg/mL de extracto.

Carril 5: ADN genómico de *Candida albicans* ATCC 40028 a 1000 ng/ $\mu$ L (control).

Volumen de carga:

Muestra (4  $\mu$ L) + colorante de carga (1  $\mu$ L) + agua bidestilada estéril (2  $\mu$ L)=7  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

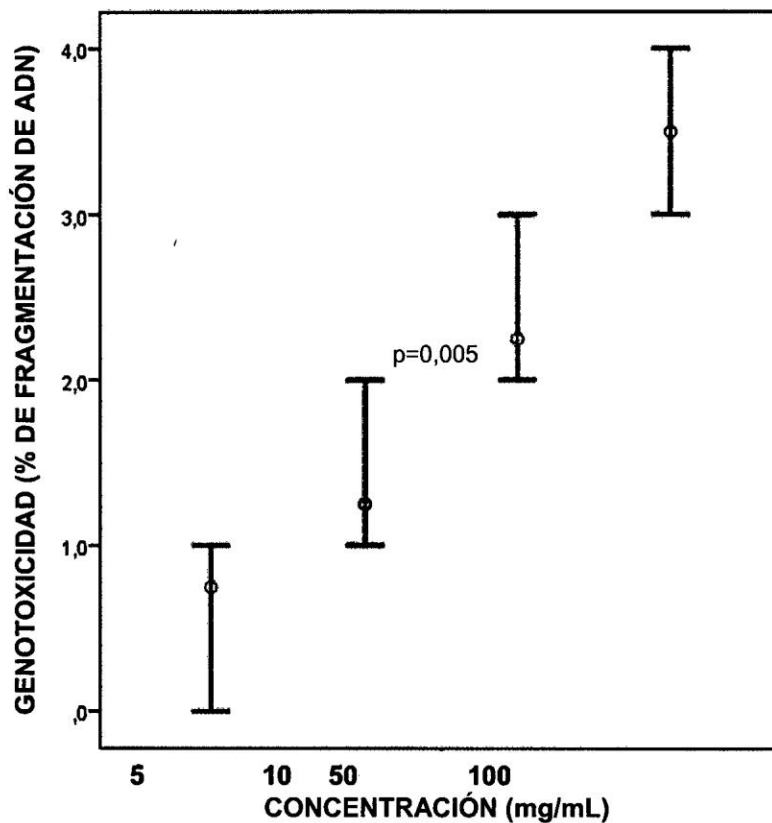


Figura 35. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Candida albicans* ATCC40028, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

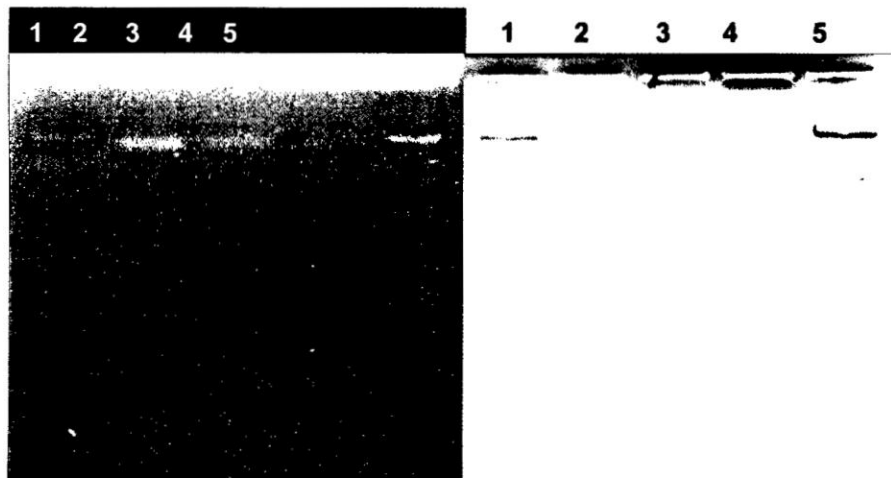


Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de *Leishmania sp* M2903 a 1000 ng/ $\mu$ L, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

Leyenda:

Carril 1: Con 5 mg/mL de extracto.

Carril 2: Con 10 mg/mL de extracto.

Carril 3: Con 50 mg/mL de extracto.

Carril 4: Con 100 mg/mL de extracto.

Carril 5: ADN genómico de *Leishmania sp* M2903 a 1000 ng/ $\mu$ L (control).

Volumen de carga:

Muestra (4  $\mu$ L) + colorante de carga (1  $\mu$ L) + agua bidestilada estéril (2  $\mu$ L)=7  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

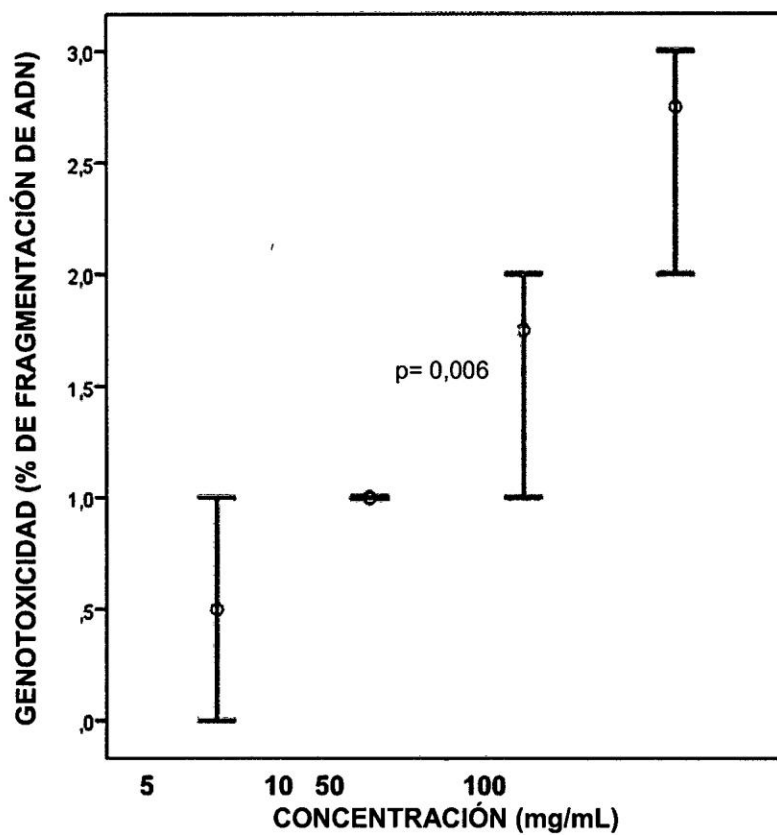


Figura 37. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Leishmania sp*M2903, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

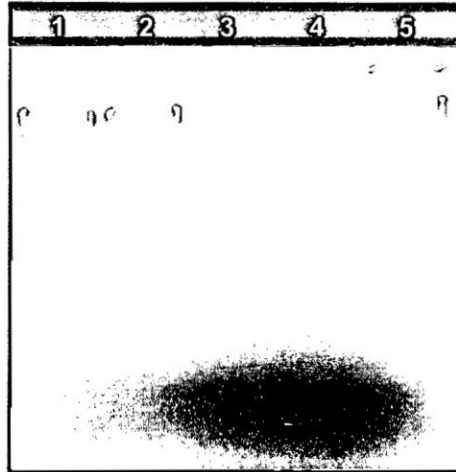


Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, producto de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL frente al ADN genómico de linfocito humano a 1000 ng/ $\mu$ L, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

**Leyenda:**

Carril 1: Con 5 mg/mL de extracto.

Carril 2: Con 10 mg/mL de extracto.

Carril 3: Con 50 mg/mL de extracto.

Carril 4: Con 100 mg/mL de extracto.

Carril 5: ADN genómico de linfocito humano a 1000 ng/ $\mu$ L (control).

Volumen de carga:

Muestra (4  $\mu$ L) + colorante de carga (1  $\mu$ L) + agua bidestilada estéril (2  $\mu$ L)=7  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

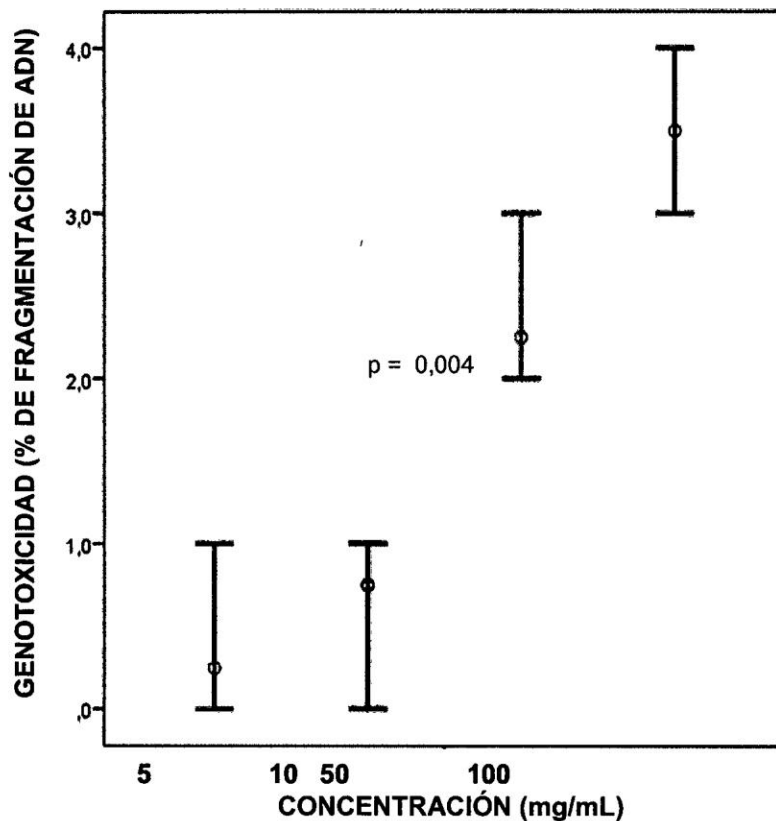


Figura 39. Genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a diferentes concentraciones frente al ADN genómico de linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

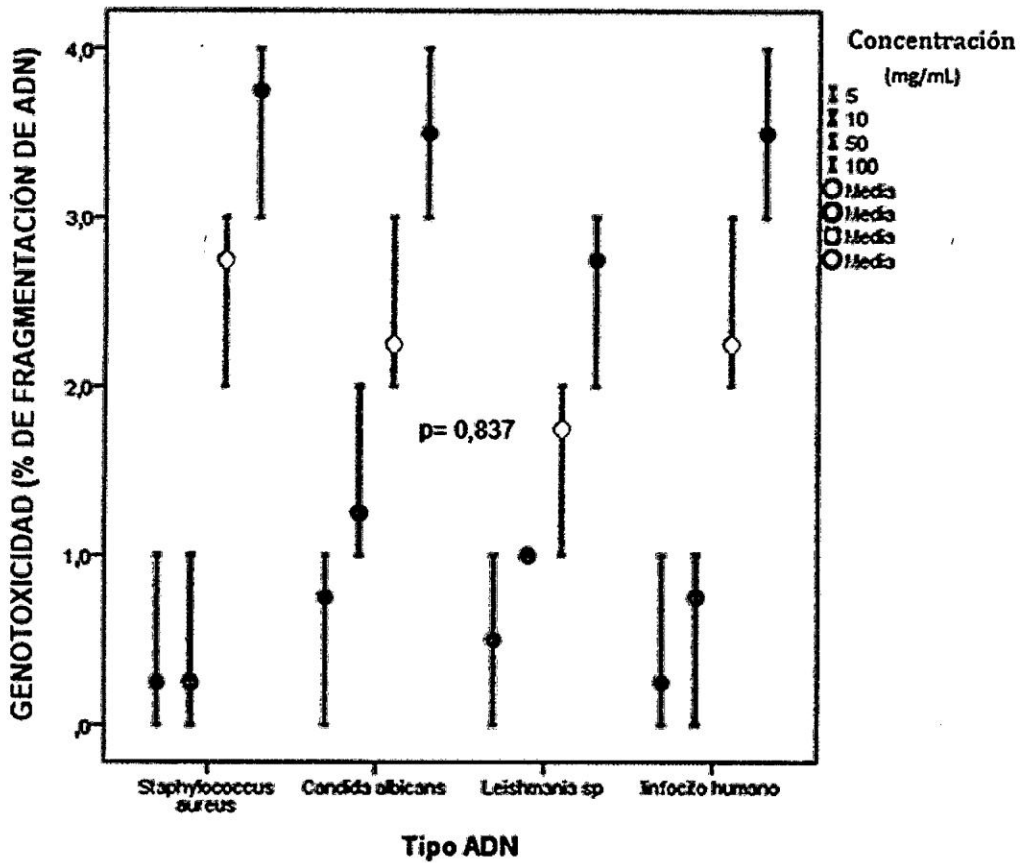


Figura 40. Comparación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a cuatro diferentes concentraciones frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ATCC40028, *Leishmania sp* M2903 y linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C. Ayacucho 2014.

## V. DISCUSIÓN

El tamizaje fitoquímico del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", se muestra en la tabla 5, con presencia de alcaloides y flavonoides en concentración abundante, fenoles y/o taninos y saponinas en concentraciones moderadas, lactonas y/o cumarinas en concentración leve; el resultado positivo para identificar alcaloides mediante la reacción de Mayer fue la presencia de un precipitado, con la reacción de Shinoda el cambio de color amarillo a rojo indica la presencia de flavonoides, los compuestos fenólicos fueron detectados por el intenso color verde, azul o negro que produjo cuando se le agregó el cloruro férrico al 1%, la formación de espuma indicó la presencia de saponinas, las lactonas y/o cumarinas se detectaron con la prueba de Baljetun precipitado de color naranja a rojo.<sup>68</sup> Estudios realizados por otros autores corroboran la presencia de algunos metabolitos encontrados.<sup>7,34,35</sup>

La tabla 6 muestra los metabolitos secundarios del látex de *Ficus carica* L. "higo", los alcaloides fueron encontrados en concentración abundante y los flavonoides así como las lactonas y/o cumarinas en concentraciones moderadas. Estos resultados coinciden con los estudios realizados por otros investigadores.<sup>7,8</sup>

La tabla 7 muestra los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara", se detectaron en abundancia: alcaloides, lactonas y/o cumarinas, fenoles y/o taninos, flavonoides y quinonas. Otros estudios realizados nos confirma la presencia de estos metabolitos.<sup>14,42</sup>

La tabla 8 muestra los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto", se encontraron en abundancia: alcaloides, flavonoides, fenoles y/o taninos y en concentraciones

moderadas se identificó quinonas, lactonas y/o cumarinas. Otros estudios nos afirman la presencia de estos metabolitos secundarios.<sup>14, 44, 45</sup>

La tabla 9, es referido a la cuantificación mediante espectrofotometría U.V. del ADN genómico extraído del *Staphylococcus aureus*, de seis cultivos bacterianas; para cuantificar ADN con A 260 y con A 280 las proteínas, las concentraciones de ADN obtenidos va desde 1 558,3 µg/mL hasta 2 446,2µg /mL, el nivel de pureza óptimo debe ser entre 1,8 a 2,0 y se observó que cuatro de ellas están dentro del rango con excepción de la tercera y sexta muestra, pero las concentraciones obtenidas son altas y el nivel de pureza es aceptable.<sup>66</sup>

La figura 1 es el registro fotográfico con cámara digital (colores) y con registrador de imágenes (blanco y negro), que nos muestra los niveles de concentración de ADN que se ha obtenido de los seis cultivos de *Staphylococcus aureus* utilizados para el presente estudio, fue corrido en gel de agarosa 1%, las concentraciones en los carriles 1, 2, 4,5 y 6 son muy similares, con una menor concentración en el carril 3, las características de estas bandas coinciden directamente con las concentraciones determinadas por el método de espectrofotometría U.V. Para hacer este corrido electroforético se realizó una dilución de 1 en 10 de la muestra de ADN obtenido de cada cultivo y esto nos permite ver las bandas bien definidas, aun así se ve que es bastante concentrado el contenido de ADN motivo por el que éstas quedan en los pocillos donde se ha sembrado.

La tabla 10, es referido a la cuantificación mediante espectrofotometría U.V. del ADN genómico de *Candida albicans* ATCC40028, se tuvo seis cultivos; para cuantificar ADN con A 260 y con A 280 proteínas, las concentraciones de ADN obtenidos va desde 1 122,8 µg/mL hasta 3 857,8µg /mL, el nivel de pureza debe ser entre 1,8 a 2,0 y se observa que los seis están dentro del rango, las concentraciones obtenidas son altas y el nivel de pureza es aceptable.<sup>66</sup>

La figura 2 es el registro fotográfico con cámara digital (colores) y con registrador de imágenes (blanco y negro), que nos muestra los niveles de concentración de ADN que se ha obtenido de los seis cultivos de *Candida albicans* ATCC40028, utilizados para el presente estudio, fue corrido en gel de agarosa 1%, las concentraciones en los carriles 1, 2, 3, 4, 5 y 6 son muy similares, las características de estas bandas coinciden directamente con las concentraciones determinadas por el método de espectrofotometría U.V. Para hacer este corrido electroforético se realizó una dilución de 1 en 10 de la muestra de ADN obtenido de cada cultivo y esto nos permite ver las bandas bien definidas.

La tabla 11, es referido a la cuantificación mediante espectrofotometría U.V. del ADN genómico extraído de *Leishmania sp* M2903, se tuvo seis cultivos; para cuantificar ADN con A 260 y con A 280 proteínas, las concentraciones de ADN obtenidos va desde 1 095,0 µg/mL hasta 2 272,3µg /mL, el nivel de pureza debe ser entre 1,8 a 2,0 y se observa que cuatro de ellas están dentro del rango con excepción de la tercera y cuarta muestra, las concentraciones obtenidas son altas y el nivel de pureza es aceptable.<sup>66</sup>

La figura 3 es el registro fotográfico con cámara digital (colores) y con registrador de imágenes (blanco y negro), que nos muestra los niveles de concentración de ADN que se ha obtenido de los seis cultivos de *Leishmania sp* M 2903 utilizados para el presente estudio, fue corrido en gel de agarosa 1%, las concentraciones en los carriles 1, 2, 5 y 6 son muy similares, con una menor concentración en el carril 3 y 4, las características de estas bandas coinciden directamente con las concentraciones determinadas por el método de espectrofotometría U.V. Para hacer el corrido electroforético se realizó una dilución de 1 en 10 de la muestra de ADN obtenido de cada cultivo y esto nos permite ver las bandas bien definidas.

La tabla 12, es referido a la cuantificación mediante espectrofotometría U.V. del ADN genómico de linfocitos humano, se tuvo seis bolsas colectoras de sangre; para cuantificar ADN, con A 260 y con A 280 proteínas, las concentraciones de ADN obtenidas va desde 1 389,6 µg/mL hasta 3 306,4 µg /mL, el nivel de pureza debe ser entre 1,8 a 2,0 y se observa que cuatro de ellas están dentro del rango con excepción de la primera y segunda muestra, las concentraciones obtenidas son altas y el nivel de pureza es aceptable.<sup>66</sup>

La figura 4 es el registro fotográfico con cámara digital (colores) y con registrador de imágenes (blanco y negro), que nos muestra los niveles de concentración de ADN que se ha obtenido de las seis bolsas colectoras de sangre del linfocito humano utilizados para el presente estudio, fue corrido en gel de agarosa 1%, las concentraciones en los carriles 3, 4, 5 y 6 son muy similares, con una menor concentración en el carril 1 y 2, las características de estas bandas coinciden directamente con las concentraciones determinadas por el método de espectrofotometría U.V. Para hacer el corrido electroforético se realizó una dilución de 1 en 10 de la muestra de ADN obtenido de cada cultivo y esto nos permite ver las bandas bien definidas, motivo por el que éstas quedan en los pocillos donde se ha sembrado.

Los registros fotográficos de la figura 5, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a concentración inicial de 1000 ng/μL, por efecto del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, que fueron realizados con una hora de incubación a 37°C; el carril 1 (10%) muestra el producto de la genotoxicidad entre 20 a 40%, el carril 2(25%) aumentala fragmentación del ADN entre 40 a 95% y los carriles 3 y 4(50% y 100%) alcanzan una fragmentación mayor a 95%; el carril 5 es el ADN control a 1000 ng/μL.

La figura 6 muestra la gráfica de genotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a diferentes concentraciones sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, durante una hora de incubación a 37°C; que resulta ( $p=0,011$ ), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 17)

Los registros fotográficos de la figura 7, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de *Candida albicans* ATCC 40028 a concentración inicial de 1000 ng/μL, por efecto del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, que fueron realizados con una hora de incubación a 37°C; los carriles 1 y 2 (10% y 25%) muestran el producto de la genotoxicidad entre 40 a 95%, los carriles 3 y 4 (50% y 100%) alcanzan una fragmentación mayor a 95%,el carril 5 es el ADN control a 1000 ng/μL.

La figura 8 muestra la gráfica de genotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a diferentes concentraciones sobre el ADN genómico de *Candida albicans* ATCC 40028, durante una hora de incubación a 37°C, que resulta ( $p=0,058$ ), por tanto las concentraciones no influyen en el efecto genotóxico. (Anexo 17)

Los registros fotográficos de la figura 9, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de *Leishmania* sp M2903 a concentración inicial de 1000 ng/μL, por efecto del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, que fueron realizados con una hora de incubación a 37°C;el carril 1 (10%) muestra el producto de la genotoxicidad entre 20 a 40%, el carril 2 (25%) aumenta el producto de la genotoxicidad entre

40 a 95% y los carriles 3 y 4 (50% y 100%) alcanzan una fragmentación mayor a 95%; el carril 5 es el ADN control a 1000 ng/μL.

La figura 10 muestra la gráfica de genotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a diferentes concentraciones sobre el ADN genómico de *Leishmania sp* M2903, durante una hora de incubación a 37°C, que resulta ( $p=0,007$ ), por tanto las concentraciones si influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 17)

Los registros fotográficos de la figura 11, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de linfocito humano a concentración inicial de 1000 ng/μL, por efecto del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10%, que fueron realizados con una hora de incubación a 37°C; el carril 4 (10%) muestra el producto de la genotoxicidad entre 20 a 40%, el carril 3 (25%) aumenta la fragmentación entre 40 a 95% y los carriles 1 y 2 (50% y 100%) alcanzan una fragmentación mayor a 95%; el carril 5 es el ADN control a 1000 ng/μL.

La figura 12 muestra la gráfica de genotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a diferentes concentraciones sobre el ADN genómico de linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C; que resulta ( $p=0,007$ ), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 17).

Al analizar de manera general en la figura 13, la gráfica nos muestra la comparación de la genotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" frente a los ADN de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania sp* y linfocito humano; resultando ( $p=0,662$ ), por tanto la genotoxicidad del látex no diferencia el tipo de ADN según el organismo, afecta de forma similar a todos ellos. (Anexo 18)

Un estudio realizado evaluó el efecto citostático del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" en el meristemo radicular de *Allium cepa* L. "cebolla"; determinando mediante el método de la variación del índice mitótico con lectura entre 1000 a 3 500 células por muestra, que según la prueba de Tukey la especie que tiene mayor efecto citostático fue la *Euphorbia peplus* L. (IM=0,32%). El tiempo de tratamiento de mayor antimicótica fue a las 8 h con látex al 3% de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", seguido del látex de *Ficus carica* "higo" a las 24 h.<sup>8</sup>

Estudios realizados evaluaron la actividad biocida, citotóxica y genotóxica de tres extractos de plantas medicinales de la familia *Euphorbiaceae*, a los extractos que mostraron actividad a una concentración de 1 mg/mL le determinaron la concentración inhibitoria mínima (CIM). El único extracto que presentó actividad inhibitoria *in vitro* significativa contra bacterias y hongos fue *Euphorbia lancifolia* con una CIM de 1 mg/mL contra *Bacillus subtilis* y *Trichophyton mentagrophytes* ( $p=0,0312$ ).<sup>9</sup>

Se reportan estudios realizados, de las plantas medicinales de otras familias, ya que no se encontró estudios de la familia de *Euphorbiaceae*, ello nos refiere que la actividad genotóxica se le atribuye a los flavonoides y a los derivados terpénicos.<sup>70</sup>

Los registros fotográficos de la figura 14, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a concentración inicial de 1000 ng/ $\mu$ L, por efecto del látex de *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, que fueron realizados con una hora de incubación a 37°C; los carriles 1,2,3,4 (10%, 25%, 50% y 100%) alcanzan una fragmentación mayor al 95%, el carril 5 es el ADN control a 1000 ng/ $\mu$ L.

La figura 15 muestra la gráfica de genotoxicidad del látex de *Ficus carica* L. "higo" a diferentes concentraciones sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, durante una hora de incubación a 37°C; que resulta ( $p=0,100$ ), por tanto las concentraciones no influyen en el efecto genotóxico. (Anexo 20)

Los registros fotográficos de la figura 16, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de *Candida albicans* ATCC40028 a concentración inicial de 1000 ng/ $\mu$ L, por efecto del látex de *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, que fueron realizados con una hora de incubación a 37°C; el carril 1(10 mg/mL) muestra el producto de la genotoxicidad entre 40 al 95% y los carriles 2, 3 y 4 (25 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL) alcanzan una fragmentación mayor a 95%, el carril 5 es el ADN control a 1000 ng/ $\mu$ L.

La figura 17 muestra la gráfica de genotoxicidad del látex del fruto de *Ficus carica* L. "higo" diferentes concentraciones sobre el ADN genómico de *Candida albicans* ATCC40028, durante una hora de incubación a 37°C; que resulta

( $p=0,068$ ), por tanto las concentraciones no influyen en el efecto genotóxico. (Anexo 20)

Los registros fotográficos de la figura 18, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de *Leishmania sp* M2903a concentración inicial de 1000 ng/ $\mu$ L, por efecto de látex del fruto de *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, que fueron realizados con una hora de incubación a 37°C; los carriles 1, 2, 3 y 4 (10%, 25%, 50% y 100%) alcanzan el producto de la genotoxicidad mayor a 95%, el carril 5 es el ADN control a 1000 ng/ $\mu$ L.

La figura 19 muestra la gráfica de genotoxicidad del látex del fruto de *Ficus carica* L. "higo" a diferentes concentraciones sobre el ADN genómico de *Leishmania sp* M 2903, durante una hora de incubación a 37°C; que resulta ( $p=0,100$ ), por tanto las concentraciones no influyen en el efecto genotóxico. (Anexo 20)

Los registros fotográficos de la figura 20, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de linfocito humano a concentración inicial de 1000 ng/ $\mu$ L, por efecto de látex de *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, que fueron realizados con una hora de incubación a 37°C; el carril 1 (25%) muestra el producto de la genotoxicidad entre 40 al 95%, el carril 2 (10%) aumenta la fragmentación entre 20 a 40% y los carriles 3 y 4 (50% y 100%) alcanzan una fragmentación mayor a 95%, el carril 5 es el ADN control a 1000 ng/ $\mu$ L.

La figura 21 muestra la gráfica de genotoxicidad del látex de *Ficus carica* L. "higo" a diferentes concentraciones sobre el ADN genómico de linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C, que resulta ( $p=0,003$ ), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 20)

Al analizar de manera general en la figura 22, la gráfica nos muestra la comparación de la genotoxicidad del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" sobre los ADN de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania sp* y linfocito humano; resultando ( $p=0,000$ ), por tanto la genotoxicidad del látex si diferencia el tipo de ADN según el organismo, presentando diferentes comportamientos. (Anexo 21)

En un estudio se demostró el efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antivirales *Ficus carica* L. “higo” y *Euphorbia peplus* L. “leche leche” sobre el ADN genómico de linfocitos humano, donde el tiempo de incubación a una y cuatro horas, no influye en el efecto; mientras que las concentraciones de los extractos, sí influyen en el efecto genotóxico.<sup>7</sup>

En un estudio realizado el estudio clínico de la actividad antifúngica del gel con tocte, higo, dulcamara y salvia en niños de la comunidad Sanjapamba con *Malassezia furfur* (hongo), comprobándose que en la aplicación del control positivo con neo-nystasolona (crema antimicótica), con aplicación cada 24 horas reduce en un (95,15%) de igual forma con el gel da 96,87% de efecto sobre *Malassezia furfur* a los 15 días de tratamiento.<sup>11</sup>

Habiéndose descrito pocos casos de hipersensibilidad tras su ingesta de *Ficus carica* “higo”, se estudiaron 347 pacientes consecutivos remitidos a una consulta de alergia de un hospital general. Se prepararon extractos de hojas y de tallos de *Ficus benjamina* que se utilizaron para las pruebas cutáneas, IgE específica (enzimoinmunoanálisis) y SDS-PAGE *immunoblotting*. Se determinó también la IgE específica mediante Pharmacia CAP System. En los pacientes sensibles a *Ficus benjamina* se practicaron, además, pruebas cutáneas frente a higo, kiwi, bromelina, papáina, látex y polen de morera. Dando como resultado ciento un pacientes (29 %) referían exposición a *Ficus benjamina* o a otras especies de *Ficus*. Veintidós pacientes (6,3 %) estaban sensibilizados a *Ficus benjamina* pero si lo cuatro tenían sintomatología relacionada con su cercanía. La Ig E específica fue positiva en 4 de 10 pacientes (enzimoinmunoanálisis) y en 2 de 19 (CAP-System). El SDS-PAGE *immunoblotting* mostro la presencia de proteínas fijadoras de Ig E con masas moleculares entre 8 y 42 kDa. De los 22 pacientes sensibles a *Ficus benjamina*, ocho estaban sensibilizados a higo (tres con síntomas asociados), siete a kiwi (tres con síntomas) y dos a látex (uno con síntomas).<sup>64</sup>

Los registros fotográficos de la figura 23, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a concentración inicial de 1000 ng/μL, por efecto del extracto hidroalcohólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, que fueron realizados con una hora de incubación a 37°C; el carril 1 (5 mg/mL) muestra el producto de la genotoxicidad

entre 5 al 20%, los carriles 2 y 3 (10 mg/mL y 50 mg/mL) aumentan la fragmentación del ADN a una escala entre 20 al 40% y el carril 4 (100 mg/mL) alcanza una fragmentación entre 40 al 95%, el carril 5 es el ADN control a 1000 ng/ $\mu$ L con el que se empezó a trabajar.

La figura 24 muestra la gráfica de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a diferentes concentraciones sobre ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, durante una hora de incubación a 37°C; que resulta ( $p=0,008$ ), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 23)

Los registros fotográficos de la figura 25, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de *Candida albicans* ATCC40028 a concentración inicial de 1000 ng/ $\mu$ L, por efecto del extracto hidroalcohólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, que fueron realizados con una hora de incubación a 37°C; el carril 1(5 mg/mL) muestra el producto de la genotoxicidad entre 5 a 20%, el carril 2 (10 mg/mL) aumenta la fragmentación entre 20 a 40%, el carril 3 (50 mg/mL) aumenta la fragmentación entre 40 a 95% y el carril 4 (100 mg/mL) alcanza una fragmentación mayor a 95%, el carril 5 es el ADN control a 1000 ng/ $\mu$ L.

La figura 26 muestra la gráfica de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a diferentes concentraciones sobre ADN genómico de *Candida albicans* ATCC40028, durante una hora de incubación a 37°C; que resulta ( $p=0,006$ ), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 23)

Los registros fotográficos de la figura 27, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de *Leishmania sp* M2903 a concentración inicial de 1000 ng/ $\mu$ L, por efecto del extracto hidroalcohólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, que fueron realizados con una hora de incubación a 37°C; los carriles 1 y 2 (5 mg/mL y 10 mg/mL) muestran el producto de la genotoxicidad menor a 5%, el carril 3 (50 mg/mL) aumenta la fragmentación entre 20 a 40% y el carril 4 (100 mg/mL) alcanza una fragmentación entre 40 a 95%, el carril 5 es el ADN control a 1000 ng/ $\mu$ L.

La figura 28 muestra la gráfica de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a diferentes concentraciones sobre ADN genómico *Leishmania sp* M2903, durante una hora de incubación a 37°C; que resulta ( $p=0,005$ ), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 23)

Los registros fotográficos de la figura 29, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de linfocito humano a concentración inicial de 1000 ng/ $\mu$ L, por efecto del extracto hidroalcohólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, que fueron realizados con una hora de incubación a 37°C; el carril 1 (5 mg/mL) muestra el producto de la genotoxicidad menor a 5%, el carril 2 (10 mg/mL) aumenta la fragmentación entre 5 a 20% y los carriles 3 y 4 (50 mg/mL y 100 mg/mL) alcanza una fragmentación entre 40 a 95%, el carril 5 es el ADN control a 1000 ng/ $\mu$ L.

La figura 30 muestra la gráfica de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" a diferentes concentraciones sobre el ADN genómico de linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C, que resulta ( $p=0,006$ ), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 23)

Al analizar de manera general en la figura 31, la gráfica nos muestra la comparación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" frente a los ADN de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania sp* y linfocito humano; resultando ( $p=0,057$ ), por tanto la genotoxicidad del extracto no diferencia el tipo de ADN según el organismo, afecta de forma similar a todos ellos. (Anexo 24)

En un estudio se demostró el efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antibacterianas *Spartium junceum* L. "retama", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" sobre ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, donde el tiempo de incubación a una y cuatro horas, no influye en el efecto; mientras que las concentraciones de los extractos, sí influyen en el efecto genotóxico.<sup>14</sup>

Estudios revelan que efectivamente *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" muestra actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*.<sup>15, 17,19</sup> Indican

que la presencia de taninos, flavonoides, alcaloides y péptidos son los responsables de la acción antimicrobiana de la tara.<sup>8</sup>

Un estudio realizado demostró que un extracto hexánico a base de *Caesalpinia spinosa*, fue ensayado para comprobar su actividad antifúngica como una alternativa del control de la enfermedad de fusariosis en diversos cultivos así como las manchas de Phoma en las hojas de las plantaciones de café. Los autores consideran que podría ser una alternativa ya que los extractos inhibieron el crecimiento micelial en el rango de 3,95% a 32,20% para el Phoma tarda y de 7,29% a 33,83% para el *Fusarium solani*.<sup>20</sup>

Un estudio nos afirma el efecto genotóxico del extracto acuoso de las vainas de *Caesalpinia spinosa* "tara" en células del meristemo radicular de *Allium cepa* "cebolla", la genotoxicidad se evidenció mediante la observación de anomalías en el núcleo y se concluye que la genotoxicidad del extracto es mayor a concentraciones de 0,1% y 1%.<sup>24</sup>

Los registros fotográficos de la figura 32, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a concentración inicial de 1000 ng/μL, por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, que fueron realizados con una hora de incubación a 37°C; los carriles 1 y 2 (5 mg/mL y 10 mg/mL) muestra el producto de la genotoxicidad menor a 5%, en el carril 3 (50 mg/mL) aumenta la fragmentación del ADN a una escala entre 20 a 40% y el carril 4 (100 mg/mL) alcanza una fragmentación entre 40 a 95%, el carril 5 es el ADN control a 1000 ng/μL.

La figura 33 muestra la gráfica de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a diferentes concentraciones sobre ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, durante una hora de incubación a 37°C; que resulta ( $p=0,004$ ), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 26)

Los registros fotográficos de la figura 34, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de *Candida albicans* ATCC40028 a concentración inicial de 1000 ng/μL, por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, que fueron realizados con una hora de

incubación a 37°C; el carril 1 (5 mg/mL) muestra el producto de la genotoxicidad menor al 5%, el carril 2 (10 mg/mL) aumenta la fragmentación entre 5 a 20%, el carril 3 (50 mg/mL) aumenta la fragmentación en una escala entre 20 a 40% y el carril 4 (100 mg/mL) alcanza una fragmentación entre 40 a 95%, el carril 5 es el ADN control a 1000 ng/μL.

La figura 35 muestra la gráfica de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a diferentes concentraciones sobre ADN genómico de *Candida albicans* ATCC40028, durante una hora de incubación a 37°C; que resulta ( $p=0,005$ ), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 26)

Los registros fotográficos de la figura 36, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de *Leishmania sp* M2903 a concentración inicial de 1000 ng/μL, por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, que fueron realizados con una hora de incubación a 37°C; el carril 1 (5 mg/mL) muestra el producto de la genotoxicidad menor a 5%, los carriles 2 y 3 (10 mg/mL y 50 mg/mL) aumenta la fragmentación una escala entre 5 a 20% y el carril 4 (100 mg/mL) alcanza una fragmentación entre 40 a 95%, el carril 5 es el ADN control a 1000 ng/μL.

La figura 37 muestra la gráfica de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a diferentes concentraciones sobre ADN genómico de *Leishmania sp* M 2903, durante una hora de incubación a 37°C; que resulta ( $p=0,006$ ), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 26)

Los registros fotográficos de la figura 38, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN genómico de linfocito humano a concentración inicial de 1000 ng/μL, por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, que fueron realizados con una hora de incubación a 37°C; los carriles 1 y 2 (5 mg/mL y 10 mg/mL) muestra el producto de la genotoxicidad menor a 5%, el carril 3 (50 mg/mL) aumenta la fragmentación entre 20 a 40% y el carril 4 (100 mg/mL) alcanza una fragmentación entre 40 a 95%, el carril 5 es el ADN control a 1000 ng/μL.

La figura 39 muestra la gráfica de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" a diferentes concentraciones sobre ADN genómico de linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C; que resulta ( $p=0,004$ ), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 26)

Al analizar de manera general en la figura 40, la gráfica nos muestra la comparación de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" sobre ADN de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania sp* y linfocito humano, durante una hora de incubación a 37°C; resultando ( $p=0,837$ ), por tanto la genotoxicidad del extracto no diferencia el tipo de ADN según el organismo, afecta de forma similar a todos ellos. (Anexo 27)

*Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" presenta actividad antibacteriana de acuerdo a los estudios realizados al igual que la planta anterior.<sup>23</sup> La genotoxicidad se le puede atribuir a la presencia de flavonoides, taninos como se ha reportado en un estudio, encontrándose que existe una correlación positiva entre la ocurrencia de enfermedades y tumores en la población.<sup>30</sup>

Existen estudios que nos evidencia la genotoxicidad de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto", evaluó la genotoxicidad del aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, usando un ensayo de segregación somática y una cepa diploide de los hongos *Aspergillus nidulans*, la genotoxicidad del aceite se asoció con la inducción de sobrecruzamiento mitótico.<sup>25</sup> Así mismo se realizó de otras especies por el mismo tipo de ensayo, encontrándose daño genotóxico.<sup>29</sup>

Estos estudios realizados nos permite corroborar la genotoxicidad hallada en el presente trabajo de investigación, los cuales se realizaron con diferentes ensayos: ensayo cometa, prueba de *Allium cepa*, *Aspergillus nidulans*.<sup>24, 25, 27,</sup>

Observando los registros fotográficos de la genotoxicidad de las plantas medicinales en estudio sobre los cuatro tipos de ADN, se encontró que el látex de "leche leche" es genotóxico sobre los ADN en el siguiente orden: *Candida albicans* seguido de *Staphylococcus aureus*, linfocito humano y *Leishmania sp*; el látex de "higo" es muy genotóxico sobre el ADN de *Staphylococcus aureus* y *Leishmania sp* seguido de *Candida albicans* y linfocito humano, el extracto de "tara" es genotóxico sobre los ADN en el siguiente orden: *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, seguido de *Leishmania sp* y linfocito humano y el extracto de "eucalipto" es genotóxico sobre los ADN en el siguiente orden:

*Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* seguido de *Leishmania sp* y linfocito humano. Finalmente comparando el grado de genotoxicidad entre las plantas medicinales en estudio, se encontró que el látex de "higo" es muy genotóxico, el látex de "leche leche" presenta una genotoxicidad moderada y los extractos hidroalcohólicos de "tara" y "eucalipto" presentan menor genotoxicidad en comparación de las otras plantas.

## VI. CONCLUSIONES

1. Existe diferencias en la genotoxicidad *in vitro* de las plantas medicinales frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania sp* y linfocito humano: El látex de *ficus carica* L. "higo" si muestra diferencia estadística al tipo de ADN según el organismo ( $p=0,000$ ); mientras que el látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto" no muestran diferencias estadísticas al tipo de ADN según el organismo ( $p=0,662$ ), ( $p=0,057$ ) y ( $p=0,837$ ) respectivamente.
2. Los metabolitos secundarios presentes en la "leche leche", "higo", "tara" y "eucalipto" son: alcaloides, flavonoides, lactonas y/o cumarinas, fenoles y/o taninos, saponinas y quinonas.
3. Las concentraciones del látex de "leche leche" influyen estadísticamente en el efecto genotóxico sobre ADN genómico de *Staphylococcus aureus* ( $p=0,011$ ), *Leishmania sp* ( $p=0,007$ ) y linfocito humano ( $p=0,007$ ), pero no influye estadísticamente sobre ADN genómico de *Candida albicans* ( $p=0,058$ ). Las concentraciones del látex de "higo" influyen estadísticamente en el efecto genotóxico sobre ADN genómico del linfocito humano ( $p=0,003$ ), pero no influyen estadísticamente sobre ADN genómico de *Staphylococcus aureus* ( $p=0,100$ ), *Candida albicans* ( $p=0,068$ ) y *Leishmania sp* ( $p=0,100$ ). Las concentraciones del extracto hidroalcohólico de "tara" influyen estadísticamente en el efecto genotóxico sobre ADN genómico de *Staphylococcus aureus* ( $p=0,008$ ), *Candida albicans* ( $p=0,006$ ), *Leishmania sp* ( $p=0,005$ ) y linfocito humano ( $p=0,006$ ) y las concentraciones del extracto hidroalcohólico de "eucalipto" influyen estadísticamente en el efecto genotóxico sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus* ( $p=0,004$ ), *Candida albicans* ( $p=0,005$ ), *Leishmania sp* ( $p=0,006$ ) y linfocito humano ( $p=0,004$ ).

## VII. RECOMENDACIONES

1. Desarrollar trabajos de genotoxicidad en cultivos celulares con el “*ensayo cometa*” y ensayos *in vivo* para continuar con el conocimiento de estos efectos.
2. Identificar los metabolitos secundarios del látex y de los extractos que presentaron actividad genotóxica en este estudio.
3. Ampliar estudios de genotoxicidad con otras plantas medicinales de uso común en nuestra sociedad.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castañeda A. Evaluación de la actividad genotóxica de propóleos recolectados en diferentes apiarios de Cundinamarca y Boyacá. [tesis maestría]. Bogotá. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. 2012.
2. Hoffmann G. Genetic toxicology. Toxicology. The science of poisons (pp. 269-300). (5ª Ed.), New York: Cassaret and Doull's. 1996.
3. Craig D, Parsons P. Euphorbia peplusuna planta con posibles propiedades anticancerígenas. Wildcrafted Herbal Products [revista en internet]. 2002 enero, [acceso 02 de noviembre del 2014]; 10(2). Disponible en: [http://www.wildcrafted.com.au/Articles/Scientific\\_Reaserch/Milkweed\\_for\\_skin\\_cancer.html](http://www.wildcrafted.com.au/Articles/Scientific_Reaserch/Milkweed_for_skin_cancer.html)
4. Chacua A, "Determinación del proceso tecnológico para la obtención de harina de higo (*ficus carica* L.) de dos estados de madurez (verde y negra)". [tesis para optar título]. Universidad Técnica del Norte. Ibarra-Ecuador.2010.
5. Carballo M, Cortada C, Galano A. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. Revista teoría, historia y fundamentos de la Ciencia [revista en Internet] 2005 [acceso febrero 2014]; 14(2): 95-108. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=29914211>.
6. Motsei L, Lindey L, Van Staden J, Janger K. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. Journalist of Ethnopharmacology, 86, 235-241. 2003.
7. Vega R. Efecto citostático del látex de *Euphorbia peplus* L.f "leche leche" y *Ficus carica* L."higo" en el meristemo radicular de *Allium cepa* L. "cebolla". Ayacucho, Perú. 2006.
8. Llanes D. Actividad inmunomoduladora de extractos de 10 plantas de la familia *Euphorbiaceae* [Tesis maestría]. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 2009.
9. Yoc A, Soto E, Gutiérrez J y Arriola M. Estudios de actividad biocida, citotóxica y genotóxica de tres plantas medicinales de la familia *Euphorbiaceae*: *Euphorbia lancifolia*, *Cnidioscolus aconitifolius* var. "mansa" y *Cnidioscolus aconitifolius* var. "estrella". [Tesis para optar título]. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2012.
10. Pillaca L. Efecto genotóxico in vitro de plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo". [Tesis para obtener título]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú. 2013.
11. Mena A. Validación farmacológica del efecto analgésico y antiinflamatorio, de hoja de *Ficus carica* "higuera", de hoja de *Persea americana* "aguacate" y flor de *Calendula officinalis* "flor de muerto" en infusión acuosa (fase I). Tesis. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala, 2005.
12. Itzic A. las plantas curativas. Grupo editorial Montevideo. Uruguay. 2006
13. Silvers M. "Estudio clínico de la actividad antifúngica del gel con tocte, higo, dulcamara y salvia en niños de la comunidad sanjapamba con *Malassezia furfur*". [Tesis para optar título]. Escuela Superior Politécnico de Chimborazo. Ribamba. Ecuador. 2012
14. Kloucek P, Polezny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska L. Antibacterial Screening of Some Peruvian Medicinal Plants Used in Callería 96 District. J. of Ethnopharm [revista en Internet] 2005 [acceso febrero 2014]; 99(2):309-312. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894143>.

15. Ferreira J, Cardoso M, Esteveao P. Inhibitory Effect of *Caesalpinia spinosa* Leaflets Crude Extract of *Fusarium solani* and *Phoma tarda*. *Acta Scientiarum Biological sciences*, 27/2: 185-188. 2005.
16. Shibata H, Kondo K, Katsuyama R, Kawazoe K, Sato Y, Murakami K, et al. Intensifiers of beta-Lactam Susceptibility in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antitumoral. Agents and Chemotherapy*, 49/2: 549-555. 2005.
17. De la Cruz M. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "taya" sobre la viabilidad de *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolítico. (Tesis Maestral). Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 2006.
18. Mendoza W. Estudios estructura y función de una lectina 95 Aislada de semillas de *Caesalpinia spinosa* Kuntze (tara). IDESIA (Chile) Mayo – Agosto. Volumen 25. Nº 2. Pág. 49-58. 2007.
19. Escobar L. Efecto in vitro de diferentes concentraciones de extracto alcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, sobre la viabilidad de *Corynebacterium diphtheriae*. *Rev. Med. Vallejiana*. Vol. 5 Nº 1. Pág. 28- 37. 2008.
20. Añanca E. Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Tacna Perú. 2009.
21. Sampaio F. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. Volumen 124. Nº2. Pág. 289-294. 2009.
22. Miyamoto C, Rocha J, Da Silva C, Cunico M, Miguel G, et al. Actividad genotóxica de aceite esencial de *Eucalyptus globulus* en *Aspergillus nidulans* células diploides. revised versión [revista en Internet] 2009 [acceso octubre 2014]; 54(6): 493-498. Disponible en: <http://www.link.springer.com/article/10.1007%2Fs12223-009-0070-1>
23. Damjanović B, Dakov T, Sukovic D, Damjanović J. Antimicrobial Effect of Essential Oil Isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. From Montenegro. *Czech J. Food Sci* [revista en Internet] 2011 [acceso febrero 2014]; 29(3): 277-284. Disponible en: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/39925.pdf>.
24. Orihuela D, Villafani Y, Bonilla H, Marin L, Jiménez A, et al. Evaluación del efecto citotóxico y genotóxico de extractos acuosos de *caesalpinia spinosa* "tara" en células del meristemo radicular de *allium cepa*. Grupo estudiantil CIRGEN [revista en Internet] 2012 [acceso marzo 2014]; 21(5). Disponible en: [http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/congres/basic/icbar\\_xxii/cap05.pdf](http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/congres/basic/icbar_xxii/cap05.pdf)
25. Ayala E. Efecto genotóxico in vitro de plantas medicinales antibacterianas *Spartium junceum* L. "retama", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto". [Tesis para obtener título]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú. 2013.
26. Carballo M, Cortada C, Gadano A. Citogenética Humana y Genética Toxicológica. CIGETOX. Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA. Buenos Aires- Argentina; 2005.
27. Brúgés K, Reguero M. Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. *Revista Colombiana de Biotecnología* [revista en Internet] 2007 [acceso Junio 2014]; 9(1): 5-13. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77690102>

28. Reyes F. Caracterización del efecto anticancerígeno del ácido maslínico, triterpeno pentacíclico de origen natural. [Tesis doctoral]. Universidad de Granada. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Granada. 2007.
29. Guevara E, González L, González R, Cabrera T, Medina R. Efecto genotóxico "in vitro" en *Melaleuca leucadentron* L. Revista médica Electrónica [revista en Internet] 2008 [acceso marzo 2015]; 30(2). Disponible en:  
<http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/año%202008/vol2/tema05>
30. Reynoso M. Evaluación de la genotoxicidad de compuestos aislados de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus* [tesis maestría]. Guadalajara. Universidad de Guadalajara; 2011.
31. Mendivelso D, Palacios C, Pinzón A, Victoria M. Estudio morfológico y anatómico de *Euphorbia peplus* linneo (*Euphorbiaceae*). Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Colombia. 2003.
32. Ankli A, Heinrich M, Bork P, Wolfram L, Bauerfeind P. Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. Journal of Ethnopharmacology, 79, 43–52. 2002.
33. Villarreal M, Alonso D, & Melesio G. Cytotoxic activity of Mexican plants used in traditional medicine. Fitoterapia, 43, 518–521.1992.
34. Bruneton J. Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 2001.
35. Jakupovic J, Morgernstern T, Bittner M y Silva M. "Diterpenes from *Euphorbia peplus*". Phytochemistry 1601 – 1609. 1998.
36. Villar del Fresno A. Farmacognosia General. Editorial síntesis. España. 1999.
37. Hoffmann G. Genetic toxicology. En G. Hoffmann .Quinta Edición. Toxicology: the basic science of poisons (pp. 269-300). New York: Cassarett and Doull's. 1996.
38. Baby J, Justin R. Farmacognóstico and Phitochemical propiedades de *Ficus carica* Linn-Una visión general. Unidad de Investigación Interdisciplinaria, Department of Biotecnología, Malankar Católica College, Mariagiri, KK District, Vol. 3, No. 1, pp 08-12, enero-marzo India. 2011.
39. CabelloL. Monografía para el cultivo de la tara, *Caesalpinia spinosa*(*Molina*) *Kuntze*. Perúbiodiverso. Lima; 2009.
40. Cueva A. Plantas medicinales: Propiedades y usos. 1ª ed. Lima: A.F.A.; 2003.
41. Andía H. Extracción de gomas de semillas de *Caesalpinia spinosa* (*Molina*) *Kuntze* "Tara" procedentes de las provincias de Cañete, Lima y Sucre [tesis de grado]. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1994.
42. Huarino M. Efecto antibacteriano de *Caesalpinia spinosa* "tara" sobre flora salival mixta [tesis de grado]. Lima: Facultad de Odontología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2011.
43. Sung I. Plantas Medicinales. 7ª ed. Lima: Isabel; 2000.
44. Bruneton J. Elementos de fitoquímica y farmacognosia. 1ª ed. Madrid: Acribia S.A.; 1991.
45. Velázquez M. Evaluación del efecto antibiótico *in vivo* del *eucalyptus globulus labill* en *oryctolagus cuniculus* con pasteurelisis [tesis de grado].Morelia: Universidad de San Nicolás de Hidalgo; 2013.

46. Janssen A, Scheffer J, Baerheim A. Antimicrobial activity of Essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the tests methods [revista en Internet] 1987 [acceso marzo 2014]; 53 (5): 395-398.  
Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3324126>.
47. Madigan M, Martinko J, Parker J. Biología de los Microorganismos. 8ª ed. Madrid: Printice Hall Iberia; 1997.
48. Mural, R. El manual de microbiología clínica. Sexta edición. Editor Ellen J. La Biblioteca del Congreso, Washington D.C. 1995.
49. Lennette E. Manual de microbiología clínica. Tercera Edición. Editorial Científico-técnico. La Habana-Cuba. 1984.
50. Guevara J, Cáceres A. Variedades de *Candida albicans* en mujeres con flujo vaginal anormal. Boletín Número 01-2000 de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Marcos Lima, Perú. 2000.
51. Scool R. y Bailey E. Diagnostic Microbiology. Seventh Edition. Editorial C.V. Mosby Company, United States of America. 1996.
52. Books G, Butel J y Ornston L. Microbiología médica de Jawets, Melnick y Adelberg. 15ª edición. Editorial el manual moderno S.A. México. 1996.
53. Poirier C, Chimenos E, Ferrer M, López J, Caballero R. Importancia de los factores predisponentes en la candidiasis bucal. Med Oral. 2:21-37. 1997.
54. Ministerio de Salud. Oficina General de Epidemiología. Módulos Técnicos. Serie de Monografías. Leishmaniasis.[acceso julio 2014] Lima, Perú. 2000:08-83
55. Bonfante R, Barruela S. *Leishmanias* y *Leishmaniasis* en América con especial referencia a Venezuela y Caracas Tipografía y Litografía Horizonte C.A. 2002. Disponible en:  
[http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v14\\_n2/pdf/a02.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v14_n2/pdf/a02.pdf)
56. Ministerio de salud. Programa de control de malaria y otras enfermedades metaxénicas, sub programa de leishmaniasis. Editorial Amarilyz. 1993.
57. Ministerio de la Protección Social. Protocolo de vigilancia y control de Leishmaniasis. Colombia. 2004. Disponible en:  
<http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Leishmaniasis%20viceral/01%20protocolo%20Leishmaniasis.pdf>
58. Espinosa D, Boggild K, Deborggraeve S, Laurent T, Valencia C, et al. *Leishmania* OligoC-TesT as a simple, rapid, and standardized tool for molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Peru. J Clin Microbiol. 2009;47:2560.  
<http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375076020120002002&script=sciarttext>
59. Deborggraeve S, Boelaert M, Rijal S, De Doncker S, Dujardin JC, et al. Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical visceral leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease. Trop Med Int Health. 2008;13:1378-83.  
<http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375076020120002002&script=sciarttext>
60. Eynard A, Valentich M, Rovasio R. histología y embriología de ser humano: bases celulares y moleculares. 4taed. Edición Médica Panamericana. [acceso agosto 2014], Buenos Aires Argentina. 2008.  
[http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/histologia/sistema\\_inmunitario.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/histologia/sistema_inmunitario.pdf)
61. Lehninger A, Nelson D, Cox M. Principios de Bioquímica. 2ª ed. Barcelona: Omega; 1995.
62. Lodish H, Berk A, Lawrence Z, Matsudaira P, Baltimore D et al. Biología celular y molecular. 4ª ed. Madrid: Médica Panamericana S.A.; 2002.
63. Sánchez A, Fonseca G, Capiro N, Fernandez D. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en cuba. Revista cubana en farmacia, 34,34-43. 2000.

64. Gaip P, Bartolom B, Enrique E, García-Ortega P, Palacios R, et al. Hipersensibilidad a *Ficus benjamina*. Unidad de alergia. Hospital Universitari Joan XXIII. Universidad Rovira y Virgili. Tarragona. 2000.
65. Guzmán-Rincón M, & Graf U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. *Biomonitoring and biomarkers and indicators of environmental change* (pp. 169-181). New York: Plenum Press. 1995.
66. Carranza Z. Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del estado de Hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido [tesis pregrado]. Tulancingo de Bravo: Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2006.
67. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. 2ª ed. Lima: Fondo editorial; 1994.
68. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad De La Habana Instituto de Farmacia y Alimentos. Cuba; 2000.
69. Miranda T, Valer G. Protocolos de Biología Molecular-Guía de práctica. Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2013.
70. Britner M, Alarcón J, Aqueveque P, Becerra J y Hernández V, et al. Estudio químico de especies de la familia Euphorbiaceae. *Bol. Soc. Quím.* v.46n.4 Concepción Chile dic. 2001. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S03666442001000400006>

## **IX. ANEXOS**

## Anexo 1

Certificado de clasificación taxonómica de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", para la evaluación de la genotoxicidad. Ayacucho 2014.



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

### CERTIFICA

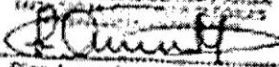
Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, Srta. **Mirtha Estela, GUTIÉRREZ MEDINA**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	EUPHORBIALES
FAMILIA	:	EUPHORBIACEAE
GÉNERO	:	<i>Euphorbia</i>
ESPECIE	:	<i>Euphorbia peplus</i> L.
N.V.	:	"leche leche"

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

Ayacucho, 20 de Noviembre del 2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
  
Bga. Laura Acosta Medina  
JEFE

## Anexo 2

Certificado de clasificación taxonómica de *Ficus carica* L. "higo", para la evaluación de la genotoxicidad. Ayacucho 2014.



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

### C E R T I F I C A

Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, Srta. Mirtha Estela, GUTIÉRREZ MEDINA, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	HAMAMELIDAE
ORDEN	:	URTICALES
FAMILIA	:	MORACEAE
GÉNERO	:	<i>Ficus</i>
ESPECIE	:	<i>Ficus carica</i> L.
N.V.	:	"higuera"

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

Ayacucho, 20 de Noviembre del 2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
  
Bjtz. Liana Alejandra Núñez  
JEFE

### Anexo 3

Certificado de clasificación taxonómica de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara", para la evaluación de la genotoxicidad. Ayacucho 2014.



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

### C E R T I F I C A

Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, Srta. Mirtha Estela, GUTIÉRREZ MEDINA, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	FABALES
FAMILIA	:	CAESALPINIACEAE
GÉNERO	:	Caesalpinia
ESPECIE	:	<i>Caesalpinia spinosa</i> Molina Kuntze.
N.V.	:	"tara"

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

Ayacucho, 20 de Noviembre del 2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
  
Especialista en Taxonomía Vegetal  
JEFE

## Anexo 4

Certificado de clasificación taxonómica de *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto", para la evaluación de la genotoxicidad. Ayacucho 2014.



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

### C E R T I F I C A

Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, Srta. **Mirtha Estela, GUTIÉRREZ MEDINA**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	MYRTALES
FAMILIA	:	MYRTACEAE
GÉNERO	:	<i>Eucaliptus</i>
ESPECIE	:	<i>Eucaliptus globulus</i> Labill.
N.V.	:	"eucalipto"

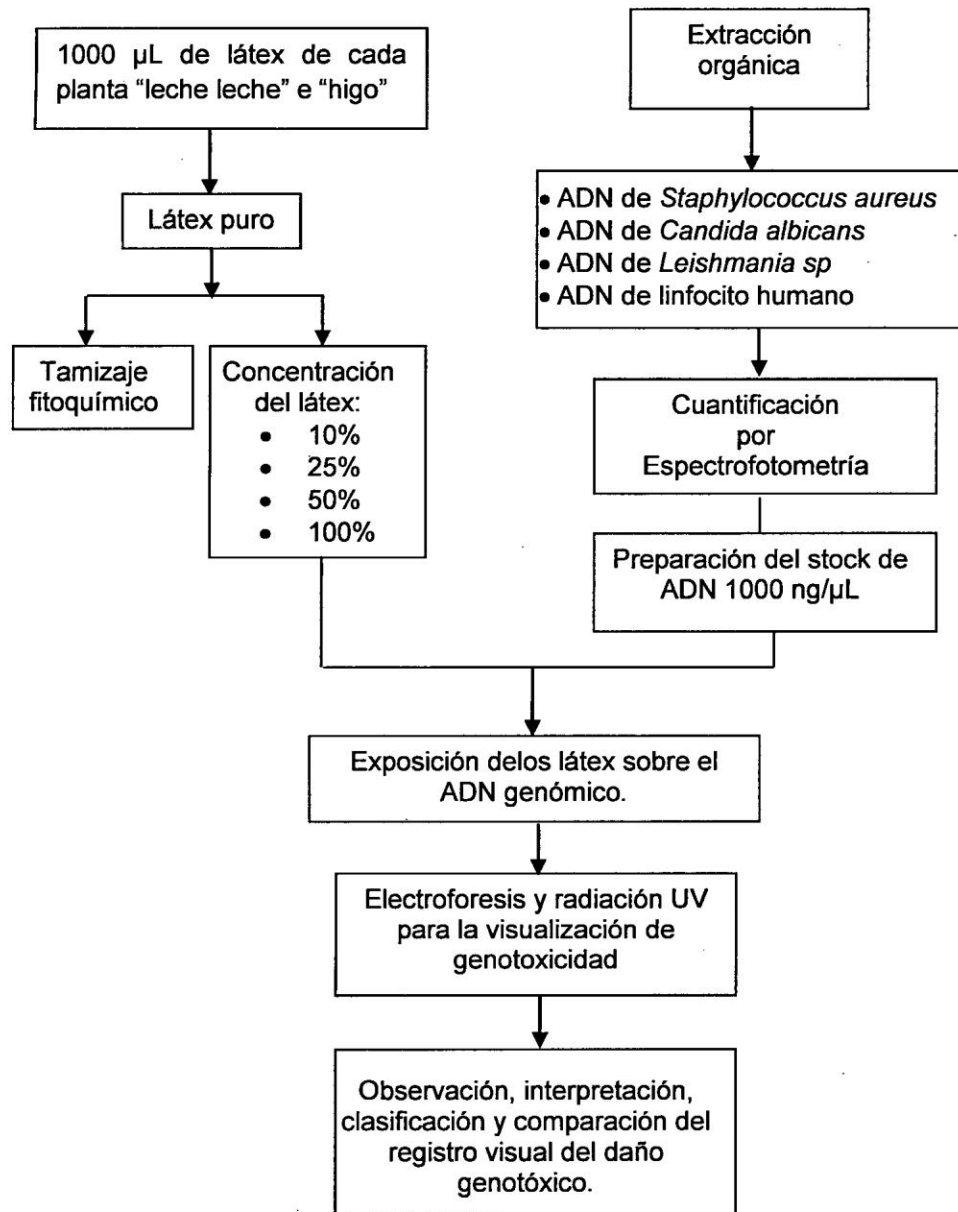
Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 20 de Noviembre del 2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM HUAMANGENSIS  
  
Dña. Laura Alcántara Medina  
JEFE

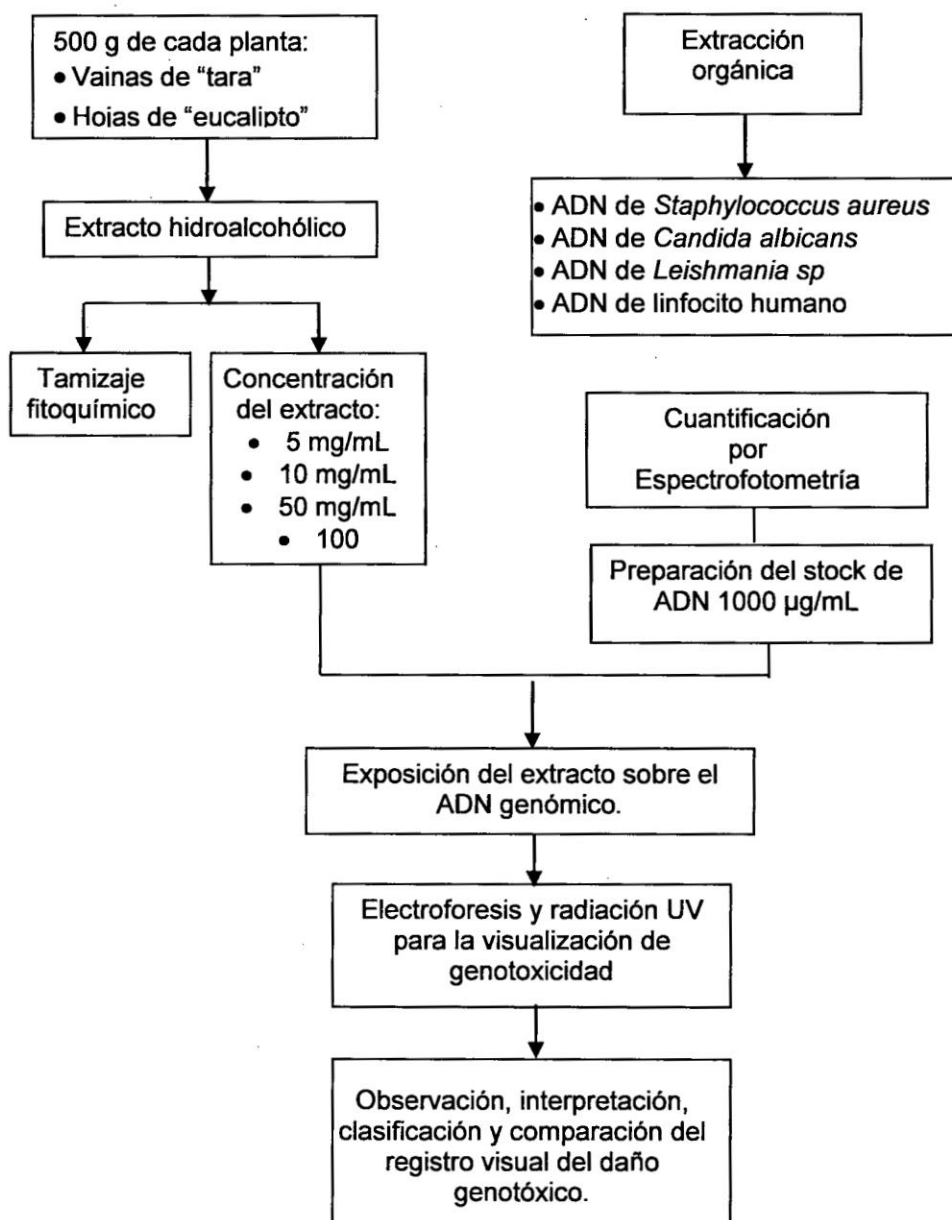
## Anexo 5

Esquema de la obtención del látex puro y tamizaje fitoquímico para evaluar y comparar la genotoxicidad *in vitro* de plantas medicinales sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania sp* y linfocito humano. Ayacucho 2014.



## Anexo 6

Esquema de la obtención del extracto hidroalcohólico y tamizaje fitoquímico para evaluar y comparar la genotoxicidad *in vitro* de plantas medicinales sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania sp* y linfocito humano. Ayacucho 2014.



## Anexo7

Características producidas en los ensayos para la identificación de los metabolitos secundarios. Miranda. Ayacucho, 2014.

Metabolitos secundarios	Ensayos con reactivos	Observación
Alcaloides	Dragendorff Mayer Hager Wagner	Hay formación de precipitado en todas las reacciones.
Lactonas y cumarinas	Baljet	Formación de una coloración roja.
Flavonoides	Shinoda	Hay coloración amarilla, naranja, carmelita o rojo en la fase amilica.
Quinonas	Borntrager	Si es positivo la fase amoniaca es de color rojizo o rosada.
Catequinas	Catequinas	Coloración verde carmelita a luz uv, indica un ensayo positivo.
Saponinas	Espuma	Si es positivo hay formación de espuma en la superficie.
Azucares reductoras	Benedict	Si es positivo hay formación de precipitado rojo ladrillo.
Taninos y fenoles	Cloruro férrico	Formación de una coloración negruzca.
Aminas (aminoácidos)	Ninhidrina	Hay coloración violeta.
Cardenólidos	Kedde	Coloración violácea.

## Anexo 8

Látex de los tallos de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y frutos de *Ficus carica* L. "higo". Ayacucho, 20104.



## Anexo 9

Secado a temperatura ambiente de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) kuntze "tara" y hojas de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto" para la obtención del extracto hidroalcohólico. Ayacucho, 2014.



## Anexo 10

Tamizaje fitoquímico (reacción de Shinoda y Cloruro férrico) del látex de los frutos de *Ficus carica* L. "higo", del extracto hidroalcohólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y hojas de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto".



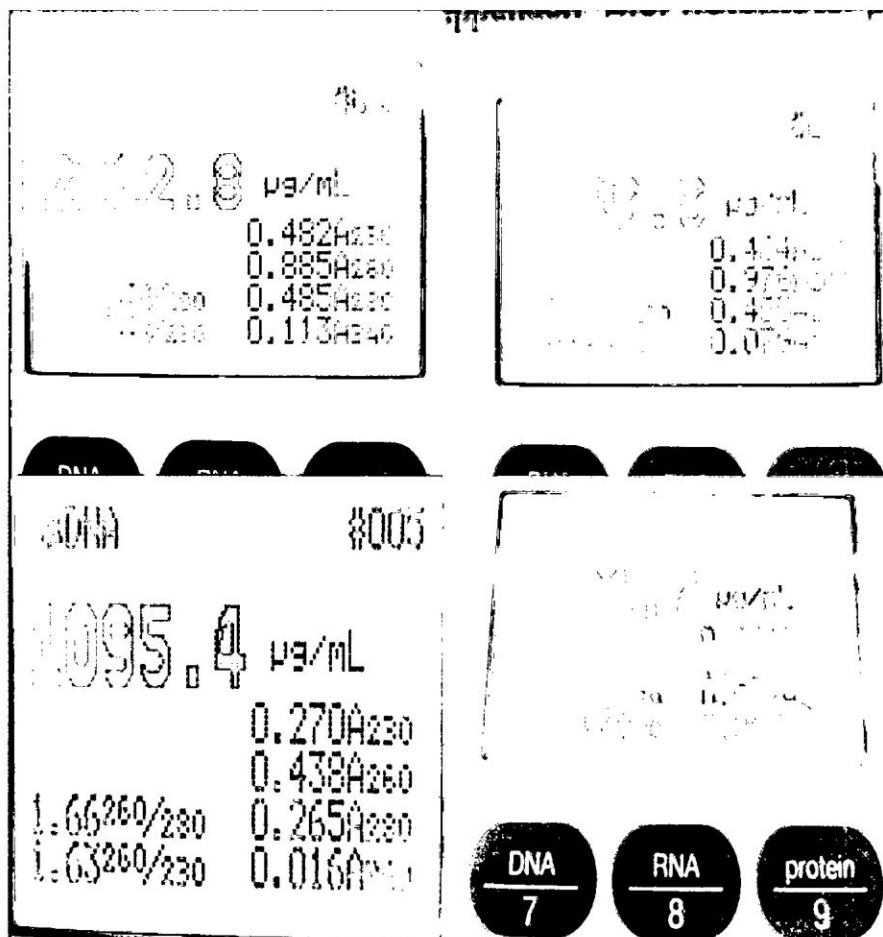
## Anexo 11

Cultivo de las cepas de *Staphylococcus aureus*, *candida albicans* ATCC 40028 y extracción del ADN genómico para la evaluación de genotoxicidad de las plantas medicinales en estudio. Ayacucho, 2014.



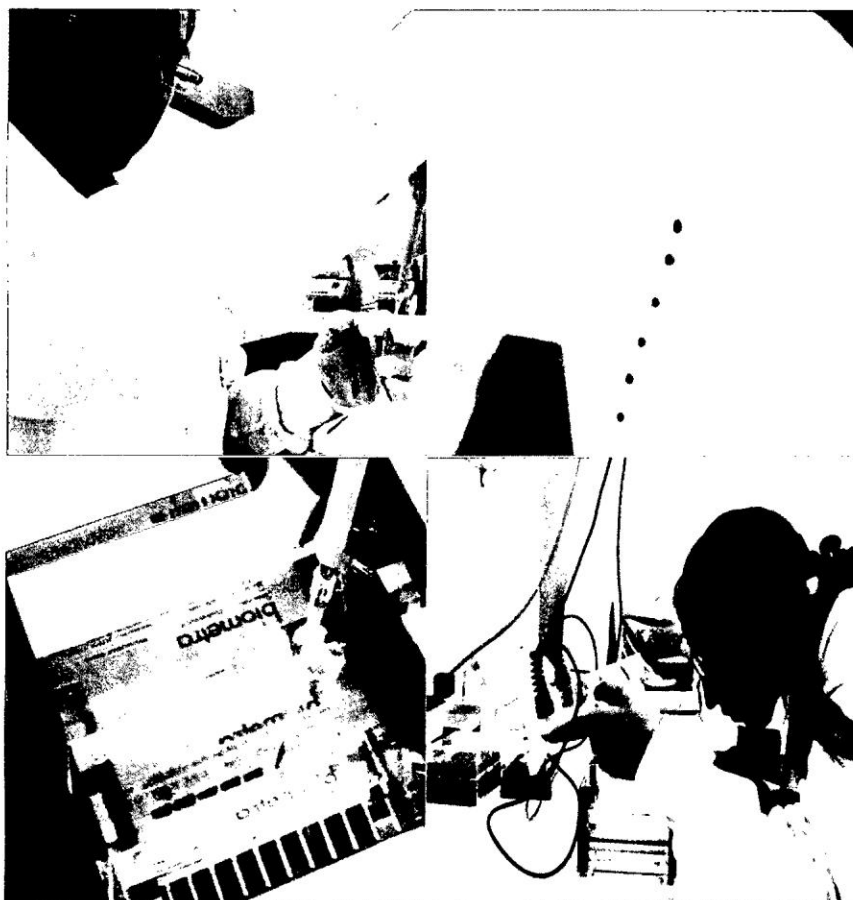
## Anexo 12

Cuantificación por espectrofotometría UV de ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ATCC 40028, *Leishmania sp* M 2903 y linfocito humano; para la evaluación de la genotoxicidad de las plantas medicinales en estudio. Ayacucho, 2014.



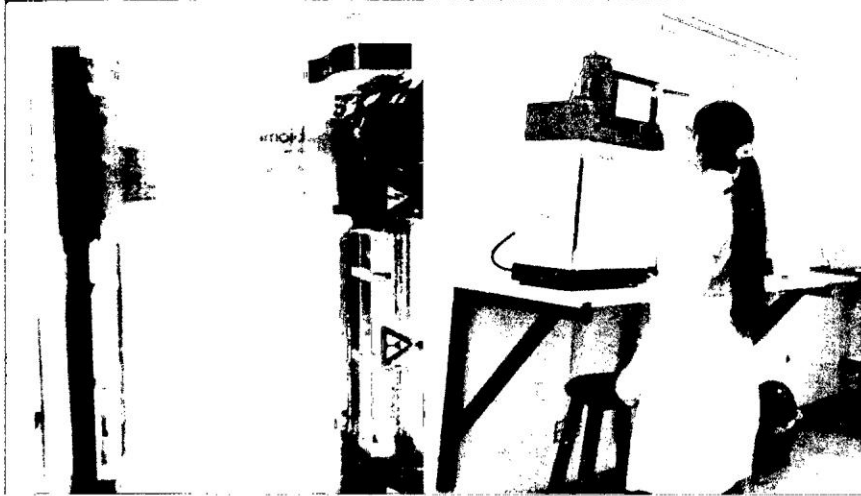
### Anexo 13

Ensayo "in vitro" y electroforesis en gel de agarosa al 1%, para la evaluación de genotoxicidad de plantas medicinales en estudio. Ayacucho, 2014.



## Anexo 14

Registro fotográfico de la genotoxicidad de plantas medicinales evaluadas en gel de agarosa al 1%, con bromuro de etidio al 1%.



### Anexo 15

Valores numéricas del grado de genotoxicidad de las plantas medicinales en estudio, según la concentración del extracto hidroalcohólico y tiempo de incubación.

Tipo de ADN	Concentración del látex (%)y el extracto hidroalcohólico (mg/mL)															
	leche leche				higo				tara				eucalipto			
	10	25	50	100	10	25	50	100	5	10	50	100	5	10	50	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3	4	4	4	4	4	4	1	2	3	4	0	0	2	4
	2	4	4	4	4	4	4	4	1	3	3	3	0	0	3	4
	3	4	4	4	4	4	4	4	1	3	2	4	1	1	3	3
	3	3	4	4	4	4	4	4	2	3	3	4	0	0	3	4
<i>Candida albicans</i>	4	4	4	4	4	4	4	4	2	2	3	4	1	1	2	3
	3	4	4	4	4	4	4	4	2	3	4	4	1	2	3	4
	3	3	4	4	4	4	4	4	1	2	3	4	1	1	2	3
	3	4	4	4	3	4	4	4	2	3	4	4	0	1	2	4
<i>Leishmania sp</i>	2	3	4	4	4	4	4	4	0	0	3	3	0	1	2	3
	2	3	4	4	4	4	4	4	0	1	3	3	1	1	2	3
	2	4	4	4	4	4	4	4	1	1	2	3	0	1	1	2
	3	4	4	4	4	4	4	4	0	0	2	4	1	1	2	3
Linfocito humano	3	3	4	4	3	3	4	4	1	2	4	4	0	1	2	4
	3	3	4	4	3	3	4	4	0	1	3	3	0	0	2	3
	2	4	4	4	2	4	4	4	0	2	3	4	1	1	2	3
	3	3	4	4	2	3	4	4	2	2	4	4	0	1	3	4
Tiempo (h)	1															

## Anexo 16

Resultados de la prueba N par de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad de látex del tallo de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", según el tipo de ADN. Ayacucho 2014.

Estadísticos descriptivos					
Tipo ADN	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	3,563	0,629	2,0	4,0
	16	2,500	1,155	1,0	4,0
<i>Candida albicans</i>	16	3750	0,447	3,0	4,0
	16	2,500	1,155	1,0	4,0
<i>Leishmania sp</i>	16	3,438	0,814	2,0	4,0
	16	2,500	1,155	1,0	4,0
Linfocito humano	16	3,500	0,633	2,0	4,0
	16	2,500	1,155	1,0	4,0

## Anexo 17

Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad de látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", según el tipo de ADN y la concentración. Ayacucho 2014.

Categorización por Tipo de ADN	Concentración (mg/mL)	N	Rango promedio
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	4	3,25
	25	4	7,75
	50	4	11,50
	100	4	11,50
	Total	16	
<i>Candida albicans</i>	10	4	4,50
	25	4	8,50
	50	4	10,50
	100	4	10,50
	Total	16	
<i>Leishmania sp</i>	10	4	2,75
	25	4	8,25
	50	4	11,50
	100	4	11,50
	Total	16	
Linfocito humano	10	4	3,63
	25	4	6,38
	50	4	12,00
	100	4	12,00
	Total	16	
<b>Estadísticos de prueba<sup>a,b</sup></b>			
<i>Staphylococcus aureus</i>	Chi-cuadrado		11,182
	GI		3
	Sig. Asintótica		0,011
<i>Candida albicans</i>	Chi-cuadrado		7,500
	GI		3
	Sig. Asintótica		0,058
<i>Leishmania sp</i>	Chi-cuadrado		12,101
	GI		3
	Sig. Asintótica		0,007
Linfocito humano	Chi-cuadrado		12,064
	GI		3
	Sig. Asintótica		0,007

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: concentración (mg/mL)

## Anexo 18

Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad del látex del tallo de *Euphorbia peplus* L. "leche leche", según el tipo de ADN. Ayacucho 2014.

Estadísticos descriptivos					
	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Genotoxicidad	64	3,563	0,639	2,0	4,0
Tipo ADN	64	2,500	1,127	1,0	4,0
Categorización por tipo ADN					
ADN	N	Rango promedio			
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	32,22			
<i>Candida albicans</i>	16	36,63			
<i>Leishmania sp</i>	16	30,78			
Linfocito humano	16	30,38			
Total	64				
Estadísticos de prueba <sup>a,b</sup>					
Chi-cuadrado	1,587				
G1	3				
Sig. asintótica	0,662				

- a. Prueba de Kruskal Wallis  
 b. Variable de agrupación: tipo de ADN

## Anexo 19

Resultados de la prueba N par de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad del látex del fruto de *Ficus carica* L. "higo", según la concentración. Ayacucho 2014.

Estadísticos descriptivos					
Tipo ADN	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	4,000	0,000	4,00	4,0
	16	2,500	1,155	1,00	4,0
<i>Candida albicans</i>	16	3,938	0,250	3,00	4,0
	16	2,500	1,155	1,00	4,0
<i>Leishmania sp</i>	16	4,000	0,000	4,00	4,0
	16	2,500	1,155	1,00	4,0
Linfocito humano	16	3,438	0,727	2,00	4,0
	16	2,500	1,155	1,00	4,0

## Anexo 20

Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad del látex del fruto de *Ficus carica* L. "higo", según el tipo de ADN y la concentración. Ayacucho 2014.

Categorización por tipo de ADN	Concentración (mg/mL)	N	Rango promedio
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	4	8,44
	25	4	8,44
	50	4	8,44
	100	4	8,44
	Total	16	
<i>Candida albicans</i>	10	4	7,00
	25	4	9,00
	50	4	9,00
	100	4	9,00
	Total	16	
<i>Leishmania sp</i>	10	4	8,44
	25	4	8,44
	50	4	8,44
	100	4	8,44
	Total	16	
Linfocito humano	10	4	3,25
	25	4	6,75
	50	4	12,00
	100	4	12,00
	Total	16	
<b>Estadísticos de prueba<sup>a,b</sup></b>			
<i>Staphylococcus aureus</i>	Chi-cuadrado		5,469
	GI		3
	Sig. Asintótica		0,100
<i>Candida albicans</i>	Chi-cuadrado		6,500
	GI		3
	Sig. Asintótica		0,068
<i>Leishmania sp</i>	Chi-cuadrado		5,610
	GI		3
	Sig. Asintótica		0,100
Linfocito humano	Chi-cuadrado		12,946
	GI		3
	Sig. Asintótica		0,003

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: concentración (mg/mL)

## Anexo 21

Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad del látex del fruto de *Ficus carica* L. "higo", según el tipo de ADN. Ayacucho 2014.

<b>Estadísticos descriptivos</b>					
	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Genotoxicidad	64	3,844	0,444	2,0	4,0
Tipo ADN	64	2,500	1,127	1,0	4,0
Tipo ADN	N	Rango promedio			
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	36,50			
<i>Candida albicans</i>	16	34,56			
<i>Leishmania sp</i>	16	36,50			
Linfocito humano	16	22,44			
Total	64				
<b>Estadísticos de prueba<sup>a,b</sup></b>					
Chi-cuadrado	16,73				
Gl	3				
Sig. Asintótica	0,000				

a. Prueba de Kruskal Wallis.

b. Variable de agrupación: tipo de ADN.

## Anexo 22

Resultados de la prueba N par de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de la vaina de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara", según el tipo de ADN. Ayacucho 2014.

Estadísticos descriptivos					
Tipo ADN	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	2,625	1,025	1,0	4,0
	16	2,500	1,155	1,0	4,0
<i>Candida albicans</i>	16	2,938	0,998	1,0	4,0
	16	2,500	1,155	1,0	4,0
<i>Leishmania sp</i>	16	1,625	1,408	0,0	4,0
	16	2,500	1,155	1,0	4,0
Linfocito humano	16	2,438	1,414	0,0	4,0
	16	2,500	1,155	1,0	4,0

### Anexo 23

Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de la vaina de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara", según el tipo de ADN y la concentración. Ayacucho 2014.

<b>Categorización por tipo de ADN</b>	<b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>N</b>	<b>Rango promedio</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	4	2,75
	10	4	8,75
	50	4	8,75
	100	4	13,75
	Total	16	
<i>Candida albicans</i>	5	4	3,25
	10	4	6,25
	50	4	11,00
	100	4	13,50
	Total	16	
<i>Leishmania sp</i>	5	4	4,00
	10	4	5,00
	50	4	11,25
	100	4	13,75
	Total	16	
Linfocito humano	5	4	3,25
	10	4	5,75
	50	4	12,00
	100	4	13,00
	Total	16	
<b>Estadísticos de prueba<sup>a,b</sup></b>			
<i>Staphylococcus aureus</i>	Chi-cuadrado		11,912
	GI		3
	Sig. Asintótica		0,008
<i>Candida albicans</i>	Chi-cuadrado		12,463
	GI		3
	Sig. Asintótica		0,006
<i>Leishmania sp</i>	Chi-cuadrado		12,780
	GI		3
	Sig. Asintótica		0,005
Linfocito humano	Chi-cuadrado		12,601
	GI		3
	Sig. Asintótica		0,006

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: concentración (mg/mL)

## Anexo 24

Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de la vaina de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara", según el tipo de ADN. Ayacucho 2014.

Estadísticos descriptivos					
	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Genotoxicidad	64	2,406	1,294	0,0	4,0
Tipo ADN	64	2,500	1,127	1,0	4,0
Tipo ADN	N	Rango promedio			
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	34,84			
<i>Candida albicans</i>	16	39,47			
<i>Leishmania sp</i>	16	22,50			
Linfocito humano	16	33,19			
Total	64				
Estadísticos de prueba <sup>a,b</sup>					
Chi-cuadrado	7,534				
GI	3				
Sig. Asintótica	0,057				

- a. Prueba de Kruskal-Wallis
- b. Variable de agrupación: Tipo de ADN

## Anexo 25

Resultados de la prueba N par de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de la hoja de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto", según tipo de ADN. Ayacucho 2014.

<b>Estadísticos descriptivos</b>					
Tipo ADN	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	1,750	1,653	0,0	4,0
	16	1,000	0,000	1,0	1,0
<i>Candida albicans</i>	16	1,938	1,182	0,0	4,0
	16	2,000	0,000	2,0	2,0
<i>Leishmania sp</i>	16	1,500	0,966	0,0	3,0
	16	3,000	0,000	3,0	3,0
Linfocito humano	16	1,688	1,4011	0,0	4,0
	16	4,000	0,000	4,0	4,0

## Anexo 26

Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de la hoja de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto", según el tipo de ADN y la concentración. Ayacucho 2014.

Categorización por tipo ADN	Concentración (mg/mL)	N	Rango promedio
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	4	4,50
	10	4	4,50
	50	4	10,88
	100	4	14,13
	Total	16	
<i>Candida albicans</i>	5	4	3,63
	10	4	5,75
	50	4	10,38
	100	4	14,25
	Total	16	
<i>Leishmania sp</i>	5	4	3,75
	10	4	6,00
	50	4	10,13
	100	4	14,13
	Total	16	
Linfocito humano	5	4	3,50
	10	4	5,50
	50	4	10,75
	100	4	14,25
	Total	16	
<b>Estadísticos de prueba<sup>a,b</sup></b>			
<i>Staphylococcus aureus</i>	Chi-cuadrado		13,196
	GI		3
	Sig. Asintótica		0,004
<i>Candida albicans</i>	Chi-cuadrado		12,935
	GI		3
	Sig. Asintótica		0,005
<i>Leishmania sp</i>	Chi-cuadrado		12,432
	GI		3
	Sig. Asintótica		0,006
Linfocito humano	Chi-cuadrado		13,295
	GI		3
	Sig. Asintótica		0,004

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: concentración (mg/mL)

## Anexo 27

Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de la hoja de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto", según tipo de ADN. Ayacucho 2014.

Estadísticos descriptivos					
	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Genotoxicidad	64	1,719	1,303	0,0	4,0
Tipo ADN	64	2,500	1,127	1,0	4,0
Tipo ADN	N	Rango promedio			
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	32,09			
<i>Candida albicans</i>	16	35,88			
<i>Leishmania sp</i>	16	30,13			
Linfocito humano	16	31,91			
Total	64				
Estadísticos de prueba <sup>a,b</sup>					
Chi-cuadrado	0,853				
GI	3				
Sig. Asintótica	0,837				

- a. Prueba de Kruskal-Wallis  
 b. Variable de agrupación: Tipo de ADN

**Anexo 28**  
**Matriz de consistencia**

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEORICO	HIPOTESIS	VARIABLES	METODOLOGIA
Comparación de la genotoxicidad <i>in vitro</i> de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche", <i>Ficus carica</i> L. "higo", <i>Caesalpinia spinosa</i> Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto", Ayacucho 2014.	¿Cuáles serán las similitudes y diferencias de la genotoxicidad <i>in vitro</i> de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche", <i>Ficus carica</i> L. "higo", <i>Caesalpinia spinosa</i> Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto", frente a los ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Leishmania sp</i> y linfocito humano?	GENERAL - Comparar la genotoxicidad <i>in vitro</i> de las plantas medicinales <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche", <i>Ficus carica</i> L. "higo", <i>Caesalpinia spinosa</i> Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto", frente a ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Leishmania sp</i> y linfocito humano.  ESPECÍFICOS: - Identificar los metabolitos secundarios en látex de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" y <i>Ficus carica</i> L. "higo", y en extracto hidroalcohólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto". - Contrastar similitudes y diferencias de la genotoxicidad <i>in vitro</i> de los látex y extractos hidroalcohólicos de las plantas medicinales en estudio, frente a ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Leishmania sp</i> y linfocito humano.	Aspectos Botánicos de <i>Euphorbia peplus</i> "leche leche", <i>Ficus carica</i> "higo", <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto": Clasificación taxonómica, Descripción botánica, Composición química, Actividad biológica. - <i>Staphylococcus aureus</i> . - <i>Candida albicans</i> , - <i>Leishmania sp</i> - Linfocito humano. - Estructura de ADN - Determinación de la pureza y cuantificación de ADN - Genotoxicidad. - Electroforesis	Las plantas medicinales <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche", <i>Ficus carica</i> L. "higo", <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto", presentan similitudes y diferencias en la genotoxicidad <i>in vitro</i> frente a ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Leishmania sp</i> y linfocito humano.	Variable Principal: Plantas medicinales <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche", <i>Ficus carica</i> L. "higo", <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto".  Indicador: - Concentración del látex (%) y extracto hidroalcohólico (mg/mL).  Variable secundaria: Genotoxicidad <i>in vitro</i> de las plantas medicinales. Indicador: - ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> . - ADN genómico de <i>Candida albicans</i> . - ADN genómico de <i>Leishmania sp</i> . - ADN genómico de linfocito humano. Fragmentación del Ácido desoxirribonucleico (ADN).	Tipo de investigación: Básica – descriptivo. Nivel de investigación: Básico. Población: <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche", <i>Ficus carica</i> L. "higo", <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto", que crecen en la comunidad de Colpa del distrito de Acos Vinchos de la provincia de Huamanga, Región Ayacucho. Muestra: 1000 µL de látex de los tallos de <i>Euphorbia peplus</i> "leche leche", 1000 µL de látex de los frutos de <i>Ficus carica</i> "higo", 500 g de vainas secas de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze "tara" y 500 g de hojas frescas de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill "eucalipto". Diseño Experimental: Los ensayos se realizarán con un modelo <i>in vitro</i> para estudiar la genotoxicidad del látex y extractos etanólicos, sobre los ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Leishmania sp</i> y linfocito humano; demostrándose por su fragmentación. Análisis estadístico: Los datos fueron agrupados y presentados en tablas, expresados en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. El daño genotóxico se evaluó mediante el paquete estadístico SPSS, Kruskal-Wallis para más de dos muestras independientes. El valor de (p≤0,05); se consideró como el nivel estadísticamente significativo.