

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

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



TESIS:

Efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico mixto de *Cinchona spp.*, *Eucalyptus globulus* y *Zingiber officinale* frente al ADN de *Escherichia coli*.

Para optar el título profesional de:

QUIMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR:

Bach. Christel Annie RIVERA GUTIERREZ

ASESOR:

Dr. Emilio Germán RAMIREZ ROCA

AYACUCHO - PERÚ

2024

A mis padres y a mi querido
hijo Noah.

AGRADECIMIENTO

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

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

A mi asesor Dr. Emilio Ramírez Roca, quien accedió a brindarme toda su paciencia, capacidad y experiencia científica.

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

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

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.1.1. Internacional	3
2.1.2. Nacional	6
2.1.3. Local	7
2.2. Aspectos botánicos	9
2.2.1. <i>Cinchona spp.</i>	9
2.2.2. <i>Eucalyptus globulus</i> Labill	10
2.2.3. <i>Zingiber officinale</i>	12
2.3. Ácidos nucleicos	12
2.4. Toxicidad y genotoxicidad	13
2.5. Espectrofotometría	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Lugar de ejecución	19
3.2. Definición de la población y muestra	19
3.3. Procedimiento para la recolección de datos	20
3.4. Análisis de datos	23
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN	33
VI. CONCLUSIONES	39
VII. RECOMENDACIONES	41
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS	50

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Elaboración de la mezcla para en ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>	22
Tabla 2 Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN, clasificados por registro visual	23
Tabla 3 Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico mixto de la corteza de <i>Cinchona</i> spp. “quina”, hojas de <i>Eucalyptus globulus</i> “eucalipto” y del rizoma <i>Zingiber officinale</i> “palillo”	27
Tabla 4 Valores numéricos del ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico mixto de <i>Cinchona</i> spp. “quina”, <i>Eucalyptus globulus</i> “eucalipto” y <i>Zyngiber officinale</i> “kion” frente al ADN de <i>Escherichia coli</i> a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/ML, respectivamente, incubado a 37 °C durante una hora	30

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Estructura química de las bases nitrogenadas	13
Figura 2 Ensayos de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico mixto de <i>Cinchona</i> spp. “quina”, <i>Eucalyptus globulus</i> “eucalipto” y <i>Zingiber officinale</i> “kion” frente al ADN de <i>Escherichia coli</i> .	28
Figura 3 Reproducibilidad del ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico mixto de <i>Cinchona</i> spp. “quina”, <i>Eucalyptus globulus</i> “eucalipto” y <i>Zingiber officinale</i> “kion” frente al ADN de <i>Escherichia coli</i> .	29
Figura 4 Ensayo de Kruskal-Wallis para la genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico mixto de <i>Cinchona</i> spp. “quina”, <i>Eucalyptus globulus</i> “eucalipto” y <i>Zingiber officinale</i> “kion”, a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, frente al ADN <i>Escherichia coli</i> , incubado a 37°C a por el tiempo de una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.	31

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1 Constancia de la clasificación taxonómica de la especie vegetal <i>Cinchona</i> spp “quina”.	52
Anexo 2 Constancia de la clasificación taxonómica de la especie vegetal <i>Eucaliptus globulus</i> Labill. “eucalipto”.	53
Anexo 3 Constancia de la clasificación taxonómica de la especie vegetal de <i>Zingiber officinale</i> “kión”.	54
Anexo 4 Constancia de la ponencia del artículo científico: “Metodología para la determinación del efecto genotóxico <i>in vitro</i> de plantas medicinales y/y productos fitoterapéuticos.	55
Anexo 5 Flujograma general de trabajo.	56
Anexo 6 Procedimiento realizado para el tamizaje fitoquímico.	57
Anexo 7 Proceso de preparación del extracto hidroalcohólico mixto de corteza de <i>Cinchona</i> spp., hojas de <i>Eucalyptus globulus</i> y del rizoma <i>Zingiber officinale</i> .	58
Anexo 8 Tamizaje fitoquímico del extracto mixto de corteza de <i>Cinchona</i> spp., hojas de <i>Eucalyptus globulus</i> y del rizoma <i>Zingiber officinale</i> .	59
Anexo 9 Protocolo para la determinación del efecto genotóxico <i>in vitro</i> mediante electroforesis, propuesto por Miranda T.	60
Anexo 10 Protocolo extracción de ADN genómico de <i>Escherichia coli</i> .	61
Anexo 11 Esquema del equipo de electroforesis.	62
Anexo 12 Matriz de consistencia.	63

RESUMEN

La corteza de quina, hojas del eucalipto y los rizomas de jengibre, son utilizadas en la medicina tradicional, principalmente para el tratamiento de afecciones a las vías respiratorias, pero su consumo indiscriminado podría acarrear problemas secundarios, motivo por el que se planteó este estudio teniendo como objetivo determinar el efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico mixto (EM), de *Cinchona* spp, *Eucalyptus globulus* y *Zingiber officinale* frente al ADN genómico de *Escherichia coli*, como también identificar los metabolitos secundarios. Para la determinación del efecto genotóxico *in vitro*, se acondicionó el macerado mixto de las tres plantas en etanol: agua (3: 1), luego este extracto mixto (EM) se diluyó a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, enfrentando cada uno de ellos a ADN genómico de *Escherichia coli*, inmediatamente se sometió a electroforesis en gel de agarosa, se realizó la tinción con bromuro de etidio y se registraron imágenes. Así mismo, se realizó la marcha fitoquímica para la detección de los metabolitos secundarios. Los resultados revelan la presencia compuestos fenólicos, azúcares reductores (+++); taninos, alcaloides, saponinas y catequinas (++) de flavonoides, lactonas y/o cumarinas (+); respecto al efecto genotóxico se determinó que a concentraciones de 25 y 50 mg/mL del EM, el ADN fue fragmentado de 40 a 95%; a concentración de 100 mg/mL de EM, la fragmentación fue por encima del 95% del ADN genómico de *Escherichia coli*; el estadístico de prueba de Kruskal – Wallis, indicó el rechazo de la hipótesis nula (H_0) y acepta la hipótesis alterna (H_1), indicando que al menos una concentración del tratamiento tiene comportamiento genotóxico diferente. Concluyendo que el extracto mixto de *Cinchona* spp, *Eucalyptus globulus* y *Zingiber officinale* presenta efecto genotóxico frente al ADN genómico de *Escherichia coli*, dependiente de la concentración del EM, por lo que a mayor concentración se observa mayor el efecto genotóxico.

Palabras clave: genotoxicidad, *Cinchona* spp, *Eucalyptus globulus*, *Zingiber officinale*, ADN genómico de *Escherichia coli*.

I. INTRODUCCIÓN

El reino vegetal desde tiempos inmemoriales fueron utilizados en medicina alternativa con el conocimiento transmitido tras generaciones de manera empírica, con el fin de mitigar problemas de salud que aquejaban a la población, tras el avance de siglos y de la ciencia, se ha logrado determinar que muchas especies vegetales presentan sustancias químicas dentro de su composición, estas sustancias son la responsables de las diferentes actividades terapéuticas de la especie vegetal, a estos se les ha denominado como metabolitos secundarios; asimismo, estas sustancias fueron promisorias para el desarrollo de fármacos para tratar determinadas enfermedades en centros de investigación; sin embargo, a pesar del avance de la ciencia las especies vegetales aún continua siendo una de las mejores fuentes naturales para ser utilizado medicina tradicional¹.

Según informes se estimado que alrededor 80 % de la humanidad a nivel mundial aún dependen del uso de hierbas medicinales como tratamiento para algunas afecciones que se susciten, esto se debe a factores de la accesibilidad a medicamentos, al coste de productos farmacéuticos provenientes de occidente y generalmente el uso de plantas medicinales en determinadas comunidades son consideradas como una práctica espiritual y de cultura, incluso el mundo occidental también presenta estimación del aumento de uso de hierbas medicinales con un aproximado del 40% de la población que llevo a que utilizan hierbas medicinales para los principales problemas de salud en atención primaria². A pesar de los beneficios que perciban la población por el uso de plantas medicinales, estos no cuentan con estudios que garanticen su uso seguro, como pruebas toxicológicas que garanticen la seguridad del uso de las plantas medicinales, por lo cual surge un interés de la comunidad científica para evaluar determinados ensayos a corto o largo plazo, que brinden información de los perfiles de eficacia y seguridad de las plantas medicinales, información basada en evidencia científica, entre los que resalta estudios toxicológicos e incluido el perfil

genotóxico con el fin de identificar riesgos posibles de mutaciones o carcinogénesis de dichas especies vegetales, ya que el ADN es una macromolécula que de su integridad es fundamental para el bienestar del cuerpo humano³.

En la investigación de drogas vegetales y productos extractivos, se avalúan la calidad, eficacia y seguridad, con respecto a la seguridad, previamente se debe tener establecidos los aspectos de calidad como la composición química y la eficacia. Por ello, el estudio debe fundamentarse en evidencia de calidad y eficacia en combinación de droga vegetales como la presencia de metabolitos secundarios, en el trabajo de investigación presentado, la corteza de *Cinchona* spp., hojas de *Eucalyptus globulus* y del rizoma *Zingiber officinale*, son utilizadas de manera tradicional, en algunos casos de manera conjuntamente, omitiendo los posibles efectos nocivos que pueda conllevar; motivo por el que, este trabajo de investigación se ha enfocado en evaluar si la combinación del extracto mixto presentará algún tipo de reacción sobre el ADN aislado de *Escherichia coli*.

Por ello, se ha planteado los siguientes objetivos:

Objetivo general

Determinar la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico mixto de corteza de *Cinchona* spp., hojas de *Eucalyptus globulus* y del rizoma *Zingiber officinale* frente al ADN genómico de *Escherichia coli*.

Objetivos específicos

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico mixto de la corteza de *Cinchona* spp., hojas de *Eucalyptus globulus* y del rizoma *Zingiber officinale*.
- Evaluar la genotoxicidad *in vitro* del extracto mixto de la corteza de *Cinchona* spp., hojas de *Eucalyptus globulus* y del rizoma *Zingiber officinale*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

2.1.1. Internacional

Al-Harbi L, et al⁴. En el 2022 en Arabia Saudita, estudiaron el efecto de las nanopartículas de óxido de hierro cargadas con fitoquímicos obtenidas de *Cinchona officinalis*, con capacidad de inducir la citotoxicidad y estimular la apoptosis en células de cáncer de mama humano (MCF-7), estudio desarrollado en Darfur - Sudán. Tuvieron como objetivo sintetizar nanopartículas de óxido de hierro cargadas con quinina y extracto de corteza de tallo de *Cinchona officinalis* (corteza peruana) rica en alcaloides, y evaluar más a fondo su efecto citotóxico y mecanismos de apoptosis en células de cáncer de mama MCF-7. Se utilizó un método mediante el análisis de citotoxicidad *in vitro*, las nanopartículas de óxido de hierro cargadas con extracto (CO-NP) se llevaron a cabo utilizando la prueba MTT durante 24 h y 48 h. Reportaron como resultado que los CO-NP redujeron la viabilidad de las células MCF-7 con IC₅₀ valores de 16,2 y 9 µg/mL en 24 h y 48 h, respectivamente, además, las CO-NP se probaron con hMSC normales para determinar su toxicidad y no encontramos una citotoxicidad notable. Concluyeron que el mayor potencial citotóxico del extracto de corteza de tallo de *Cinchona officinalis* cargado con CO -NP obtuvo mejor efecto citotóxico.

Hu Z, et al⁵. En el 2014 en China, realizaron la evaluación de la toxicidad aguda y sub crónica, así como su respectiva evaluación de la farmacología de seguridad de las emulsiones de agua y aceite del eucalipto; estudio desarrollado en China. Tuvieron como objetivo principal evaluar la toxicidad oral aguda (LD₅₀), se siguió un método *in vivo*, empleando ratas machos, divididos en sub grupos, donde si el animal sobrevivía, se aumentaba la dosis del siguiente animal; si el animal moría, se disminuía la dosis para el siguiente animal. Se formaron cinco grupos

experimentales con 10 ratas cada uno, que contenían un número igual de machos y hembras. Los cinco grupos fueron tratados con emulsión de aceite de eucalipto en agua (EOE), a dosis de 2772, 3267, 3960, 4752 y 5742 mg/kg y el estudio de toxicidad subcrónica consumieron una dosis diaria de 0 (Grupo II, emulsionante y agua destilada), 396 (Grupo III, 4% EAE), 792 (Grupo IV, 8% EAE), 1188 (Grupo V, 12% EAE) mg/kg durante 30 días consecutivos. Obtuvieron como resultado, la toxicidad aguda mostró la LD₅₀ de EAE fue de 3811,5 mg/kg. El estudio de toxicidad subcrónica sugirió que las dosis altas y medias de EAE ralentizaban el crecimiento de las ratas macho. La patología clínica mostró que la dosis alta y media de EOE podría causar daño al hígado y al riñón. Concluyeron que el valor LD₅₀ de EOE por vía oral fue de 3811,5 mg/kg, lo que indica que EOE es un fármaco de baja toxicidad.

Khazraei H, et al⁶. En el 2022 en Irán, respecto a la citotoxicidad *in vitro* y también el ensayo apoptótico del aceite esencia de *Eucalyptus globulus*, en líneas celulares de cáncer de colon e hígado; tuvieron el objetivo evaluar el efecto anticancerígeno del aceite esencial; estudio desarrollado en Nigeria. Se siguió un método *in vitro*, donde la citotoxicidad del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* se evaluó en la línea celular de cáncer de colon SW48, la línea celular de cáncer de hígado HepG2, HEK293t y fibroblastos de piel mediante el ensayo MTT. Utilizamos 5-FU como tratamiento de control para el cáncer. Reportaron como resultado que el aceite esencial de eucalipto a concentración de 0,01 % no redujo la viabilidad celular de SW48 (IC₅₀ = 0,2 %) y las células de fibroblastos (IC₅₀ = 5 %) después de un período de tratamiento de 48 horas, asimismo, tampoco mostró ningún efecto tóxico en las líneas celulares HEK_{293t} y HEPG₂, excepto en dosis altas (0,5 %) con IC₅₀ = 0,2 % para ambas líneas celulares, lo que indicaría que el aceite esencial de eucalipto mostró algunos efectos secundarios y es posible que no sea seguro usarlo para el tratamiento en dosis altas (0,5 % y 5 %). Concluyeron que el aceite esencial de eucalipto suprimió la proliferación de células de cáncer de colon humano al inducir la apoptosis.

Sulaiman F. et al⁷. En el 2014 en Nigeria, evaluaron el potencial antimicrobiano y tóxico a partir de los extractos acuosos en *Allium sativum*, *Hibiscus sabdariffa* y *Zingiber officinale* en ratas Wistar, el trabajo fue realizado en la Universidad de Llorin en Nigeria. Se realizó una extracción acuosa a partir de las muestras, para la susceptibilidad bacteriana se siguió el método de difusión en pozos de agar, para el tratamiento en animales se diseñó cinco grupos de tres, un control, un

grupo recibió solo agua destilada, mientras que el resto recibió el extracto a 10mg/kg de extracto de cada especie vegetal en estudio, se midieron parámetros bioquímicos como de la alanina transaminasa (ALT), aspartato transaminasa (AST) y fosfatasa (ALP). Reportaron como resultado se obtuvo que para el *Z. officinale* presentó susceptibilidad para *P. aeruginosa* y *S. aureus*; por otro lado, la administración de los extractos acuosos aumentó significativamente la actividad de las AST, ALT. Concluyeron que los extractos acuosos de las plantas presentaron actividad antimicrobiana y presentaron poseer potencial tóxico debido a la alteración de los parámetros bioquímicos en los tejidos vegetales.

Vaz M, et al⁸. En el 2022 en Brasil, realizaron una investigación del aceite esencial de *Zingiber officinale*, con el fin de desarrollar nuevos agentes antimicrobianos, para lo cual Se obtuvieron rizomas frescos de *Z. officinale* de productores locales en el municipio de Morretes (Paraná, Brasil). Desarrollaron un método *in vitro*, para lo cual se obtuvo el aceite por hidrodestilación utilizando el aparato Clevenger, para la medición de la actividad antimicrobiana se procedió contra 18 bacterias gramnegativas y se midió valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de manera *in vitro*, mientras que para el ensayo antimicrobiana *in vivo* se utilizó ocho ratones a quién se le administró *K. pneumoniae* y finalmente para el ensayo de toxicidad aguda se administró el aceite esencial a un animal. Reportaron como resultado que el aceite esencial del *Z. officinale* mostró actividad antibacteriana contra bacterias gramnegativas 18 MDR, con valores de CIM que oscilaron entre 0,28 mg/ml y 1,09 mg/ml, mientras que para el ensayo *in vivo* el aceite esencial aumentó la supervivencia de los ratones infectados en comparación a los ratones del grupo control. Concluyeron que el aceite esencial de *Z. officinale* mostró potencial *in vitro* contra *K. pneumoniae* y *S. marcescens* resistentes a carbapenems y polimixina.

Ríos E, et al¹⁰. En el 2021 en México, evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos de *Z. officinale* y *M. pomifera* en cepas de *Pseudomona syringae*, estudios desarrollados en México. Se siguió una metodología *in vitro*, para lo cual realizó una extracción por maceración con etanol, metanol y agua; la medición de la actividad antimicrobiana se midió mediante la inhibición de los halos de inhibición de la *Pseudomona syringae*. Reportaron como resultado que la extracción etanólica fue superior, con respecto a la concentración, fue a 100 mg/mL donde se evidenció un mayor diámetro en los halos de inhibición (0.8219 de diámetro). Concluyeron finalmente tanto el extracto etanólico y metanólico,

evidenciaron una inhibición en el desarrollo y crecimiento de *Pseudomona syringae*.

Elkhishin I⁹. En el 2009 en Egipto, realizaron un estudio para evaluar el trabajo es estudiar la toxicidad cardiovascular aguda y subaguda del jengibre en ratas albinas macho adultas y sus posibles mecanismos de acción, desarrollados en Egipto, para la metodología *in vivo* se incluyeron ochenta y cuatro ratas albinas macho adultas para los experimentos de toxicidad aguda y subaguda; todas las ratas recibieron por vía oral en solución salina el jengibre, para la toxicidad aguda recibieron 2500 mg/kg mientras que para la toxicidad subaguda recibieron 50 mg/kg y 500 mg/kg durante 28 días. Reportaron como resultado como resultado que la administración de jengibre en dosis de 50 mg/kg durante 28 días produjo bradicardia con ondulación en las fibras del músculo cardíaco; por otro lado, el jengibre en una dosis de 500 mg/kg produjo hipotensión y bradicardia con cambios degenerativos en el tejido de los miocitos cardíacos. Concluyeron que a una dosis única de 2500 mg/kg de jengibre puede ser tóxica al provocar hipotensión grave y bradicardia.

2.1.2. Nacional

Romero H¹¹. En el 2018 en Lima, realizó el estudio del extracto metanólico de la corteza de *Cinchona officinalis* L., sobre el comportamiento sexual de ratas macho, realizados en la Universidad Inca Garcilaso de la Vega en Lima. Para la dosis letal media (DL₅₀), se utilizaron ratones (22-44g), entre hembras y machos, distribuidos en 6 grupos de 5 ratones cada uno; con respecto al efecto en el comportamiento sexual se utilizaron ratas machos (250-350g), distribuidos en cinco grupos de 6 ratas, donde después de la extracción metanólica a partir de la corteza de *C. officinalis* L., se administró fue por vía oral a una dosis máxima de 4g/kg. Reportó como resultado que el extracto metanólico presenta una DL 50 superior a 4000 mg/kg. Concluyó que la corteza de *C. officinalis* L., en una extracción metanólica posee un efecto sobre la actividad sexual.

Chilón V, et al.¹², en el 2018, Lima, realizaron una investigación para evaluar la toxicidad oral aguda a partir del extracto etanólico hojas de *E: globulus* Labill., *M. citrifolia* L. “noni”, *Peperomia glauca* “pino”, *Schinus molle* L. “molle” y *Zea mays* L. “máiz morado”, en ratones BALB/c 53. Se utilizó un método *in vivo*, se emplearon 60 ratones machos distribuidos en seis grupos de acuerdo al extracto etanólico de cada especie vegetal, adicionalmente un grupo control. Los grupos conformados recibieron una dosis única de 2000 mg/kg (vía oral) de extracto

etanólico, y al grupo control se le administró polisorbato 2 mL/kg (3%). Reportaron como resultado que algunos signos como excitación, inquietud y fotosensibilidad aparente en el grupo eucalipto, alrededor de una hora; también leucopenia (congona, maíz morado, eucalipto y molle); trombocitopenia (molle y eucalipto); aumento de la ALT (eucalipto y congona), comparado con el grupo control. Concluyeron que en condiciones laboratorio, no se logró identificar signos de toxicidad o en la prueba; por otro lado, se obtuvo que el DL₅₀ de todos los extractos fue mayor a 2000 mg/kg.

Aranda et al.¹³, en el 2018, Lima, realizaron una evaluación de la bioactividad de plantas medicinales cultivadas en Perú, usando la metodología sobre la letalidad en *Artemia salina*, con la determinación de la concentración letal media (CL₅₀); estudios desarrollados en Perú. Se empleó una metodología *in vivo*. Reportaron como resultado que los diferentes extractos del rizoma de *C. longa* mostraron una potente actividad citotóxica, con CL₅₀ entre 20,67 ± 7,04 y 98,14 ± 2,64 ug/mL. Los extractos de *Zingiber officinale* (rizoma), *Physalis angulata* (frutos) y *Physalis angulata* (planta entera), evidenciaron actividad citotóxica con CL₅₀ de 87,15 ± 18,17, 323,48 ± 18,85 y 328,92 ± 23,08 ug/mL, respectivamente. Concluyeron que la actividad citotóxica en el extracto de rizomas *Zingiber officinale* y *Curcuma longa*.

Ahón K¹⁴, En el 2021 en Lima, evaluaron el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Zingiber officinale* sobre la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; estudios desarrollados en Perú. Se desarrolló un estudio *in vitro*, para lo cual el aceite esencial fue obtenido por destilación por arrastre de vapor de agua; se diluyó en Tween 80 (0.1%) para obtener soluciones de 5, 10, 15 y 20%. En la prueba de sensibilidad se utilizó *Staphylococcus aureus*, para el cual se empleó agar Kirby Bauer, el efecto antibacteriano fue determinado mediante el halo de inhibición. Reportaron como resultado de los halos de inhibición de 9,1; 12; 14,1 y 16 mm para concentraciones de 5; 10; 15 y 20%, demostrando la inhibición del crecimiento fue directamente proporcional a la concentración. Concluyeron que el aceite esencial de *Z. officinale* tiene actividad antibacteriana.

2.1.3. Local

Estudios locales sobre genotoxicidad de *Zingiber officinale* “jenjibre”, no fueron encontradas, sin embargo, la metodología aplicada en otras especies vegetales evidencias resultados relevantes en temas de genotoxicidad a nivel local.

Beizaga G¹⁵, en el 2020, determinó la genotoxicidad *in vitro* a partir de los extractos hidroalcohólicos de tallos y hojas de *Artemisia absinthium* L. “ajeno”, sobre el ADN de *E. coli* y ADN de humano. El método fue *in vitro*, para lo cual se realizó una extracción hidroalcohólica de tallos y hojas (maceración, etanol: agua (3:1)). Se utilizó el “Método Tomasevich”. Reportó como resultado que, a concentraciones de 300, 400 y 500 mg/mL (extracto de hojas), fragmentaron más del 95% del ADN humano (genómico); asimismo, el extracto de tallos evidenció fragmentación a concentraciones superior a 200 mg/mL; por otro lado, a concentraciones de 25 - 500 mg/mL evidenciaron una fragmentación mayor a 95% del ADN de *E. coli*; en cambio, el extracto que se obtuvo de tallos evidenció fragmentación a concentraciones por encima del 10 mg/mL. Concluyó que los extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de tallos y hojas de “ajeno”, manifiestan una actividad genotóxica *in vitro* sobre el ADN de *E. coli* y el ADN genómico humano.

Marca P¹⁶. En el 2018, evaluó preliminarmente el grado de genotoxicidad (*in vitro*) a partir del zumo y extracto etanólico de *Allium sativum* L. “ajo”. El método fue *in vitro*, para lo cual se realizó una extracción hidroalcohólica etanólica (96°) obtenido por maceración (5 días); el extracto se expuso a ADN de *Staphylococcus* sp. y la genotoxicidad (*in vitro*) fue evaluado por el “método Tomasevich”, se prepararon soluciones de (5 - 500mg/mL), los cuales no mostraron daño genotóxico sobre el ADN de *Staphylococcus* sp.; sin embargo, el zumo de ajo (del bulbo). Reportó como resultado un efecto genotóxico potente (5, 10, 50 y 100%). Concluyó que el zumo obtenido del bulbo de “ajo”, evidencia un alto efecto genotóxico sobre el ADN *Staphylococcus* sp.

Ataucusi V¹⁷. En el año 2020, evaluó la actividad genotóxica (*in vitro*), a partir del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Clinopodium brevicallix* Epl. “urqu muña”, evaluado en ADN genómico del humano. El método fue *in vitro*, se realizó una extracción hidroalcohólica por maceración de *Clinopodium brevicallix* (EHCB), se utilizó una metodología espectrofotométrica para la cuantificación del ADN del genoma humano. Reportó como resultado se evidenció a partir de 200 mg/mL se evidenció un grado de fragmentación del ADN genómico de humanos, donde esta fragmentación fue dependiente al extracto tallos y hojas. Concluyó que existe daño genotóxico EHCB sobre el ADN genómico humano, el cual fue proporcional a la concentración.

2.2. Aspectos botánicos

2.2.1. *Cinchona* spp.

- **Clasificación taxonómica**

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	RUBIALES
FAMILIA	:	RUBIACEAE
GÉNERO	:	<i>Cinchona</i>
ESPECIE	:	<i>Cinchona</i> spp
NOMBRE VULGAR:	:	“quina”

Fuente: Certificado emitido por la bióloga Laura Aucasime Medina. (Anexo 1)

- **Sinónimos**

La especie vegetal *Cinchona* spp L., presenta varias sinonimias¹⁸, entre las más sobresalientes tenemos:

- *Cascarilla officinalis* (L.) Ruiz
- *Cinchona academica* Guibourt
- *Cinchona amygdalifolia* Wedd.
- *Cinchona boliviana* Boda.
- *Cinchona bonplandiana* Klotzsch

- **Descripción botánica**

Árbol (11-15 m) de altura, diámetro (30-40 cm) de diámetro; ramificación (simpodial); copa de tipo globosa, densa, de corteza marrón (externamente); fisurada. Su corteza interna es blanca y arenoso, fácilmente oxidable en presencia de aire. Hojas opuestas, simples y decusadas; ápice agudo, obtuso y acuminado; de base con forma obtusa; un borde sinuado y entero. La forma de sus hojas es oblonga, pinnatinervia, presenta haz glabro, pubescente, el envés con escasa pubescencia, ceroso, con estípulas caducas y aovadas. Flores dispuestas en panículas (20 a 25 cm), pubescentes; son actinomorfas y hermafroditas; de cáliz de tipo gamosépalo, cilíndrico, de 5 pequeños lóbulos; corola de color roja-blanco, de pétalos ligeramente fundidos. Fruto cápsula (marrón), elipsoide (0.8-2.5 cm x 0.4-0.8 cm), dehiscente. Semilla forma fusiforme, redondeada con un ala membranosa (0.3-0.8 cm)¹⁹.

- **Distribución geográfica**

El árbol de quina (cascarilla), oriundo de valles andinos generalmente en Sudamérica, adaptados a 1 000 - 3 500 msnm, encontrados en países en Venezuela Colombia, Bolivia y Perú, mientras que también hay menciones que se ha encontrado especies a 700 - 2 900 msnm.²⁰ . Existe centros de diversidad de *Cinchona*, la cual destaca la de Amotape – Huancabamba, se extendiéndose de este - oeste por la cordillera nor-andina de la zona geográfica peruana, que también abarca departamentos de Cajamarca y Piura²¹.

- **Propiedades y usos medicinales**

Los alcaloides del género *Cinchona* más conocidos y estudiados son cuatro: quinina, quinidina, chinchonidina y cinconina, siendo la quinidina el que tiene una importancia por su actividad antimalárica, esta se obtiene de la corteza de *Cinchona spp* L., la quinidina presenta un mecanismo de acción sobre la malaria por su alta capacidad para inhibir la reproducción y crecimiento del *Plasmodium*, la quinina cuenta con la capacidad antifebril en la malaria²⁰.

- **Composición química**

Los alcaloides tienen un interés antimalárico, entre las que resalta la cloraquina, quinacrina y hidroxicloraquina. La hidroxicloraquina y cloroquina pertenecen al grupo de las 4-aminoquinolinas, diferenciándose en una sustitución de un radical etilo por un radical hidroxilo²². En medicina tradicional se ha reportado que se utiliza como tónico amargo para malestares estomacales. Otros reportes han indicado que existen otros alcaloides en el tallo como de tipo quinolina, como la quinidina, quinina, cinconidina y cinconina, asimismo, hay evidencia de haberse identificado taninos y cantidades pequeñas de antraquinonas²³.

2.2.2. *Eucalyptus globulus* Labill

- **Clasificación taxonómica**

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	MYRTALES
FAMILIA	:	MYRTACEAE
GÉNERO	:	<i>Eucalyptus</i>
ESPECIE	:	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill
NOMBRE VULGAR	:	“eucalipto”

Fuente: Certificado emitido por la bióloga Laura Aucasime Medina. (Anexo 2)

- **Descripción botánica**

Son árboles de tipo perenne, presenta una corteza exterior llamado ritidoma de coloración marrón claro con desprendimiento de tiras, su corteza interior es lisa. Hojas jóvenes son de tipo sésiles, grisáceas y ovaladas, posteriormente se alargan cambiando a ser coriáceas de coloración verde azulado (hojas adultas), presenta con alto contenido de aceite esencial, aroma balsámico. Flores de color blanco y solitarias, de cáliz y corona unidos por una tapadera cubriendo estambres y pistilo (de aquí sale el nombre de eu-kalypto, que significa "bien cubierto"), puesto que se abre, liberando una multitud de estambres amarillos. Frutos cápsulas de una coloración negra, de una tapa gris media azulada, estas contienen a las semillas en gran cantidad²⁴.

- **Propiedades y usos medicinales**

Las hojas del eucalipto son las más utilizadas como en vaporización de agua, preparación de infusiones, jarabes; esto debe a que hay evidencias de que las hojas presenta actividades descongestionantes (problemas respiratorios) y desinfectantes²⁵. Las hojas de la etapa adulta, al estar expuesto con el aire, inducen la formación de ozono el cual presenta características antimicrobianas, como también induce el mejor funcionamiento de nuestro sistema inmune, es antiinflamatorio y analgésico; otras personas lo han utilizados por sus propiedades expectorantes, antifebril, antisépticas, hipoglucemiante, fungicidas y bactericidas; con respecto a la corteza hay evidencia de que se puede utilizar para problemas de la difteria, puesto que presenta taninos en su composición química, estos presentan un efecto constringente, antiinflamatorio sobre todo en órganos como la vejiga²⁶.

- **Composición química**

E. globulus se han caracterizado diversos aceites esenciales entre las que destaca el eucaliptol (1,8-cineol), encontrándose de 70 a 85%, entre otros compuestos tenemos al limoneno, terpineol, p-cimeno, α y β -pineno, canfeno, D-limoneno y entre monoterpenos, aldehídos (mirtenal), cetonas (corvona), sesquiterpenos como aromadendreno, globulol, compuestos fenólicos (ácido gálico, ferúlico, protocatequico, glucogálico, dihidrobenzoico, cumaroilquínico, epigalocatequina, derivados de apigenina, derivados del ácido elágico, derivados de la quercetina, kaempferol, hidroxicinámico²⁷.

2.2.3. *Zingiber officinale*

- **Clasificación taxonómica**

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	LILIOPSIDA
SUB CLASE	:	LILIOPSIDAE
ORDEN	:	ZINGIBERALES
FAMILIA	:	ZINGIBERACEAE
GÉNERO	:	<i>Zingiber</i>
ESPECIE	:	<i>Zingiber officinale</i>
NOMBRE VULGAR:		“kión”

Fuente: Certificado emitido por la bióloga Laura Aucasime Medina. (Anexo 3)

- **Descripción botánica**

Especie vegetal herbácea rizomatosa y perenne, 1 m de altura. Rizoma es grueso, nudoso y carnoso. Tallos son simples. Hojas oblongas, lanceoladas, dispuestos en líneas paralelas. Flores amarillas, sésiles y labios purpúreos, dispuestas en espiga. Fruto es seco y valvoso²⁸.

- **Propiedades y usos medicinales**

Le medicina tradicional está indicado como diaforético, antigripal, tónico digestivo, antiemético, antitusivo, expectorante, desintoxicante, edemas, reumatismo, antiinflamatorio, analgesia, cuadros de frío²⁸.

2.3. Ácidos nucleicos

Hay dos tipos: el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ribonucleico (ARN). La denominación es por la presencia de grupos ácidos que derivan del ácido ortofosfórico (H_3PO_4), estas fueron localizadas al inicio en el núcleo de una célula eucariota. Los ácidos nucleicos son considerados polinucleótidos, o sea, moléculas dispuestas poliméricamente conformadas por la secuencia de unidades monoméricas sencillas (mononucleótidos), quienes se mantienen enlazados por un tipo de enlace fosfodiéster o diéster fosfórico²⁹.

2.3.1. Bases nitrogenadas, nucleósidos y nucleótidos

Estos componentes estructurales son derivados de bases nitrogenadas de carácter básico: pirimidina y purina. Bases pirimidínicas son timina (T), citosina (C), y uracilo (U); purínicas son guanina (G) y adenina (A), derivando en esencia por la sustitución de átomos de hidrógeno, reemplazando por radicales hidroxilo o aminas en posiciones diferentes del anillo purínico o pirimidínico, respectivamente²⁹.

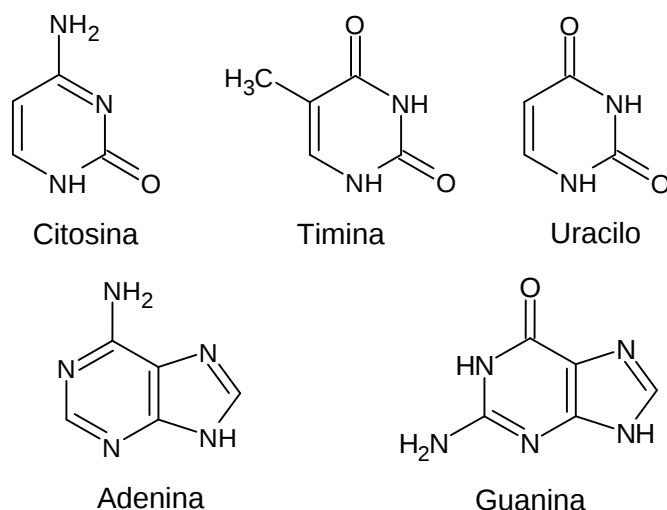


Figura 1. Estructura química de las bases nitrogenadas²⁹.

2.3.2. Estructura

Dispone de una doble hebra, cada hebra consta de una cadena sucesiva de nucleótidos, los cuales a su vez están formados por alternados enlaces covalentes de la unión de un monosacárido (desoxirribosa) y un grupo fosfato; el monosacárido está enlazado con bases nitrogenadas de tipo púricas como la guanina (G) y la adenina; bases pirimidicas como la citosina (C) y timina (T), estas bases nitrogenadas en cada hebra de ADN, forman enlaces puentes de hidrógeno, donde, siendo la interacción de la A y T forman 2 enlaces, mientras que la interacción de C y G forman 3 enlaces puentes de hidrógeno. El número de enlaces de hidrógeno determina la complementariedad específica entre las bases que definen sus enlaces. Sin embargo, la T es reemplazada por uracilo (U) en las moléculas de ácido ribonucleico (ARN). La "columna vertebral" de las dos hebras complementarias de la unidad de "base fosfato-desoxirribosa-nitrógeno" del ADN (llamada nucleótido) tiene un grupo fosfato llamado extremo 5' en un extremo. En el otro extremo hay un grupo hidroxilo llamado 3'. Por lo tanto, las dos "columnas vertebrales" de las bases de desoxirribosa fosfato apuntan en direcciones opuestas, de modo que el extremo 5' siempre mira al extremo 3' a través de los enlaces complementarios de las bases, asegurando la estabilidad de la doble cadena del ADN³⁰.

2.4. Toxicidad y genotoxicidad

2.4.1. Toxicidad

Capacidad de un agente químico (compuesto químico), que es capaz de originar efectos dañinos o nocivos sobre un ser viviente al momento de interactuar con

la sustancia, asimismo, el tóxico también esta considera a toda sustancia, natural o artificial, que tenga carácter tóxico³⁰.

2.4.2. Genotoxicidad

Se conoce como la capacidad literal para generar daño sobre el material genómico por agentes químicos, físicos o biológicos; este daño incluye también a cualquier componente celular que resulta indispensable para la correcta funcionabilidad en relación con los cromosomas en la célula, por ejemplo: interaccionan con las proteínas puesto que estas moléculas son esenciales para condensación, reparación y descondensación en el material genético ADN de los cromosomas, huso mitótico, en la división celular actúa en la distribución del material genético. El daño genético podría resultar carcinogénico o mutagénico, los responsables con conocidos como agentes genotóxicos conocidos también como xenobióticos o tóxicos genéticos. El mecanismo de acción o la capacidad para inducir daño a partir de estos agentes xenobióticos, viene siendo influida directamente por la dosis del tóxico que reciba, asimismo, el tiempo y la vía que manifestó durante la exposición, posteriormente dependerá de la constitución genética del agente vivo quien también determina la susceptibilidad particular³⁰.

2.4.2.1. Mecanismos de genotoxicidad

Estas sustancias se pueden adherir de manera directa sobre el ADN, como también actuar de manera indirecta afectando a las enzimas que tienen una relación en replicación del material genético (ADN), lo que causa mutaciones, en ciertos casos podrían desencadenar un evento canceroso.

Los tóxicos genéticos provocan mutaciones tras generar modificaciones en los nucleótidos:

- Cambios en la disposición de las bases nitrogenadas.
- Generando sustituciones entre bases nitrogenadas, lo que perjudica la traducción durante el ciclo celular.
- Cambios químicos de las bases nitrogenadas (como oxidación o la desaminación).
- Alquilación del material genético, esto implica adición de radicales químicos mediante enlaces de tipo covalente.

Pueden provocar malformaciones conocidas como aberraciones cromosómicas.

- Existe delección, rotura, intercambio, lo que implica la reorganización del material genético, asimismo generar translocaciones.
- Alteraciones en la cantidad del número cromosómico.

A partir de una lesión ocasionada en el ADN, el agente vivo (célula), podría sufrir tres procesos:

- Ya no se puede replicar.
- Existe una replicación, con alteraciones de los nucleótidos, como también errores durante el proceso replicativo, es decir, la mutación es transmitible.
- En algunos casos se desarrolla un proceso de reparación del material dañado, logrando evitarse la mutación.

En cuanto a los carcinógenos genotóxicos, son iniciadores de procesos cancerígenos. Comienza con mutaciones en una sola célula y puede ser: a nivel del metabolismo xenobiótico, provocando carcinógenos en la reparación del ADN, dificultándola o previniendo y/o estimulando la proliferación celular; Este proceso se llama cebado. Suelen ser productos químicos como compuestos alquilados (mostaza nitrogenada), especies reactivas de oxígeno, aflatoxinas, productos de combustión, nitrosaminas, etc. Su mecanismo de acción se basa en la formación de un enlace covalente con el nitrógeno 7 de la guanina (aducto), dando lugar a mutaciones irreversibles. Algunas de sus características son:

Todas las dosis son efectivas y no existe una dosis umbral mínima a partir de la cual se puedan evaluar los efectos. Tienen correlaciones estructura-actividad que pueden demostrarse mediante pruebas experimentales. La mayoría están clasificados como cancerígenos, es decir, requieren biotransformación para reaccionar con el ADN, lo que puede ocurrir en el primer y segundo paso del metabolismo. Aquí podemos encontrar: hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas, micotoxinas, etc.

2.4.2.2. Evaluación de genotoxicidad

La genética toxicológica estudia los efectos mutagénicos de los productos químicos y la radiación y los efectos de la exposición a sustancias mutagénicas en la salud humana, teniendo en cuenta todos los factores de las mutaciones genéticas causadas por cambios de uno o mas pares de bases, anomalías estructurales cromosómicas, mutaciones genéticas, intercalación de bases. Esta evaluación debe realizarse mediante pruebas *in vitro* aprobadas internacionalmente para detectar daños a nivel de mutaciones genéticas y cromosómicas en el tipo de tejido del ADN o grado en que el compuesto a evaluar causa daño. Por tanto, se puede dividir en cuatro niveles: mutación genética (nivel I), mutación cromosómica (nivel II), daño primario del ADN (nivel III), transformación celular (nivel IV) y otros cambios. Los métodos de detección

pertenecientes a los dos primeros niveles son diversos y están muy extendidos, especialmente la detección *in vitro*, que se caracteriza por una alta sensibilidad y precisión. En los últimos años, los ensayos que detectan daños a nivel primario del ADN han desempeñado un papel importante en los análisis de genotoxicidad por pérdidas. Una vez evaluados los niveles genéticos y cromosómicos mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, se deben incluir ensayos que midan el daño primario del ADN y se deben tomar decisiones sobre otras alteraciones y carcinogenicidad con base en los resultados. Cualquier examen y evaluación del grado de lesión debe utilizar un protocolo estandarizado (aprobado internacionalmente) con respecto a la dosis, la vía de exposición y la administración recomendada del medicamento³¹.

2.4.3. Ensayo del cometa

La electroforesis alcalina unicelular o ensayo cometa es una técnica útil para estudiar el daño y la reparación del ADN, en este método, se suspende una pequeña cantidad de células en un gel delgado de agarosa de bajo punto de fusión sobre un portaobjetos de vidrio (para que las células vivas no queden expuestas a temperaturas fisiológicas extremas), se lisan, se someten a electroforesis y se analizan utilizando luces fluorescentes que se alternan con el ADN, se utiliza como tinte (bromuro de etidio) células de tejido. Las células más grandes muestran una mayor migración de ADN fragmentado, que es producto del daño celular o del funcionamiento de mecanismos de reparación que promueven la producción de oligonucleótidos (NER). Los fragmentos migran al ánodo de la placa, en el que está suspendido el gel de agarosa, y aparecen como la cola de un cometa cuando se visualizan. Las ventajas del ensayo del cometa incluyen simplicidad, ahorro de tiempo, sensibilidad para la detección de daños en el ADN, análisis de datos a nivel de una sola célula, uso de muestras de células pequeñas, costo relativamente bajo y amplia aplicación en estudios de genotoxicidad *in vitro* e *in vivo*. La capacidad de prácticamente cualquier población de células eucariotas³². Una modificación del "ensayo Comet" para la evaluación de la genotoxicidad es el "método Tomasevich", que se utiliza para determinar *in vitro* los efectos genotóxicos de plantas medicinales y/o productos fitoterapéuticos sobre el ADN genómico. ¿Esto indica qué órganos vegetales deben conocerse primero? Si quieres estudiar el látex, lo mejor es obtenerlo directamente de las plantas.

2.4.4. Electroforesis en gel agarosa

Es uno de los métodos más utilizados para el análisis y caracterización de ácidos nucleicos de diversas fuentes. De esta forma, las moléculas de ADN migrarán de

forma diferente en el gel de agarosa mediante electroforesis. De manera similar, el tamaño del ADN se puede calcular utilizando marcadores de peso molecular (fragmentos de ADN de tamaño conocido). Para comprobar el progreso de la separación molecular, estas moléculas de la matriz deben teñirse con diferentes tintes, creando un modelo de los fragmentos. Estos procedimientos facilitan la visualización de separaciones moleculares como bandas simples que serán analizadas e interpretadas más adelante. En la electroforesis horizontal se suele trabajar con ADN o ARN, mientras que con la electroforesis vertical se analizan moléculas de ADN y proteínas. El análisis de proteínas y también la electroforesis de campo pulsado se utilizan a menudo para separar fragmentos muy grandes de ADN genómico. En particular, la combinación con otras tecnologías como la PCR y la hibridación ha ayudado mucho en el ámbito de la salud. Mediante esta tecnología es posible visualizar las bandas de ARN o ADN de patógenos, visualizar nuevas proteínas, mutaciones o detectar cambios a nivel genético, etc. Una modificación del “ensayo Comet” para la evaluación de la genotoxicidad es el “método Tomasevich”, esta prueba fue desarrollada por Miranda¹⁰ para determinar in vitro los efectos genotóxicos de plantas medicinales y/o productos fitoterapéuticos sobre el ADN genómico. ¿Esto indica qué órganos vegetales deben conocerse primero? Si quieres estudiar el látex, lo mejor es obtenerlo directamente de las plantas^{17,33,34}.

2.5. Espectrofotometría

Es una técnica analítica que permite determinar la concentración de una sustancia en una solución, esto se basa puesto que las moléculas logran absorber radiaciones electromagnéticas, a su vez también dependerá de la capacidad de luz que absorbe. Para lo cual se utiliza tipo de longitud de onda donde la sustancia ha presentado una mayor cantidad absorbancia durante el barrido espectral.³⁵

“La capacidad que tiene el ADN de absorber luz a una determinada longitud de onda ($\lambda = 260\text{nm}$) que permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos de la muestra, si la densidad óptica (OD) es 1, corresponde a aproximadamente 50ug/ml de la cadena de ADN, entonces calculamos la concentración de ADN que tenemos en nuestras muestras, midiendo su absorbancia sin necesidad de una curva patrón”³⁶.

“El cálculo se da entre las lecturas a 260nm y 280nm para hacer un estimado de la pureza o evaluar la contaminación de la preparación del ADN. 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 la espectrofotometría. Las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 (principalmente por residuos de triptófano), así la lectura muestra algún contaminante proteico³⁶.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

La presente investigación se desarrolló en los siguientes recintos:

- En el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNSCH, se realizó la marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico mixto de las tres especies en estudio.
- En el “Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática” (CIBMB) de la Facultad de Ciencias Biológicas, se realizó la obtención del ADN genómico de *Escherichia coli* y los ensayos de genotoxicidad.

3.2. Definición de la población y muestra

3.2.1. Población

Estuvo conformada por las plantas aparentemente sanas de *Cinchona* spp “quina” y *Zingiber officinale* “kión”, que crecen en zonas aledañas de la comunidad de San Cristóbal, Samugari, La Mar de Ayacucho; de *Eucalyptus globulus* “eucalipto”, que crecen en las zonas aledañas al distrito de Quinoa, provincia de Huamanga en Ayacucho.

3.2.2. Muestra

Un kilo de corteza *Cinchona* spp., y un kg de rizomas *Zingiber officinale* recolectadas en zonas aledañas de la comunidad de San Cristóbal, Samugari, La Mar de Ayacucho y un kg hojas de *Eucalyptus globulus* fueron recolectadas en los lugares aledaños al distrito de Quinoa, provincia de Huamanga en Ayacucho.

3.2.3. Unidad de análisis

Para el ensayo de contará con stock de 1500 ng/μL ADN de genómico de *Escherichia coli*.

3.3. Procedimiento para la recolección de datos

3.3.1.Recolección y secado de la muestra vegetal

Corteza de *Cinchona* spp., hojas de *Eucalyptus globulus* y rizoma de *Zingiber officinale*, se procedió a recolectar en horas de la mañana, para luego llevar al Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias de la Salud, y al “Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática” de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH.

3.3.2.Elaboración de extracto hidroalcohólico mixto

Previo desecación en sombra de la corteza de “quina”, las hojas del “eucalipto” y los rizomas del “kión”, se procedió con la reducción del tamaño de partículas utilizando un mortero pre esterilizado hasta obtener un polvo fino. Se pesó 100 gramos de muestra de polvo seco de cada especie vegetal medicinal y éstas tres se depositaron en una botella de vidrio ámbar, agregando luego un 1.5 L de solución etanol 96° : agua (3 : 1), para macerarlo a lo largo de 7 días agitando la botella 2 veces al día durante 15 min facilitando que la solución del solvente se distribuye uniformemente en la muestra. Transcurrido este periodo se pasó por papel filtro, obtenido el filtrado se llevó al evaporador rotatorio Buchi-3000, luego se concentró en incubadora Memmert a 37°C. A partir de este concentrado se realizó los ensayos fitoquímicos y las pruebas de genotoxicidad.

3.3.3.Identificación fitoquímica

Miranda (2002)³⁷, describe los pasos para realizar el tamizaje fitoquímico con el finde identificar a cada metabolito secundario presentes en la muestra del extracto. Anexo 6.

3.3.4.Extracción de ADN genómico a partir de *Escherichia coli*

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

- Se ha vertido 400 µL de buffer TE 1X a un tubo eppendorf, para transferir 100 mg aproximadamente del cultivo joven de *Escherichia coli*, este tubo se incubó en baño María a 85° C durante 25 minutos.
- Se agregó lisozima (10 mg/mL) en volumen de 60 µL e incubó a 37° C durante 2 horas en baño María.
- La mezcla de SDS/proteinasa K (75 µL SDS 10% + 5 µL PK 10 mg/mL) fue vertida en el tubo e incubó por 15 minutos a 65° C.

- Se añadió 100 µL NaCl 5 M más 5 µL de CTAB (N-cetil-N, N,N-Trimetil bromuro de amonio) e incubó a 65° C durante otros 15 minutos más.
- La mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) en volumen de 750 µL, fue vertida al tubo y homogenizó agitando suavemente, para luego centrifugar 15 minutos a 14 000 rpm.
- Luego de la centrifugación se formaron dos capas, trasvasando el sobrenadante a otro tubo eppendorf.
- Se adicionó 600 µL isopropanol frío al 100%, luego se incubó a temperatura de -20° C durante toda la noche.
- Posteriormente se procedió a centrifugar a 14 000 rpm durante 15 minutos, luego descartar el sobrenadante.
- Se lavó el sedimento con 1 mL de etanol (70%) agitando suavemente y volvió a centrifugar a 14 000 rpm durante 10 min.
- Se eliminó el sobrenadante y luego se rehidrató el sedimento con 50 µL de agua bidestilada estéril.
- Añadiendo 1 µL ARNasa (20 mg/µL) se incubó a 37°C por 1 hora en baño María.
- Se procedió a guardar el ADN obtenido a – 20 °C hasta su posterior análisis.

3.3.5. Prueba de genotoxicidad “*in vitro*”

Se desarrolló siguiendo el “método Tomasevich” (ensayo cometa modificado) propuesto por Miranda³⁸, el cual consta de las siguientes fases.

Etapas de la preparación y cuantificación de stock (ADN genómico), para el ensayo

Por espectrofotometría UV, fue cuantificado el ADN genómico de *Escherichia coli*, preparando luego el stock de 1 500 ng/µL, volumen final de 200 µL, éste tubo para cada ensayo³⁸.

Fase de ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de la corteza de *Cinchona spp*, hojas de *Eucalyptus globulus* y zumo de rizoma de *Zingiber officinale*, sobre el ADN genómico del organismo en estudio

Se dispuso de una batería de soluciones del extracto hidroalcohólico mixto de *Cinchona spp.*, *Eucalyptus globulus* y *Zingiber officinale*, con las siguientes concentraciones: 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, cada uno.

Así mismo, se usó como “control negativo” el ADN genómico puro sin tratamiento con el extracto, como “blanco” el extracto hidroalcohólico mixto a la mayor concentración (100 mg/mL) y para el “descarte de nucleasas”, otro tubo con 14 µL

de ADN más 6 μL con extracto hidroalcohólico mixto a 10 mg/mL y 6 μL de la enzima proteinasa K.

Tabla 1. Elaboración de la mezcla para en ensayo de genotoxicidad *in vitro*

Condiciones	Mezclas para el ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>							
N° de tubo	1	2	3	4	5	8 Blanco	7 Control	8 PK
Stock de ADN (1500 ng/ μL)	14	14	14	14	14	-	14	14
Volumen en μL								
Extracto	(mg/mL)	5	10	25	50	100	-	100
	(μL)	0,3	0,6	2,5	3	6	20	6
Proteinasa K		-	-	1,5	-	-	-	6
Agua destilada		5,7	5,4	4,5	3	-	6	-
Volumen total		20	20	20	20	20	20	25

Fuente: elaboración propia.

Una vez preparada estas soluciones en sus respectivos tubos, se llevó ésta batería a incubar durante una hora a 37°C en baño María.

Seguidamente, el gel de agarosa a 1% se dispuso en cámara de electroforesis marca Biometra, cargándose en cada pozo las siguientes mezclas: 2 μL de colorante señalizador de migración más 6 μL de la solución para la prueba de genotoxicidad *in vitro*, resultando volumen final de 8 μL .

Se conectó la cámara de electroforesis al sistema de fuente de poder y programando a 30 V (3 horas).

Etapas de la radiación UV y visualización del efecto genotóxico

El gel de agarosa conteniendo las soluciones procesadas, fue sumergida en solución de bromuro de etidio (BrEt) al 1% (10 minutos), lavado con agua corriente en dos ocasiones, con el fin de visualizar las bandas y/o fragmentos de ADN a causa de la genotoxicidad, se instaló éste gel en radiación de luz UV, dentro del sistema transiluminador, para observar los resultados y registrar las imágenes con cámara fotográfica^{37,39}.

Los productos de los ensayos de genotoxicidad fueron cuantificados visualmente en relación directa a la fluorescencia del bromuro de etidio que emiten las bandas de los ADN que recibieron tratamiento, comparando cada uno de ellos, con la fluorescencia de la banda del ADN “control negativo”, que no ha recibido ningún tratamiento, no se usó ningún software.

Fase de interpretación y clasificación del registro visual de genotoxicidad

Tomando en cuenta la clasificación del “ensayo cometa” propuesto por Speit (1995) y Collins (2004), en tesis de Mónica Marisol Larrea Poma⁴⁰ (Tabla 2), se ha designado los valores numéricos adecuados a los niveles de fragmentación del

ADN como producto de la actividad genotóxica, analizados en el registro fotográfico.

Tabla 2. Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN, clasificados por registro visual

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

Fuente: Larrea Poma M., 2007

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

3.4. Análisis de datos

Todos los datos obtenidos se agruparon para presentar en tablas, evidenciados en las fotografías de los geles de agarosa que contenía los productos. La genotoxicidad se procesó mediante el paquete estadístico SPSS mediante la prueba de Kruskal- Wallis para realizar la medición del porcentaje de fragmentación de más de dos muestras independientes. Se consideró el valor de $p \leq 0,05$, como el nivel estadísticamente significativo⁴⁰.

IV. RESULTADOS

Tabla 3. Identificación de metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico mixto de la corteza de *Cinchona spp.* “quina”, hojas de *Eucalyptus globulus* “eucalipto” y del rizoma *Zingiber officinale* “palillo”.

Metabolitos secundarios	Ensayo	Resultado	Observaciones
Fenoles y/o taninos	FeCl ₃ 1 %	+++	Coloración verde oscura
Taninos	Gelatina 1 %	++	Formación de precipitado.
Flavonoides	Shinoda	+	Coloración melón
	Mayer	+	
Alcaloides	Dragendorff	++	Formación de precipitado.
	Wagner	++	
	Fehling	+++	Formación de precipitado rojo.
Azúcares reductores	Benedict	+++	Formación de precipitado rojo.
Aminoácidos	Ninhidrina	-	Precipitado
Triterpenos y/o esteroides	Lieberman-Buchard	-	
Glicósidos cardiotónicos	Kedde	-	
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	+	Colación rojo marrón.
Saponinas	Espuma	++	Formación de espuma.
Catequinas		++	Manchas de color verde.

Leyenda: (+): leve; (++): moderado; (+++): abundante

Fuente: elaboración propia.

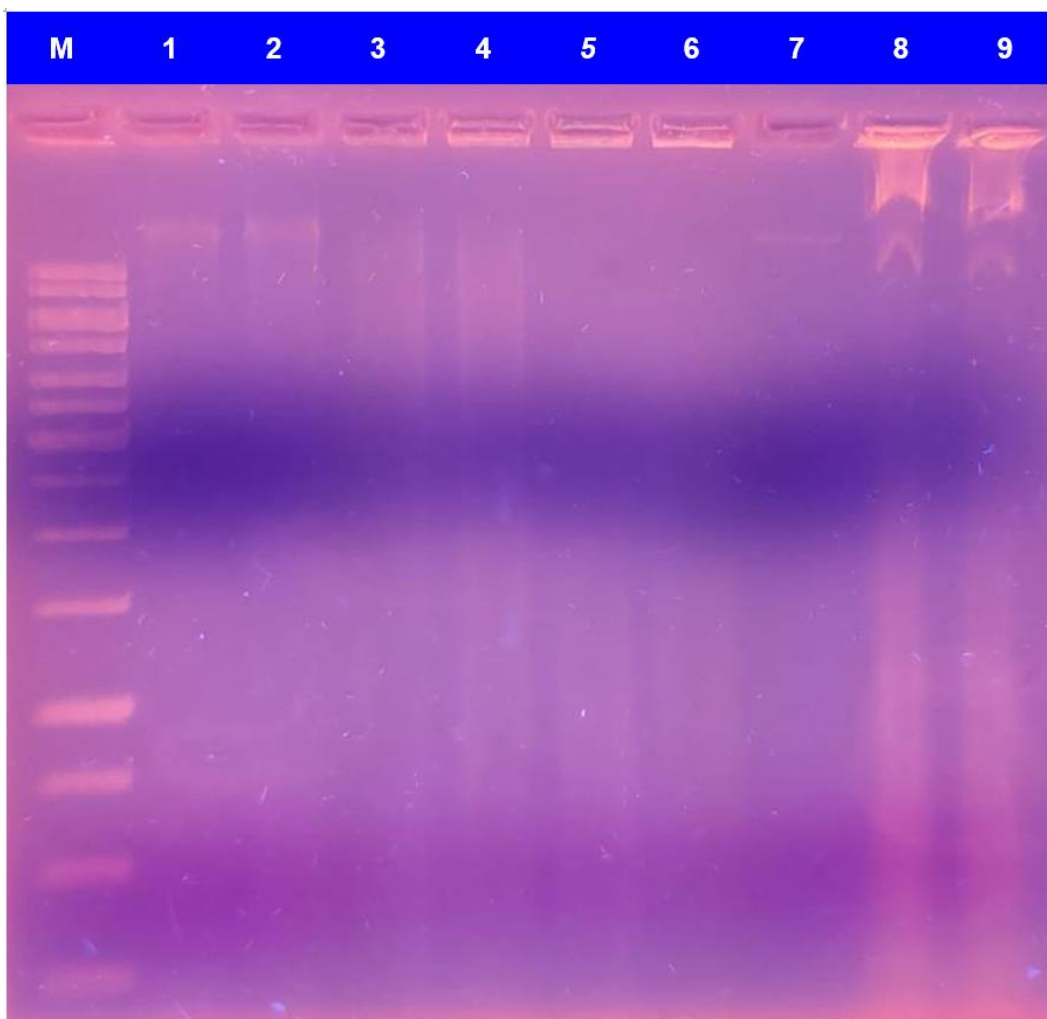


Figura 2. Ensayos de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico mixto de *Cinchona* spp. “quina”, *Eucalyptus globulus* “eucalipto” y *Zingiber officinale* “kion” frente al ADN de *Escherichia coli*.

Leyenda:

Carril M: Marcador de tamaño molecular 1kb (England biolabs)
 Carril N° 1: extracto mixto (5 mg/mL)
 Carril N° 2: extracto mixto (10 mg/mL)
 Carril N° 3: extracto mixto (25 mg/mL)
 Carril N° 4: extracto mixto (50 mg/mL)
 Carril N° 5: extracto mixto (100 mg/mL)
 Carril N° 6: extracto mixto (100 mg/mL), (blanco).
 Carril N° 7: ADN puro (control)
 Carril N° 8: extracto mixto (5 mg/mL) + proteinasa K
 Carril N° 9: extracto mixto (10 mg/mL) + proteinasa K
 Condiciones del sistema de electroforesis: 40 V, 150 min
 Coloración del ADN: bromuro de etidio (1%), 15 min

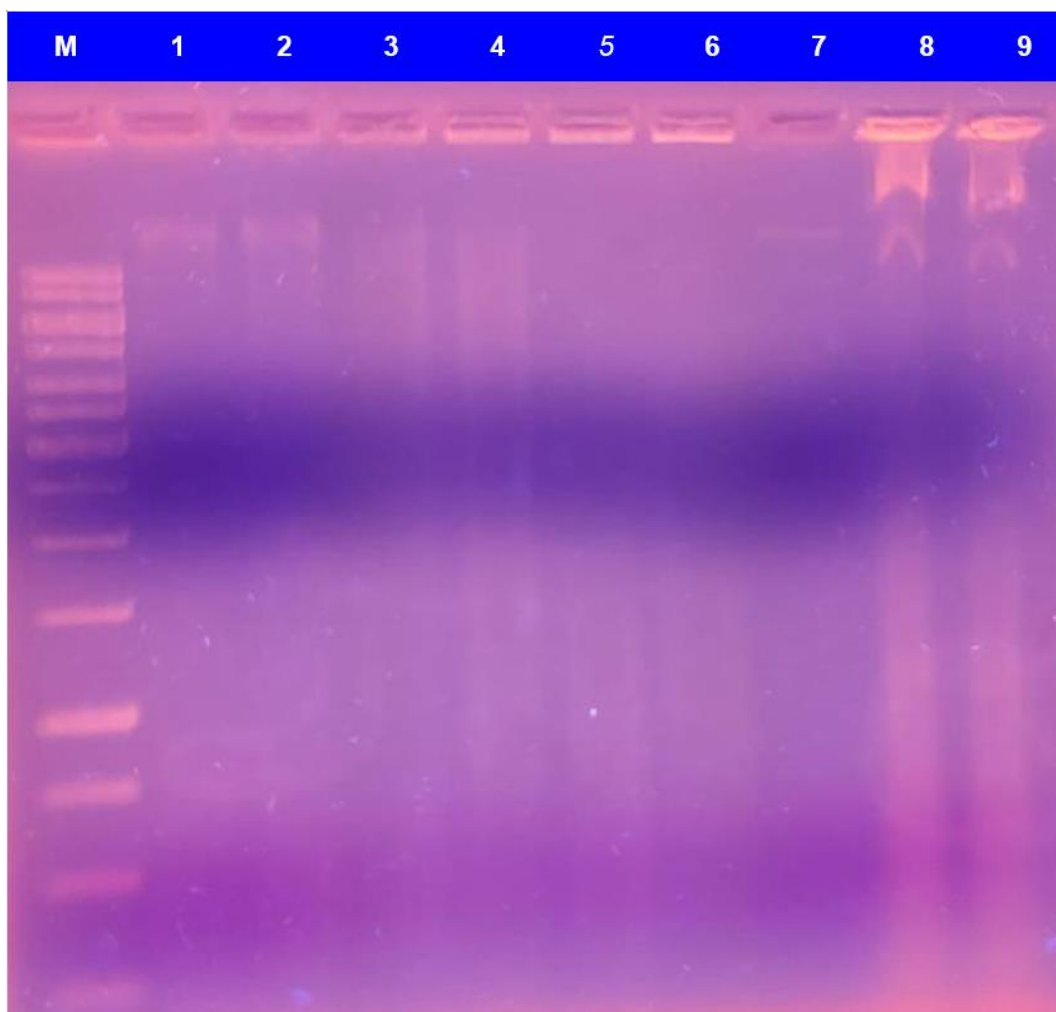


Figura 3. Reproducibilidad del ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico mixto de *Cinchona* spp. “quina”, *Eucalyptus globulus* “eucalipto” y *Zingiber officinale* “kion” frente al ADN de *Escherichia coli*.

Leyenda:

Carril M: Marcador de tamaño molecular 1kb (England biolabs)

Carril N° 1: extracto mixto (5 mg/mL)

Carril N° 2: extracto mixto (10 mg/mL)

Carril N° 3: extracto mixto (25 mg/mL)

Carril N° 4: extracto mixto (50 mg/mL)

Carril N° 5: extracto mixto (100 mg/mL)

Carril N° 6: extracto mixto (100 mg/mL) (blanco).

Carril N° 7: ADN puro (control)

Carril N° 8: extracto mixto (5 mg/mL) + proteinasa K

Carril N° 9: extracto mixto (10 mg/mL) + proteinasa K

Condiciones del sistema de electroforesis: 40 V, 150 min

Coloración del ADN: bromuro de etidio (1%), 15 min

Tabla 4. Valores numéricos del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico mixto de *Cinchona* spp. “quina”, *Eucalyptus globulus* “eucalipto” y *Zyngiber officinale* “kion” frente al ADN de *Escherichia coli* a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, incubado a 37 °C durante una hora.

Condiciones		Niveles de fragmentación				
		Extracto hidroalcohólico mixto.				
Temperatura (°C)	Tiempo (hora)	Concentración en mg/mL				
		5	10	25	50	100
37	1	1	2	3	3	4
		1	2	3	3	4
		1	2	3	3	4
		1	2	3	3	4

Fuente: elaboración propia.

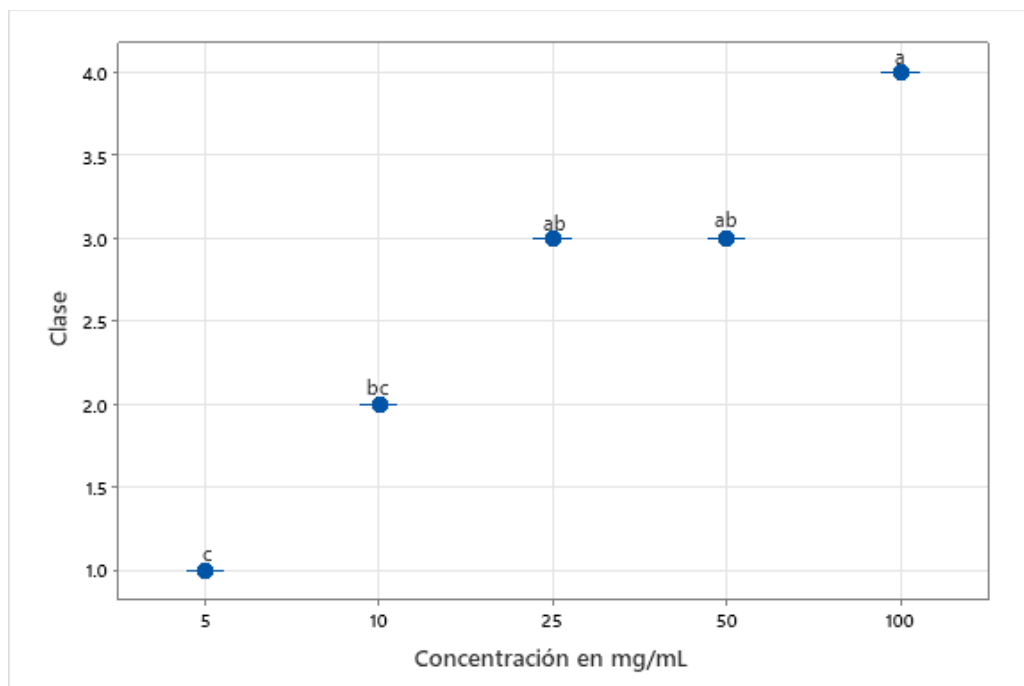


Figura 4. Ensayo de Kruskal-Wallis para la genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico mixto de *Cinchona* spp. “quina”, *Eucalyptus globulus* “eucalipto” y *Zingiber officinale* “kion”, a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, frente al ADN *Escherichia coli*, incubado a 37°C a por el tiempo de una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.

V. DISCUSIÓN

Desde tiempos inmemoriales se han utilizado las plantas por sus propiedades medicinales, este conocimiento fue transmitido a través de generaciones las cuales tuvieron un impacto para el tratamiento de los principales problemas de salud, su uso tradicional de plantas medicinales se manifiesta con mayor énfasis en los pueblos andinos y amazónicos, el uso desmedido de extractos estaría propensos a ser afectado, puesto que, aún no se ha logrado caracterizar los componentes químicos presentes, siendo estos los responsables de las propiedades terapéuticas, como también podrían generar efectos tóxicos.

La tabla 3, reporta que el extracto hidroalcohólico mixto evidencia presencia en abundancia (+++) de compuestos fenólicos y azúcares reductores; presencia moderada (++) de taninos, alcaloides, saponinas y catequinas; presencia leve (+) de flavonoides, lactonas y/o cumarinas. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Shala & Gururani⁴¹, quién a partir de las hojas de *Eucalyptus globulus* L. "eucalipto", ha identificado terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, sobresaliendo los compuestos de ácidos fenólicos y derivados glicosilados, flavonoides y derivados glucosilados; asimismo, Pan et al.⁴², caracterizó compuesto como ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico, ferúlico y cafeico; derivados glicosilados del kaempferol, quercetina y apigenina. En caso de la *Zingiber. officinale* "kion", Shalaby et al.⁴³, ha identificado compuestos fenólicos y flavonoides, azúcares reductores y taninos; asimismo, Tohma et al.⁴⁴, caracterizó a la curcumina, ácido ferúlico, cafeico y siríngico; quercetina. Por otro lado, la *Chinchona spp.*, es una especie vegetal que presentan diversas variedades de alcaloides, tal como menciona Morauer & Ganzera⁴⁵, quien identificó dihidroquinidina, quinina, quinidina, cinconidina y cinconina.

La fotografía en la figura 2, corresponde al ensayo de genotoxicidad *in vitro* de extracto hidroalcohólico mixto de *Cinchona* spp. “quina”, *Eucalyptus globulus* “eucalipto” y *Zingiber officinale* “kion” frente al ADN de *Escherichia coli*. Este gel de agarosa que contiene los productos de los ensayos, al encontrarse dentro del equipo de transiluminador, hace que los fotones de la luz ultravioleta generen la fluorescencia del bromuro de etidio, que, al haberse intercalado entre los pares de bases nitrogenadas del ADN, revela la integridad y concentración de la macromolécula; por tanto, la intensidad de la luz está directamente relacionado a la concentración del ADN; mientras que, si los bordes de las bandas están bien delimitadas denotan que la molécula de ADN se encuentra íntegro, caso contrario nos está señalando que la molécula de ADN ha sido fragmentada en diversos tamaños más pequeños.

En este contexto, el carril M, corresponde al indicador del tamaño molecular de 1kb, muestra diversas bandas de ADN separadas y bien definidas entre sí. El carril 1, es del ADN tratado con 5 mg/mL del extracto mixto (EM), lo que muestra una fragmentación ADN entre 5 al 20%. El carril 2, el ADN fue sometido a 10 mg/mL del EM, muestra la fragmentación del ADN entre 20 al 40%. Los carriles 3 y 4, corresponden a las concentraciones de 25 y 50 mg/mL del EM, respectivamente, en ambos tratamientos se determinó que el ADN fue fragmentado de 40 - 95%. La muestra del carril 5, corresponde al tratamiento del ADN con la concentración de 100 mg/mL de EM, el mismo generó la fragmentación por encima del 95% del ADN.

El carril 6, corresponde a la corrida del EM a concentración de 100 mg/mL, se observa que no hay presencia de ADN proveniente de las plantas en estudio, que, de ser así, podría generar confusión en la interpretación de los resultados, esto nos sirve como “blanco”. El carril 7, es la corrida del ADN sin tratamiento alguno, que se utiliza como “control” con el fin de ver la cantidad de ADN en comparación con cada uno de los que hayan recibido tratamiento con el EM. Los carriles 8 y 9, nos indica la corrida del ADN sometido con el EM de 5 y 10 mg/mL, en adición con la enzima proteinasa K, lo que determina una fragmentación de 5 a 20% y entre 20 a 40%, respectivamente, confirmando que el efecto genotóxico es por acción de los metabolitos secundarios presentes en el extracto mixto, pero no es por acción de las probables nucleasas que se encontrarían en los extractos de las plantas medicinales en estudio.

La figura 3, es la fotografía de la prueba repetida de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico mixto de *Cinchona* spp. “quina”, *Eucalyptus globulus* “eucalipto” y *Zingiber officinale* “kion” frente al ADN de *Escherichia coli*, puesto que, de esta manera se verifica que el efecto genotóxico se aprecia en términos similares al anterior ensayo, ratificando la reproducibilidad de la metodología y resultados del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico mixto frente al ADN genómico de *Escherichia coli*.

Los porcentajes de fragmentación que resultan en las figuras 2 y 3, fueron determinados mediante clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual valores numéricos de la tabla 4 haciendo uso de la escala de la tabla 2, el cual indica que mientras mayor es el número de clase, mayor será el porcentaje de fragmentación. Los resultados también se corroboraron mediante un estadístico de prueba de Kruskal – Wallis, que siendo una prueba no paramétrica mide diferencias o similitudes entre grupos, siendo el resultado la figura 4, resultando el rechazo de la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis alterna (H_1), lo que corresponde que al menos una mediana de la clase presenta diferencias significativas; es decir, que al menos una concentración del tratamiento tiene comportamiento genotóxico diferente, concluyendo que el efecto genotóxico del EM es directamente proporcional a la concentración del mismo, por lo que a mayor concentración será mayor el efecto genotóxico. Las letras iguales no difieren significativamente ($\alpha=0.05$). Las concentraciones 25, 50 y 100 mg/mL del extracto mixto de las plantas medicinales con los que se dio en el tratamiento al ADN genómico de *Escherichia coli*, no difieren significativamente.

En la familia Zingiberaceae, Cosquillo et al.⁴⁶, reportó que el extracto crudo y el etanólico obtenido de los rizomas de *C. longa*, fragmentaron en un 40 y 95% del ADN genómico humano, a concentraciones de 50 y 100 mg/mL, respectivamente; concluyendo que los rizomas de *C. longa*, presenta efecto genotóxico sobre ADN humano. Con respecto a otros estudios del efecto genotóxico tenemos a Marca P¹⁶, quien evaluó el efecto genotóxico *in vitro* del zumo del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo” frente al ADN de *Staphylococcus* sp., donde el porcentaje de fraccionamiento del ADN fue directamente proporcional a la concentración del extracto (5, 10, 50, 100 mg/mL), manifestando una potente actividad genotóxica. Del mismo modo, Ataucusi V¹⁷, también evaluó el efecto genotóxico *in vitro* obtenido de un extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicallix* Epl. “urqu muña” sobre el ADN humano, donde se evidenció

fraccionamiento del ADN a partir de las concentraciones de 25 – 500 mg/mL, siendo la fragmentación dependiente de la concentración. También, Beizaga G¹⁵, desarrollo extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos de *Artemisia absinthium* L. “ajeno”, con respecto al ADN humano y de la *Escherichia coli*; concluyendo también que su efecto genotóxico fue dependiente de la concentración del extracto. Gadano et al.⁴⁷, evaluó el efecto de la decocción de sus hojas, se evaluó efecto genotóxico sobre linfocitos humanos, concluyéndose a través de los ensayos realizados que el extracto a diferentes concentraciones (1, 10, 100, 100 µg/mL), influye negativamente sobre el índice mitótico. Las especies vegetales para realizar las comparaciones fueron seleccionadas de acuerdo al uso común que se dan en medicina tradicional en el ámbito regional, por lo que, se puede evidenciar que estas especies presentan un efecto genotóxico dependiente de la concentración y ante uso discriminado de estas especies podrían acarrear problemas de salud que en uso prolongado podría llegar a ser tóxicos.

Por otro lado, también se evidenciaron que el efecto genotóxico de algunas especies vegetales es provocado por el exudado de plantas como el caso del látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo”, que a una concentración de 50 y 100% presentaron una fragmentación del 100% sobre el ADN genómico humano, siendo estadísticamente significativo⁴⁸, del mismo el látex de *Carica papaya* L. “papaya”, a concentraciones del 5 - 100%, demostró un efecto genotóxico potente sobre el ADN (humano) *in vitro*⁴⁹. En ambos casos concluyeron que los metabolitos secundarios presentes en el látex fueron los responsables del efecto, en ambas muestras se identificaron alcaloides, saponinas y lactonas/cumarinas en gran abundancia. De esta manera podemos inferir que probablemente los metabolitos secundarios presentes en grandes cantidades podrían actuar afectando el ADN al cual se le es expuesto.

El mecanismo de genotoxicidad que se podría dar, se debe en esencia a los fitoquímicos presentes en las plantas que a diferencia de cumplir ciertas propiedades terapéuticas, en dosis determinadas podría desencadenar problemas negativo, tal como menciona Demma et al.², que en su estudio de genotoxicidad se le atribuyó el efecto a los flavonoides, como también a las naftoquinonas y cumarinas que podrían ser responsables de generar daño genotóxico a altas concentraciones; así mismo, Carvalho et al.⁵⁰, indica que los flavonoides a pesar de ser agentes antioxidantes, también son responsables del efecto genotóxico por mecanismo que es por la presencia de una sustitución del tipo (OOH) en el

carbono 7 y 3, pertenecientes al anillo A y B, respectivamente, estas sustituciones brindan características genotóxicas, sin embargo, aún se necesitan estudios más exhaustivos para lograr corroborar esta afirmación. Del mismo modo un estudio desarrollado por Sugisawa & Umegaki⁵¹, evidenciaron que el epigallocatequina indujo a un daño cromosómico sobre células WIL2-NS a 100 $\mu\text{mol/L}$, el cual explica que un flavonoide podría actuar como prooxidante *in vitro* se debe a las condiciones en la que se ha estudiado, puesto que se expuso a un amplio suministro de oxígeno disuelto del medio, sin embargo, es necesario desarrollar mayores investigaciones para confirmar la aseveración.

Entre otros compuestos fenólicos se ha identificado a los ácidos hidroxicinámicos que presentaron un efecto prooxidante con efecto dañino sobre el ADN, tal cual menciona Zheng et al.⁵², del mismo modo el ácido gálico (derivado del ácido benzoico), presentó mayor efecto prooxidante mayor en comparación con el ácido rosmarínico y cafeico, esto se debe a que por un mecanismo llegan a formar radicales como la semiquinona y el superóxido, los cuales son altamente reactivos y llegarían a dañar macromoléculas como los ácidos nucleicos⁵³.

Con respecto a otros fitoquímicos se describen a las saponinas, en un estudio desarrollado por Liu et al.⁵⁴, evidenciando daño sinérgico del ADN y también mutaciones cromosómicas *in vitro*. Los alcaloides de núcleo pirrolizidina (PA), según Chen et al.⁵⁵, evidenciaron ser genotóxicos y mutagénicos *in vivo* e *in vitro*, se describe que se debe a que inducen a las rupturas de las cadenas de ADN, evaluadas sobre células hepáticas. Asimismo, Henriques et al.⁵⁶, también reporta que los alcaloides como la boldina, reserpina, queleretrina, voacristina y skimmianina presentan estudios en los cuales han presentado efecto genotóxico. Estos estudios y entre otros, nos indican que ciertos fitoquímicos presentes en las plantas podrían desencadenar efectos genotóxicos por mecanismos determinados, a su vez generar daños mutagénicos y/o cromosómicos, sin embargo, los resultados obtenidos son una base para desarrollar estudios que determinen con exactitud los agentes químicos que desarrollan el efecto genotóxico, a su vez, según el tamizaje del extracto mixto realizado hay presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas, cumarinas, etc., por lo que podría indicar que estos metabolitos en acción sinérgica podrían ser responsables de la fragmentación del ADN de la *Escherichia coli*.

Es de amplio conocimiento que los compuestos fenólicos como los ácidos fenólicos y los flavonoides son conocidos por sus efectos positivos sobre la salud

por sus efectos antioxidantes e incluso anticancerígenas⁵³; no obstante, se ha mencionado que hay estudios que lo han determinado con efectos prooxidantes lo cual podría desencadenar un efecto dañino sobre las macromoléculas, en específico sobre el material genético, desarrollando un efecto genotóxico, por lo que es de gran necesidad determinar la concentración mínima tóxica e identificar a los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos de las diferentes partes de las plantas de amplio uso en medicina tradicional.

En consecuencia, el efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico mixto de *Cinchona* spp. “quina”, *Eucalyptus globulus* “eucalipto” y *Zingiber officinale* “kion” frente al ADN de *Escherichia coli*, se debe probablemente a los metabolitos secundarios presentes en el extracto, tal como se identificó en el tamizaje fitoquímico (tabla 3), donde se identificaron alcaloides, fenoles, taninos, azúcares reductores, lactonas, saponinas y catequinas. Del mismo se determinó que el efecto genotóxico no es por acción de las nucleasas que podrían estar presente en el extracto, puesto que fueron sometidas a la enzima proteinasa K durante una hora de incubación.

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico mixto de corteza de *Cinchona* spp., hojas de *Eucalyptus globulus* y del rizoma *Zingiber officinale* presentaron efecto genotóxico *in vitro* frente al ADN genómico de *Escherichia coli*.
2. A partir del extracto hidroalcohólico mixto se ha determinado la presencia compuestos fenólicos, azúcares reductores, taninos, alcaloides, saponinas y catequinas, flavonoides, lactonas y/o cumarinas.
3. El extracto hidroalcohólico mixto de corteza de *Cinchona* spp., hojas de *Eucalyptus globulus* y del rizoma *Zingiber officinale*, ha generado genotoxicidad *in vitro* con los siguientes porcentajes de fraccionamiento en el ADN de *Escherichia coli*: a 5 mg/mL entre 5 al 20%, a 10 mg/mL entre 20 al 40%; 25 y 50 mg/mL, respectivamente, entre 40 al 95% y finalmente a 100 mg/mL generó el fraccionamiento por encima del 95% del ADN *Escherichia coli*.

VII. RECOMENDACIONES

- 1.** Se debería realizar estudios de toxicidad crónica y subcrónica, de esta manera establecer intervalos de dosis segura o tóxica de los extractos en experimentación.
- 2.** Corroborar los resultados de genotoxicidad en ensayos *in vivo*, para complementar los resultados de los estudios toxicológicos y determinar el rango de seguridad de los extractos.
- 3.** Realizar estudio de citotoxicidad, determinando la relación existente en el daño genotóxico y citotóxico.
- 4.** Realizar estudios específicos con el HPLC acoplado a espectrofotómetro de masas o resonancia magnética, con el fin de caracterizar los compuestos químicos para identificar a los agentes responsables del fraccionamiento de ADN, mediante aislamientos estos mismos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sharif A, Akhtar M, Akhtar B, Saleem A, Manan M, Shabbir M, et al. Genotoxic and cytotoxic potential of whole plant extracts of *Kalanchoe laciniata* by Ames and MTT assay. EXCLI J [Internet]. 2017 [citado 19 de septiembre de 2024];16:593. Disponible en: [/pmc/articles/PMC5491922/](https://pmc/articles/PMC5491922/)
2. Demma J, Engidawork E, Hellman B. Potential genotoxicity of plant extracts used in Ethiopian traditional medicine. J Ethnopharmacol [Internet]. 2009;122:136-42. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874108007010>
3. Kahaliw W, Hellman B, Engidawork E. Genotoxicity study of Ethiopian medicinal plant extracts on HepG2 cells. BMC Complement Altern Med [Internet]. 2018;18:45. Disponible en: <https://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-017-2056-x>
4. Al-Harbi L, Al-Shammari G, Subash-Babu P, Mohammed M, Alkreadees RA, Yagoub A. *Cinchona officinalis* Phytochemicals-Loaded Iron Oxide Nanoparticles Induce Cytotoxicity and Stimulate Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. Nanomaterials [Internet]. 2022 [citado 16 de julio de 2023];12. Disponible en: [/pmc/articles/PMC9565860/](https://pmc/articles/PMC9565860/)
5. Hu Z, Feng R, Xiang F, Song X, Yin Z, Zhang C, et al. Acute and subchronic toxicity as well as evaluation of safety pharmacology of eucalyptus oil-water emulsions. Int J Clin Exp Med [Internet]. 2014 [citado 17 de julio de 2023];7:4835. Disponible en: [/pmc/articles/PMC4307427/](https://pmc/articles/PMC4307427/)
6. Khazraei H, Shamsdin S, Zamani M. *In Vitro* Cytotoxicity and Apoptotic Assay of *Eucalyptus globulus* Essential Oil in Colon and Liver Cancer Cell Lines. J Gastrointest Cancer [Internet]. 2022 [citado 17 de julio de 2023];53:363-9. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12029-021-00601-5>
7. Sulaiman F, Kazeem M, Waheed A, Temowo S, Azeez I, Zubair F, et al. Antimicrobial and toxic potential of aqueous extracts of *Allium sativum* , *Hibiscus sabdariffa* and *Zingiber officinale* in Wistar rats. Journal of Taibah University for Science [Internet]. 2014 [citado 15 de julio de 2023];8:315-22. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1016/j.jtusci.2014.05.004>

8. Vaz M, Simionatto E, de Almeida de Souza G, Fraga T, de Oliveira G, Coutinho E, et al. *Zingiber officinale* Roscoe essential oil: An alternative strategy in the development of novel antimicrobial agents against MDR bacteria. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2022 [citado 15 de julio de 2023];185:115065. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669022005489>
9. Elkhishin I, Awwad I. A Study Of The Cardiovascular Toxic Effects Of *Zingiber Officinale* (Ginger) In Adult Male Albino Rats And Its Possible Mechanisms Of Action. *Mansoura Journal of Forensic Medicine and Clinical Toxicology* [Internet]. 2009 [citado 15 de julio de 2023];17:109-27. Disponible en: https://mjfmct.journals.ekb.eg/article_52913.html
10. Ríos E, García A, Hernández O. Actividad antimicrobiana de extractos de *Zingiber officinale* y *Maclura pomifera* sobre *Pseudomonas syringae*. *Rev Mex De Cienc Agric* [Internet]. 2021 [citado 15 de julio de 2023];12:247-62. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342021000200247&lng=es&nrm=iso&tlng=es
11. Romero H. Efecto del extracto metanólico de la *Corteza de quina officinalis* L. (Cascarilla) en el comportamiento sexual de ratas machos [Internet] [Tesis de pregrado]. [Lima]: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2018 [citado 17 de julio de 2023]. Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/3508>
12. Chilón V, Arroyo J, Barrera R, Chamba D, Dietz R, Abal H. Toxicidad oral aguda de los extractos etanólicos de *Eucalyptus globulus*, *Morinda citrifolia*, *Peperomia glauca*, *Schinus molle* y *Zea mays* en ratones BALB/c 53. *Revista Peruana de Medicina Integrativa* [Internet]. 2018 [citado 17 de julio de 2023];3:9-17. Disponible en: <https://rpmi.pe/index.php/rpmi/article/view/540>
13. Aranda J, Villacrés J, Núñez L, Marín P, Nonato L, González G. Evaluación de la bioactividad de plantas medicinales cultivadas en el Perú usando la prueba de letalidad de *Artemia salina*. *Rev peru med integr* [Internet]. 2018 [citado 15 de julio de 2023];3:132-7. Disponible en: <https://www.rpmi.pe/ojs/index.php/RPMI/article/view/93/102>
14. Ahón K. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Zingiber officinale* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 MRSA. *Medicina naturista*,

- ISSN 1576-3080, Vol 15, N° 2, 2021, págs 23-26 [Internet]. 2021 [citado 15 de julio de 2023];15:23-6. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7998124&info=resumen&idioma=SPA>
15. Beizaga G. Genotoxicidad *in vitro* de extracto hidroalcohólico de *Artemisia absinthium* L. “ajeno” frente a ADN genómico humano y *Escherichia coli*. Ayacucho, 2019. [Tesis de pregrado]. [Ayacucho]: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2020.
 16. Marca P. Evaluación preliminar de la genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum* L. “ajo” frente a ADN de *Staphylococcus* sp. Ayacucho 2017 [Tesis de pregrado]. [Ayacucho]: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2018.
 17. Ataucusi V. Efecto gentotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Clinopodium brevicalex* Epl. «urqu muña» frente al ADN genómico humano. Ayacucho, 2018. [Tesis de pregrado]. [Ayacucho]: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2020.
 18. Jardín Botánico de Missouri. Tropicos | Name - *Cinchona officinalis* [Internet]. 2023 [citado 17 de julio de 2023]. Disponible en: <https://tropicos.org/name/27900157>
 19. Zevallos P. Taxonomía, distribución geográfica y status del género *Cinchona* en el Perú- [Internet]. Lima: Centro de Datos para la Conservación - UNAM; 1989 [citado 17 de julio de 2023]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/266558941_Taxonomia_distribucion_geografica_y_status_del_genero_Cinchona_en_el_Peru
 20. Eras V, Minchala J, Moreno J, Yaguana M, Sinche M, Valarezo C. Estructura, composición florística y fisiología reproductiva de *Cinchona officinalis* L. en la provincia de Loja. 1.^a ed. Loja, Ecuador: EDILOJA; 2019.
 21. Huamán L, Albán J, Chilquillo YE. Aspectos taxonómicos y avances en el conocimiento del estado actual del árbol de la Quina (*Cinchona officinalis* L.) en el Norte de Perú. Ecología Aplicada [Internet]. 2019 [citado 17 de julio de 2023];18:145-53. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162019000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 22. Arce U. Actividad antioxidante y antiviral del extracto hidroalcohólico de la corteza de dos especies del género *Cinchona* del distrito de Samugari -

- Ayacucho. [Huamanga]: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2022.
23. Ravishankara M, Padh H, Rajani M. Antioxidant activity of *Cinchona officinalis* stem bark extracts. *Orient Pharm Exp Med*. 2003;3:205-11.
 24. Ayala E. Efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antibacterianas *Spartium junceum* L. «retama», *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kunztle «tara» y *Eucalyptus globulus* Labill «eucalipto»: Ayacucho - 2013. [Tesis de pregrado]. [Huamanga]: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2014.
 25. Villarreal H, Cruz D, Legua J, Villarreal H, Cruz D, Legua J. El eucalipto utilizado como alternativa de tratamiento para afecciones respiratorias en la población de Barranca. *Vive Revista de Salud* [Internet]. 2022 [citado 17 de julio de 2023];5:98-109. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2664-32432022000100098&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 26. Morales J, Villegas M. Evaluación del efecto antibacteriano *In vitro* del aceite esencial de las hojas de *Eucalyptus globulus* en cultivos de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 [Tesis de pregrado]. [Chimbote]: Universidad de San Pedro; 2020.
 27. Jiménez L. Evaluación de las actividades biológicas y los compuestos bioactivos presentes en el aceite esencial de *Eucalyptus Globulus*. [Tesis de pregrado]. [Ambato - Ecuador]: Universidad Técnica de Ambato; 2022.
 28. Salgado F. El jengibre (*Zingiber officinale*). *Revista Internacional de Acupuntura* [Internet]. 2011 [citado 15 de julio de 2023];5:167-73. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-internacional-acupuntura-279-articulo-el-jengibre-zingiber-officinale--X1887836911933730>
 29. Lozano J, Galindo J, García-Borrón J, Martínez-Liarte J, Peñafiel R, Solano F. *Bioquímica y Biología Molecular*. 3.^a ed. España: McGraw Hill; 2005.
 30. Martínez J. Genotoxicidad *in vitro* de hojas de *Datura stramonium* L. «chamico». Ayacucho, 2016. [Tesis de pregrado]. [Ayacucho]: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.; 2017.
 31. Hoffman G. *Toxicología genética | Toxicología de Casarett & Doull: La ciencia básica de los venenos*. [Internet]. 5.^a ed. McGraw-Hill Medical. McGraw-Hill Medical; 1996 [citado 12 de junio de 2023]. Disponible en:

<https://accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2462§ionid=202672669>

32. Muñoz A. El ensayo del cometa: Una prueba para la evaluación genotóxica ante la exposición a pesticidas [Tesis de maestría]. [Bogotá]: Universidad de los Andes; 2006.
33. Guzmán A. Estudio del potencial genotóxico del E-5842, un fármaco experimental antipsicótico con afinidad por el receptor sigma, y del mecanismo de inducción de eritrocitos micronucleados en ratón mediante hipotermia. [Tesis doctoral]. [Barcenola]: Universidad Autónoma de Barcelona; 2008.
34. Landeros J. Agentes mutagénicos y su daño en el ADN. [Tesis de pregrado]. [Guadalajara]: Universidad de Guadalajara; 2011.
35. Abril N, Bárcena A, Fernández E, Galván A, Jorrín J, Peinado J, et al. Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas [Internet]. Córdona; 2010 [citado 12 de junio de 2023]. Disponible en: <https://docplayer.es/7159987-8-espectrofotetría-espectros-de-absorcion-y-cuantificacion-colorimetrica-de-biomoleculas.html>
36. Quispe C. Efecto genotóxico *in vitro* del látex y extracto hidroalcohólico de semillas de *Carica papaya* L. «papaya» frente al ADN genómico humano. Ayacucho , 2016. [Tesis de pregrado]. [Ayacucho]: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2017.
37. Miranda M, Cuéllar A. Manual de prácticas de laboratorio: Farmacognosia y productos naturales [Internet]. 1.^a ed. Universidad de la Habana Cuba. Habana - Cuba: Instituto de Farmacia y Alimentos; 2000 [citado 7 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://isbn.cloud/9789590717956/manual-de-practicas-de-laboratorio-farmacognosia-y-productos-naturales/>
38. Miranda V. Protocolos de Biología Molecular - Guía de Practicas. Ayacucho; 2013.
39. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, et al. Biología Celular y Molecular. Panamericana, editor. 2004 [citado 12 de junio de 2023];533-67. Disponible en: <https://booksmedicos.org/biologia-celular-y-molecular-lodish-5a-edicion/>
40. Larrea M. Evaluación del daño genotoxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay [Internet] [Tesis de pregrado]. [La Paz]:

- Universidad Mayor de San Andrés; 2013 [citado 12 de junio de 2023]. Disponible en: <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/3551>
41. Shala AY, Gururani MA. Phytochemical Properties and Diverse Beneficial Roles of *Eucalyptus globulus* Labill.: A Review. *Horticulturae*. 2021;7:450.
 42. Pan M, Lei Q, Zang N, Zhang H. A Strategy Based on GC-MS/MS, UPLC-MS/MS and Virtual Molecular Docking for Analysis and Prediction of Bioactive Compounds in *Eucalyptus Globulus* Leaves. *Int J Mol Sci*. 2019;20:3875.
 43. Shalaby E, Shanab S, Hafez R, El-Ansary A. Chemical constituents and biological activities of different extracts from ginger plant (*Zingiber officinale*). *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2023;10:14.
 44. Tohma H, Gülçin İ, Bursal E, Gören A, Alwasel S, Köksal E. Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) determined by HPLC-MS/MS. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2017;11:556-66.
 45. Murauer A, Ganzera M. Quantitative determination of major alkaloids in *Cinchona bark* by Supercritical Fluid Chromatography. *J Chromatogr A*. 2018;1554:117-22.
 46. Cosquillo M, Placencia M, Miranda T, Moreno M, Retuerto M. *In vitro* cytotoxic and genotoxic effect of the crude and ethanolic extract from the rhizome of *Curcuma longa* L. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2020 [citado 9 de octubre de 2024];37:454-61. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33295547/>
 47. Gadano A, Gurni A, López P, Ferraro G, Carballo M. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. *J Ethnopharmacol*. 2002;81:11-6.
 48. Montes M. Efecto genotóxico *in vitro* del látex de plantas medicinales de uso dérmico *Argemone mexicana* L. “cardo santo” y *Taraxacum officinale* “diente de león”. Ayacucho, 2017. [Internet] [Tesis de grado]. UNSCH; 2017 [citado 9 de octubre de 2024]. Disponible en: <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/4165>
 49. Quispe C. Efecto genotóxico *in vitro* de látex y extracto hidroalcohólico de semilla de *Carica papaya* L. “papaya” frente a ADN genómico humano. Ayacucho, 2016. [Internet] [Tesis de grado]. UNSCH; 2017 [citado 9 de

- octubre de 2024]. Disponible en: <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/1663>
50. de Carvalho M, Barca F, Agnez-Lima L, de Medeiros S. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Environ Mol Mutagen. 2003;42:185-91.
 51. Sugisawa A, Umegaki K. Physiological concentrations of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCg) prevent chromosomal damage induced by reactive oxygen species in WIL2-NS cells. J Nutr [Internet]. 2002 [citado 9 de octubre de 2024];132:1836-9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12097656/>
 52. Zheng L, Dai F, Zhou B, Yang L, Liu ZL. Prooxidant activity of hydroxycinnamic acids on DNA damage in the presence of Cu(II) ions: Mechanism and structure–activity relationship. Food and Chemical Toxicology. 2008;46:149-56.
 53. Eghbaliferiz S, Iranshahi M. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. Phytother Res [Internet]. 2016 [citado 9 de octubre de 2024];30:1379-91. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27241122/>
 54. Liu W, Di Giorgio C, Lamidi M, Elias R, Ollivier E, De Méo MP. Genotoxic and clastogenic activity of saponins extracted from *Nauclea bark* as assessed by the micronucleus and the comet assays in Chinese Hamster Ovary cells. J Ethnopharmacol. 2011;137:176-83.
 55. Chen T, Mei N, Fu PP. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. Journal of Applied Toxicology [Internet]. 2010 [citado 9 de octubre de 2024];30:183-96. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jat.1504>
 56. Henriques J, Moreno P, Von Poser G, Querol C, Henriques A. Genotoxic effect of alkaloids. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 1991;86:71-4. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761991000600018&lng=en&tlng=en

ANEXOS

Anexo 1. Constancia de la clasificación taxonómica de la especie vegetal *Cinchona spp* "quina".

CONSTANCIA

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

Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, **Srta. Christel Annie, RIVERA GUTIERREZ**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	RUBIALES
FAMILIA	:	RUBIACEAE
GENERO	:	Cinchona
ESPECIE	:	<i>Cinchona spp..</i>
N.V.	:	"quina", "cascarilla"

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

Ayacucho, 24 de Setiembre del 2 023.


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

Anexo 2. Constancia de la clasificación taxonómica de la especie vegetal *Eucalyptus globulus* Labill. "eucalipto".

CONSTANCIA

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

Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, **Srta. Christel Annie, RIVERA GUTIERREZ**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

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

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

Ayacucho, 24 de Setiembre del 2 023.



LAURA AUCASIME MEDINA

BIÓLOGA

Reg. C.B.P. N° 583 C.R. - XIII

Anexo 3. Constancia de la clasificación taxonómica de la especie vegetal de *Zingiber officinale* "kión".

CONSTANCIA

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

Que, la Bachiller en Farmacia y Bioquímica, **Srta. Christel Annie, RIVERA GUTIERREZ**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

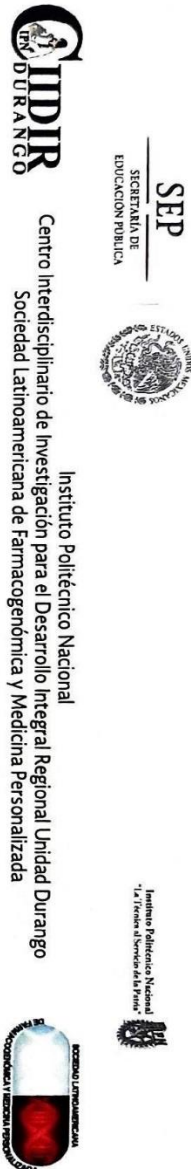
DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	LILIOPSIDA
SUB CLASE	:	ZINGIBERIDAE
ORDEN	:	ZINGIBERALES
FAMILIA	:	ZINGIBERACEAE
GENERO	:	Zingiber
ESPECIE	:	Zingiber officinale Roscoe
N.V.	:	"Kión" , "jengibre"

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

Ayacucho, 24 de Setiembre del 2023


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

Anexo 4. Constancia de la ponencia del artículo científico: “Metodología para la determinación del efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales y/o productos fitoterapéuticos.



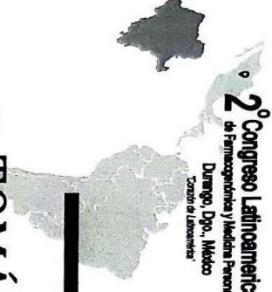
SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

Instituto Politécnico Nacional
"La Excelencia al Servicio de la Patria"

2º Congreso Latinoamericano
de Farmacogenética y Medicina Personalizada
Durango, Dgo., México
Centro de Investigaciones
CIBIR
DURANGO

Instituto Politécnico Nacional
Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Durango
Sociedad Latinoamericana de Farmacogenética y Medicina Personalizada

Otorgan la presente



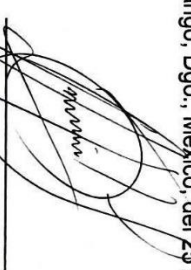
CONSTANCIA

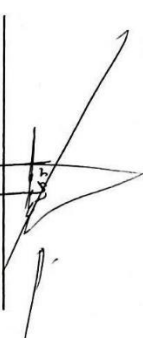
Dr. TOMÁS YURET MIRANDA TOMASEVICH

Autor del trabajo:
"Método Tomasevich: para Determinar el Efecto Genotóxico *In Vitro* de Plantas Medicinales y/o Productos Fitoterapéuticos"
Clave: TXG808

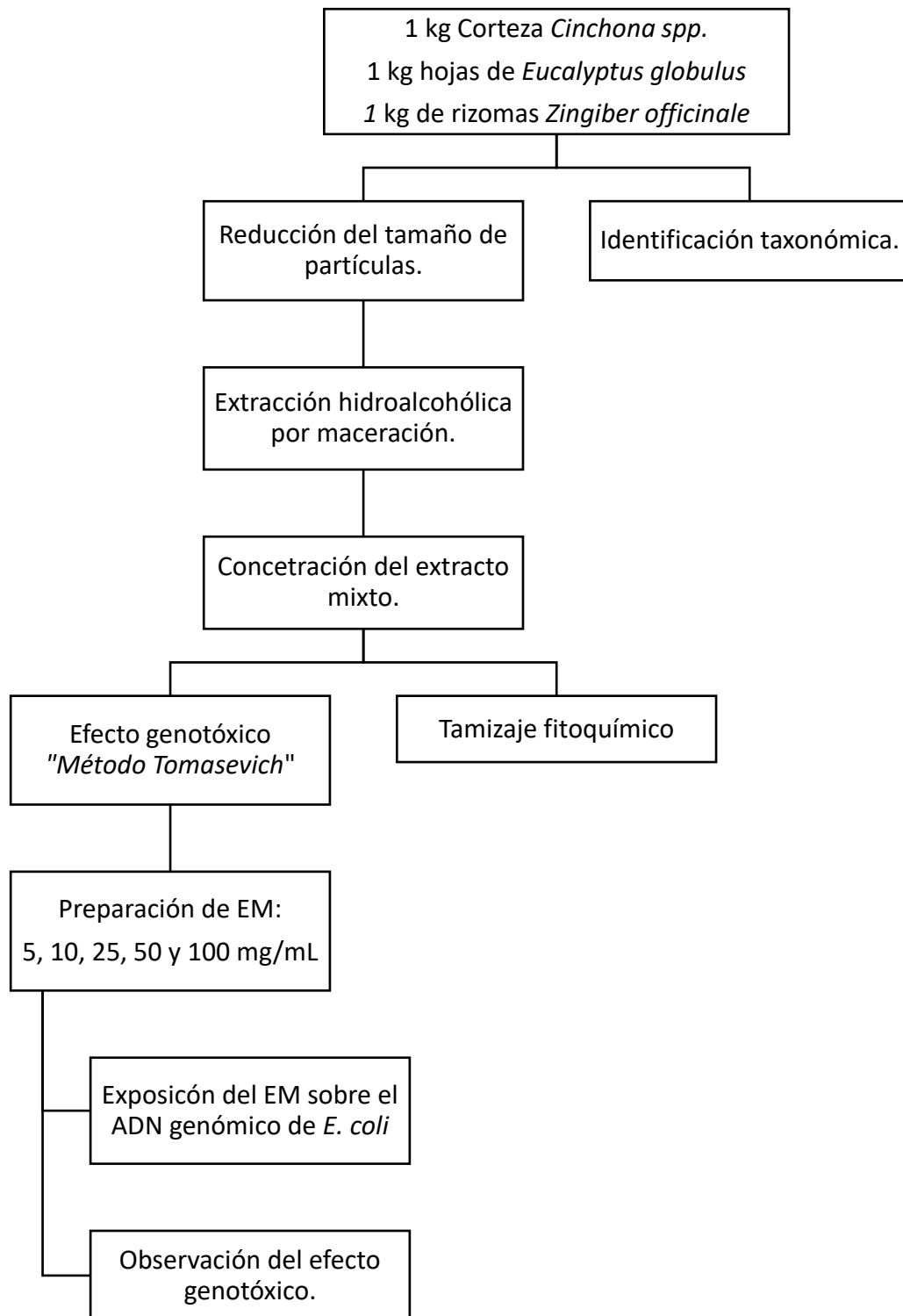
Por su participación en la sesión de posters en el
2do Congreso Latinoamericano de Farmacogenética y Medicina Personalizada
Realizado en Durango, Dgo., México, del 25 al 28 de octubre de 2017


Dr. Eduardo Sánchez Ortiz
Director de CIBIR IPN Unidad Durango


Prof. Dr. Luis Quiñones
Presidente de la SOLFAGEM


Dr. Ismaell Lates-Asseff
Presidente del Comité Organizador

Anexo 5. Flujograma general de trabajo-



Anexo 6. Procedimiento realizado para el tamizaje fitoquímico.

Ensayo	Reactivos	Característica positiva
Cloruro Férrico	2mL de muestra + 3 gotas cloruro férrico	- Rojo – vino (comp. fenólicos). - Verde – intenso (taninos pirocatecólicos)
Shinoda	2mL de muestra + 4 gotas de HCl + pedazo de Mg.	Coloración amarillo, naranja, carmelita o rojo.
Azúcares reductores Benedict	2mL de muestra + 4 gotas de solución benedict en baño maría	Coloración naranja.
Aminoácidos Ninhidrina	2mL de muestra + 2mL de ninhidrina al 2% en baño maría	Color azul violáceo.
Terpenos	2mL de muestra + 1mL de anhídrido acético + gotas de ácido sulfúrico	- Rosado – azul rápido - Verde intenso – visible rápido - Verde oscuro – negro final
Resinas	2mL de muestra + 10mL agua destilada	Presencia de precipitado como opalescencia.
Mayer	2mL de muestra + HCl + reactivo de Mayer.	- Presencia de opalescencia, turbidez definida o precipitado coposo.

Anexo 7. Proceso de preparación del extracto hidroalcohólico mixto de corteza de *Cinchona* spp., hojas de *Eucalyptus globulus* y del rizoma *Zingiber officinale*.

Obtención de la muestra



(a)



(b)



(c)

Reducción del tamaño



Extracto hidroalcohólico mixto



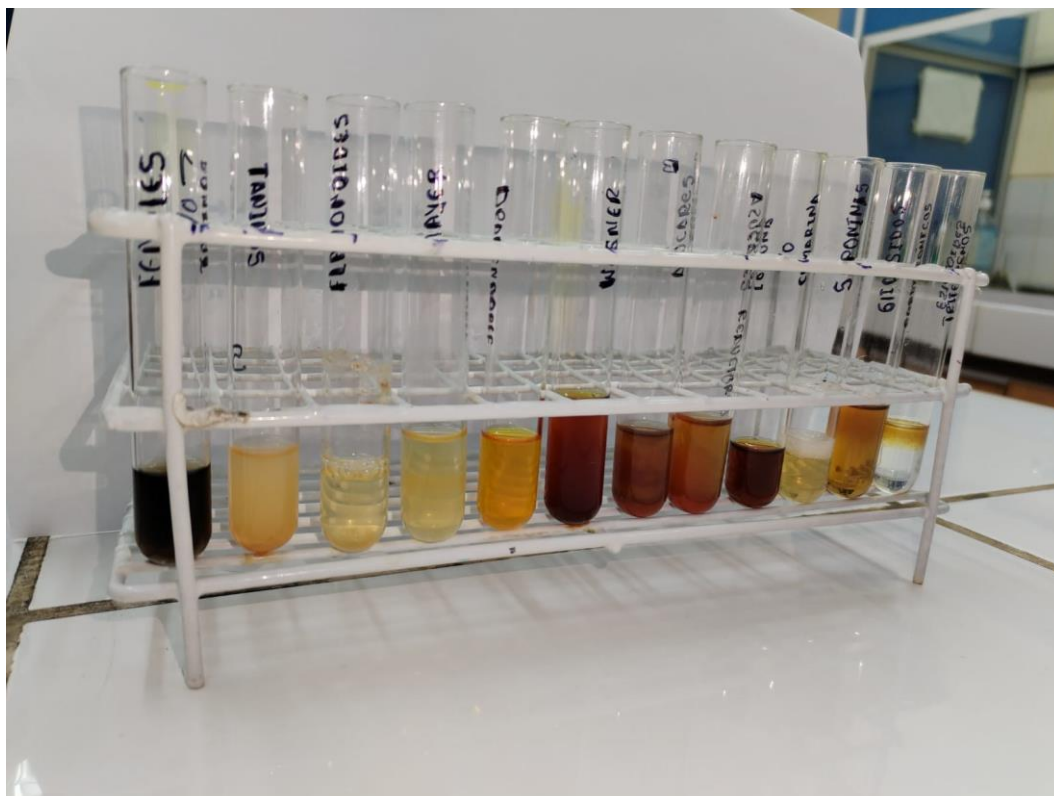
Leyenda

(a): corteza de *Cinchona* spp

(b): hojas de *Eucalyptus globulus*

(c): rizoma *Zingiber officinale*

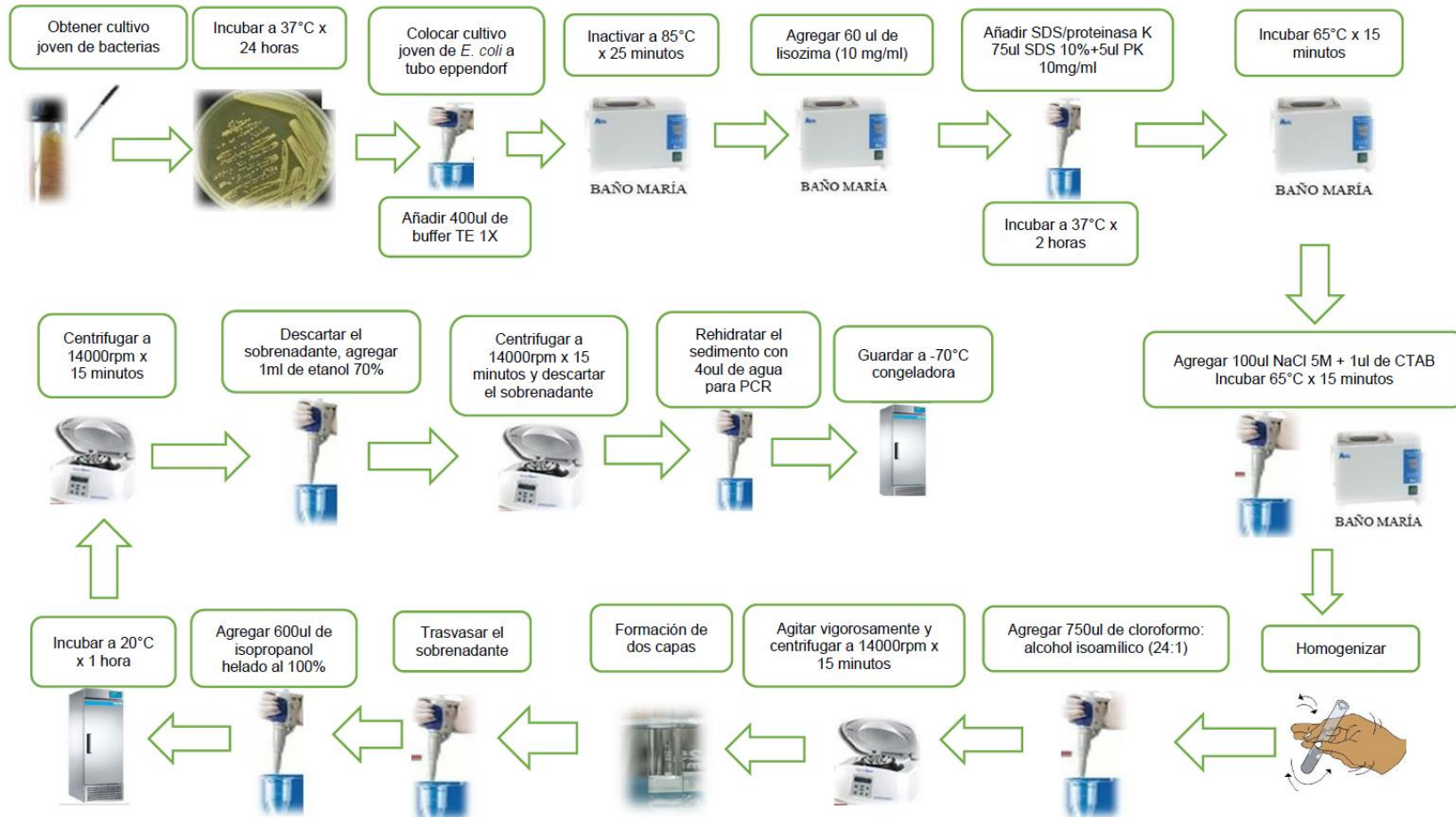
Anexo 8. Tamizaje fitoquímico del extracto mixto de corteza de *Cinchona* spp., hojas de *Eucalyptus globulus* y del rizoma *Zingiber officinale*.



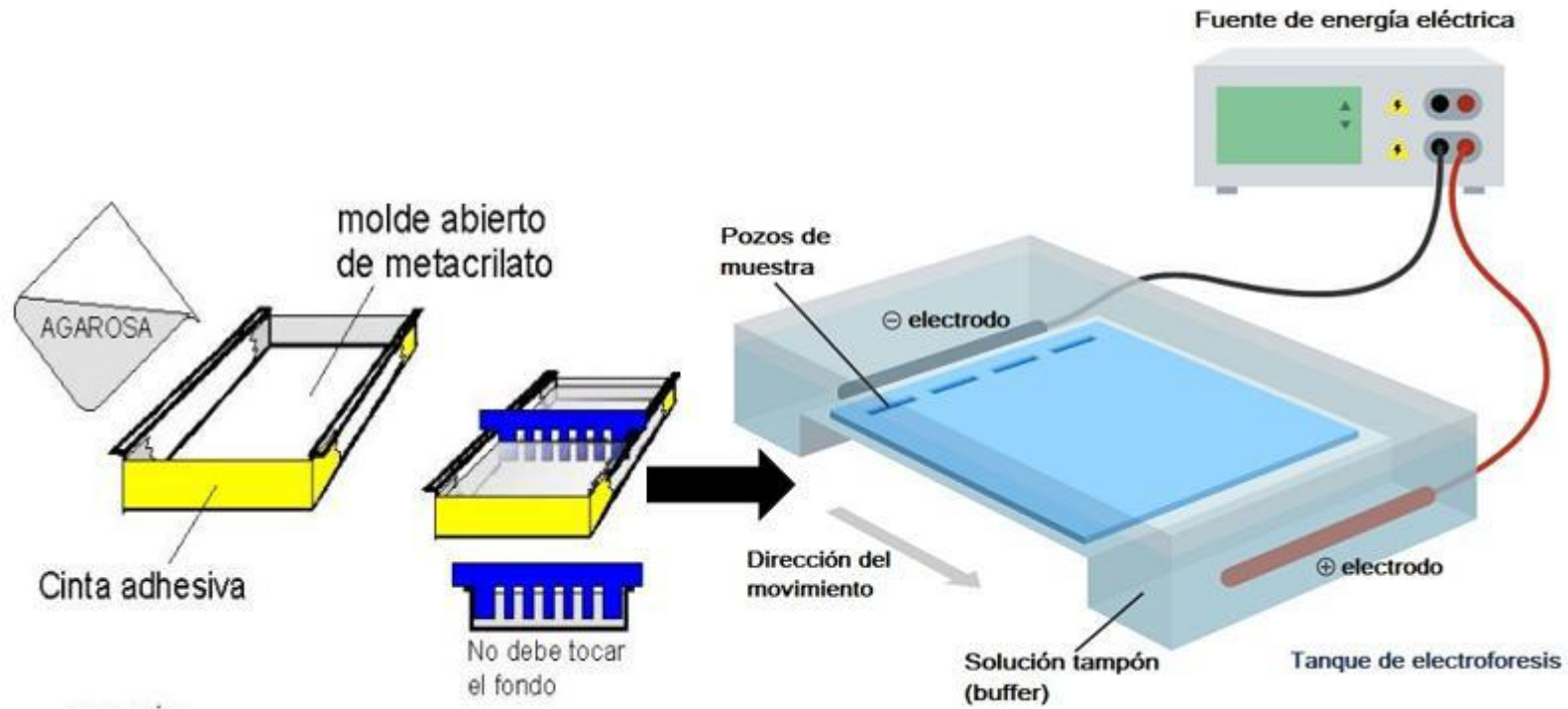
Anexo 9. Protocolo para la determinación del efecto genotóxico in vitro mediante electroforesis, propuesto por Miranda T.



Anexo 10. Protocolo extracción de ADN genómico de *Escherichia coli*.



Anexo 11. Esquema del equipo de electroforesis-



Anexo 12. Matriz de consistencia.

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	MARCO TEÓRICO	VARIABLES	METODOLOGÍA
Efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico mixto de <i>Cinchona spp.</i> , <i>Eucalyptus globulus</i> y <i>Zingiber officinale</i> frente al ADN de <i>Escherichia coli</i> .	¿Tendrá efecto genotóxico el extracto hidroalcohólico mixto de <i>Cinchona spp.</i> , <i>Eucalyptus globulus</i> y <i>Zingiber officinale</i> frente al ADN de <i>Escherichia coli</i> ?	Objetivo General: Determinar la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico mixto de corteza de <i>Cinchona spp.</i> , hojas de <i>Eucalyptus globulus</i> y del rizoma <i>Zingiber officinale</i> frente al ADN genómico de <i>Escherichia coli</i> . Objetivos Específicos: - Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico mixto de la corteza de <i>Cinchona spp.</i>, hojas de <i>Eucalyptus globulus</i> y del rizoma <i>Zingiber officinale</i>. - Evaluar la genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto mixto de la corteza de <i>Cinchona spp.</i>, hojas de <i>Eucalyptus globulus</i> y del rizoma <i>Zingiber officinale</i>.	El extracto hidroalcohólico mixto de la corteza de <i>Cinchona spp.</i> , hojas de <i>Eucalyptus globulus</i> y zumo de rizoma de <i>Zingiber officinale</i> , presentan genotoxicidad <i>in vitro</i> frente al ADN genómico de <i>Escherichia coli</i> .	- Antecedentes <i>Cinchona spp</i> "quina", <i>Eucalyptus globulus</i> y <i>Zingiber officinale</i> "kion". - Clasificación taxonómica, hábitat y distribución. - Ácidos nucleicos - Toxicidad y genotoxicidad - Evaluación de genotoxicidad. - Ensayos del cometa - Electroforesis en gel de agarosa - Espectrofotometría	Variable independiente: Extracto hidroalcohólico mixto de corteza de <i>Cinchona spp.</i> , hojas de <i>Eucalyptus globulus</i> y. zumo de rizoma de <i>Zingiber officinale</i> . Indicador: - Concentración mg/mL m/v del extracto obtenido Variable dependiente: - Efecto genotóxico <i>in vitro</i> frente a ADN genómico de <i>Escherichia coli</i>. Indicador: - Grado de fragmentación del Ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico de <i>Escherichia coli</i>. - Escala de valoración numérica: 0, 1, 2, 3 y 4.	Tipo de investigación: Básica, experimental Definición de la población y muestra. Población: Estuvo conformada por las plantas aparentemente sanas de <i>Cinchona spp</i> "quina" y <i>Zingiber officinale</i> "kion", que crecen en zonas aledañas de la comunidad de San Cristóbal, Samugari, La Mar de Ayacucho; de <i>Eucalyptus globulus</i> "eucalipto", que crecen en las zonas aledañas al distrito de Quinua en Ayacucho. Muestra: Un kg de corteza <i>Cinchona spp.</i> , y un kg de rizomas <i>Zingiber officinale</i> recolectadas en zonas aledañas de la comunidad de San Cristóbal, Samugari, La Mar de Ayacucho y un kg hojas de <i>Eucalyptus globulus</i> fueron recolectadas en los lugares aledaños al distrito de Quinua en Ayacucho. Métodos instrumentales: Para evaluar la genotoxicidad <i>in vitro</i> , se realizará ensayos de electroforesis de los productos del ADN sometidos a los extractos hidroalcohólicos mixtos a diferentes concentraciones. Análisis estadísticos: Los datos serán agrupados y presentados en tablas, expresados en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. El daño genotóxico se evaluará mediante el paquete estadístico SPSS, se utilizará la prueba de Kruskal-Wallis para medir el porcentaje de fragmentación de más de dos muestras independientes. El valor de $p \leq 0,05$, se considerará como el nivel estadísticamente significativo Hernández.

Fuente: elaboración propia.

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

RESOLUCIÓN DECANAL N° 1235-2024-UNSCH-FCSA-D

BACHILLER: Christel Annie RIVERA GUTIERREZ

En la ciudad de Ayacucho, siendo las ocho y doce de la mañana del día veintidós del mes de noviembre del año dos mil veinticuatro, se reunieron en el auditorium de la Facultad de Ciencias de la Salud los docentes miembros del jurado evaluador, para el acto de sustentación del trabajo de tesis titulado **Efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico mixto de *Cinchona spp.*, *Eucalyptus globulus* y *Zingiber officinale* frente al ADN de *Escherichia coli*.**, presentado por **Christel Annie RIVERA GUTIERREZ**, para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. El jurado evaluador está conformado por:

Presidente (Decano) : Prof. Marco R. Aronés Jara (delegado por el Decano)

Jurados : Prof. Marco R. Aronés Jara

: Prof. Osmar H. Huaraca Cárdenas

4to jurado : Prof. Mónica Gómez Quispe

Asesor : Prof. Emilio G. Ramírez Roca

Secretario Docente : Prof. Daniel Santiago Chávez

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

Da inicio la exposición el Bachiller: **Christel Annie RIVERA GUTIERREZ** y una vez concluida, el presidente de la comisión solicita a los miembros del jurado evaluador realizar sus respectivas preguntas, seguidamente se da pase al asesor de tesis, para que pueda aclarar algunas preguntas, interrogantes, aclaraciones.

El presidente invita al sustentante abandonar el auditorium para que pueda proceder con la calificación.

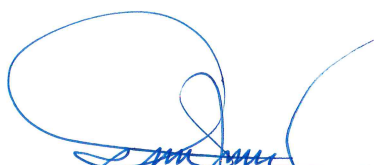
RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FINAL

Bachiller: Christel Annie RIVERA GUTIERREZ

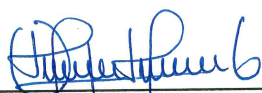
JURADOS	Texto	Exposición	Preguntas	P. Final
Prof. Marco R. Aronés Jara	16	16	16	16
Prof. Osmar H. Huaraca Cárdenas	17	16	15	16
Prof. Mónica Gómez Quispe	17	16	15	16
PROMEDIO FINAL				

De la evaluación realizada por los miembros del jurado calificador, llegaron al siguiente resultado: Aprobar al Bachiller: **Christel Annie RIVERA GUTIERREZ**; quien obtuvo la nota

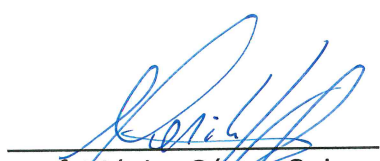
final de dieciséis (16) para la cual los miembros del jurado evaluador firman al pie del presente, siendo las 9:40 am de la mañana, se da por concluido el presente acto académico.



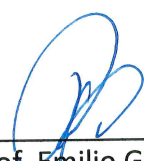
Prof. Marco R. Aronés Jara
Jurado 1



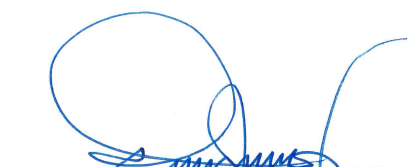
Prof. Osmar H. Huaraca Cárdenas
Jurado 2



Prof. Mónica Gómez Quispe
4to Jurado



Prof. Emilio G. Ramírez Roca
Asesor



Prof. Marco R. Aronés Jara
Presidente



Prof. Daniel Santiago Chávez
Secretario docente



UNSCH

FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE
FARMACIA Y BIOQUÍMICA



CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD SEGUNDA INSTANCIA:
TESIS DE PREGRADO

(C°60-2024-EPFB-UNSCH)

La que suscribe, directora de escuela y docente instructor en segunda instancia de Tesis de Pregrado, luego de verificar la originalidad de la tesis de la Escuela profesional de Farmacia y bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud, en representación de la decana y delegada por Resolución Decanal N° 077-2021-UNSCH-FCSA/D, deja constancia que el trabajo de tesis titulado:

Efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico mixto de *Cinchona spp.*, *Eucalyptus globulus* y *Zingiber officinale* frente al ADN de *Escherichia coli*.

**Para optar el título profesional de: QUIMICO FARMACÉUTICO
PRESENTADO POR: Bach. Christel Annie RIVERA GUTIERREZ**

Ha sido sometido al análisis mediante el sistema TURNITIN concluyendo que presenta un porcentaje de **21% de índice de similitud**.

Por lo que, de acuerdo con el porcentaje establecido en el Artículo 13° del Reglamento de Originalidad de Trabajos de investigación de pregrado de la UNSCH. Por tanto, **ES PROCEDENTE** conceder la Constancia de originalidad en segunda instancia.

Ayacucho, 15 de noviembre del 2024



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

Mg. Maricela López Sierralta
DIRECTORA
Docente. Instructor
Segunda instancia

cc.
Archivo.

Efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico mixto de Cinchona spp., Eucalyptus globulus y Zingiber officinale frente al ADN de Escherichia coli.

por Christel Annie Rivera Gutierrez

Fecha de entrega: 15-nov-2024 12:10a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2520240653

Nombre del archivo: Tesis_de_Christel_Annie_RIVERA_GUTIERREZ.pdf (1.68M)

Total de palabras: 14570

Total de caracteres: 79946

Efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico mixto de Cinchona spp., Eucalyptus globulus y Zingiber officinale frente al ADN de Escherichia coli.

INFORME DE ORIGINALIDAD

21 %

INDICE DE SIMILITUD

21 %

FUENTES DE INTERNET

6 %

PUBLICACIONES

15 %

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	7 %
2	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	5 %
3	rpmi.pe Fuente de Internet	1 %
4	docs.bvsalud.org Fuente de Internet	1 %
5	www.mdpi.com Fuente de Internet	1 %
6	revistas.unsch.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
7	dialnet.unirioja.es Fuente de Internet	<1 %
8	Submitted to aesanlucas Trabajo del estudiante	<1 %

9	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
10	www.jocmr.com Fuente de Internet	<1 %
11	rpmi.revistasperuanas.org Fuente de Internet	<1 %
12	Submitted to Universidad Maria Auxiliadora SAC Trabajo del estudiante	<1 %
13	Submitted to Universidad Cientifica del Sur Trabajo del estudiante	<1 %
14	www.ijam.co.in Fuente de Internet	<1 %
15	Submitted to Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales (FLACSO) - Sede Ecuador Trabajo del estudiante	<1 %
16	repositorio.upao.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
17	www.sabiia.cnptia.embrapa.br Fuente de Internet	<1 %
18	1library.co Fuente de Internet	<1 %
19	ir.cut.ac.zw:8080 Fuente de Internet	<1 %

20	www.labome.org Fuente de Internet	<1 %
21	Andressa Leite Ferraz de Melo, Luana Rossato, Jannaína Velasques, Virginia Lopes de Sousa et al. "Polymyxin combined with Ocimum gratissimum essential oil: one alternative strategy for combating polymyxin-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> ", Journal of Medical Microbiology, 2024 Publicación	<1 %
22	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1 %
23	Submitted to Pontificia Universidad Catolica del Ecuador - PUCE Trabajo del estudiante	<1 %
24	repositorio.ufrn.br Fuente de Internet	<1 %
25	Submitted to Universidad de Costa Rica Trabajo del estudiante	<1 %
26	cfores.upr.edu.cu Fuente de Internet	<1 %
27	dspace.ups.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
28	pesquisa.bvsalud.org Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo