

**UNIVERSIDAD NACIONAL SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

**SECCION DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE
OBSTETRICIA
MAESTRÍA EN ATENCIÓN INTEGRAL EN SALUD**



**Comparación de la genotoxicidad *in vitro* de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua” frente a ADN genómicos de: humano, *Candida* y *Staphylococcus*.
Ayacucho, 2014.**

**Tesis para obtener el Grado Académico de Maestro en Atención
Integral de Salud**

PRESENTADO POR:

Br. RINA MARIOLA INFANTE CÁRDENAS,

AYACUCHO, PERÚ

2015

TM
AI 05
INF

DEDICATORIA

A Dios por permitirme culminar una etapa más en el ámbito académico, a Ronald, Marcelo y Bárbara, a mis padres y hermanos por su apoyo y cariño incondicional.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por ser nuestra *alma mater*, que nos acogió durante estos años de estudio y nos dio la oportunidad de adquirir conocimiento.

A la Escuela de Posgrado y Facultad de Obstetricia, por darnos la oportunidad de formarnos en la maestría.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, al Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática y al Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich, que me permitieron realizar el estudio.

Al Dr. Homero Ango Aguilar por su asesoría y por brindarme la oportunidad de llevar a cabo el presente trabajo de Tesis.

A mi familia por su apoyo incondicional, cariño y comprensión en cada etapa de mi vida.

A toda las personas que han estado conmigo y me han brindado su amistad, apoyo y consejos.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	6
2.1. Antecedentes	6
2.2. <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze "canchalagua"	9
2.3. ADN genómico de <i>Homo sapiens sapiens</i>	11
2.4. <i>Candida albicans</i>	12
2.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.6. Cuantificación y determinación de pureza de ADN	14
2.7. Electroforesis en gel	15
2.8. Actividad genotóxica	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Lugar de trabajo de investigación	19
3.2. Población y muestra	19
3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos	20
3.3.1. Recolección e identificación de la muestra	20
3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico	20
3.3.3. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico	21
3.4. Extracción de ADN genómico de linfocitos humanos	21
3.5. Extracción de ADN genómico de <i>Candida albicans</i>	23
3.6. Extracción de ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
3.7. Cuantificación de ADN genómico	25
3.7.1. Espectrofotometría	25
3.7.2. Electroforesis	25
3.8. Ensayos de la genotoxicidad <i>in vitro</i> "Método Tomasevich"	26
3.7. Análisis de datos	29
IV. RESULTADOS	30
V. DISCUSIÓN	41
VI. CONCLUSIONES	47
VII. RECOMENDACIONES	48
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
IX. ANEXOS	52

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Preparación de carga de ADN para visualización de banda en electroforesis. Ayacucho, 2015.	26
Tabla 2. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> de extractos de plantas medicinales, sobre ADN genómico. Ayacucho, 2015.	27
Tabla 3. Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.	29
Tabla 4. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze "canchalagua". Ayacucho, 2015.	31
Tabla 5. Cuantificación por espectrofotometría ultra violeta marca Eppendorf Bio Photometer plus de ADN genómico obtenido mediante extracción orgánica. Ayacucho, 2015.	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Página		
Figura 1.	Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de muestras del ADN genómico obtenido mediante extracción orgánica. Ayacucho, 2015.	33
Figura 2.	Prueba de Kruskal Wallis para el efecto genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze “canchalagua”, frente a los ADNs genómico de <i>Homo sapiens sapiens</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> , respectivamente, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.	34
Figura 3.	Electroforesis del producto de la genotoxicidad <i>in vitro</i> de extracto hidroalcohólico de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze “canchalagua” a diferentes concentraciones, sobre el ADN genómico de <i>Homo sapiens sapiens</i> , durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.	35
Figura 4.	Prueba de Kruskal Wallis para el efecto genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze “canchalagua” a diferentes concentraciones, sobre el ADN genómico de <i>Homo sapiens sapiens</i> , durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.	36
Figura 5.	Electroforesis del producto de la genotoxicidad <i>in vitro</i> de extracto hidroalcohólico de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze “canchalagua” a diferentes concentraciones, sobre el ADN genómico de <i>Candida albicans</i> , durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.	37
Figura 6.	Prueba de Kruskal Wallis para el efecto genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze “canchalagua” a diferentes	38

concentraciones, sobre el ADN genómico de *Candida albicans*, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.

- Figura 7. Electroforesis del producto de la genotoxicidad *in vitro* de extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua” a diferentes concentraciones, sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015. 39
- Figura 8. Prueba de Kruskal Wallis para el efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua” a diferentes concentraciones, sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015. 40

ÍNDICE DE ANEXOS

Página		
Anexo 1	Certificado de clasificación taxonómica de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze “canchalagua”. Ayacucho, 2015.	53
Anexo 2.	Esquema de obtención del extracto hidroalcohólico de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze “canchalagua”, tamizaje fitoquímico y ensayo de genotoxicidad. Ayacucho, 2015.	54
Anexo 3.	Características producidas en los ensayos para la identificación de los metabolitos secundarios de las plantas medicinales.	55
Anexo 4.	Secado a temperatura ambiente, molienda y pesado de tallos, hojas y flores de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze “canchalagua”. Ayacucho, 2015.	56
Anexo 5.	Macerado y obtención del extracto hidroalcohólico de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze “canchalagua”. Ayacucho, 2015.	57
Anexo 6.	Preparación del extracto hidroalcohólico a diferentes concentraciones, cultivo de las cepas de <i>Candida albicans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> y obtención del ADN genómico para la evaluación de genotoxicidad de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze “canchalagua”. Ayacucho, 2015.	58
Anexo 7.	Cuantificación por espectrofotometría UV de ADN genómico extraído de <i>Homo sapiens sapiens</i> , <i>Cándida albicans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> , preparación e incubación de la mezcla para la evaluación de genotoxicidad de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze “canchalagua”. Ayacucho, 2015.	59

Anexo 8.	Electroforesis en gel de agarosa al 1%, para la evaluación de genotoxicidad <i>in vitro</i> de extracto hidroalcohólico de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze “canchalagua”. Ayacucho, 2015.	60
Anexo 9.	Registro fotográfico del gel de agarosa para interpretación de la genotoxicidad <i>in vitro</i> de extracto hidroalcohólico de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze “canchalagua” frente a ADNs genómicos. Ayacucho, 2015.	61
Anexo 10.	Valores numéricos del grado de genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze “canchalagua”, según la concentración, frente a ADN genómicos de: <i>Homo sapiens sapiens</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> , durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.	62
Anexo 11.	Estadísticos descriptivos del efecto genotóxico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze “canchalagua”, frente a los ADNs genómico de <i>Homo sapiens sapiens</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> , respectivamente, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.	63
Anexo 12.	Resultados de la prueba de Kruskal Wallis comparando el efecto genotóxico <i>in vitro</i> del extracto de hidroalcohólico de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze “canchalagua”, frente a los ADNs genómico de <i>Homo sapiens sapiens</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> , respectivamente, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.	64
Anexo 13.	Resultados da la prueba de Kruskal Wallis comparando el efecto genotóxico <i>in vitro</i> de cuatro diferentes concentraciones frente a los ADNs genómico de <i>Homo sapiens sapiens</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> , respectivamente, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.	65
Anexo 14.	Matriz de consistencia.	66

Resumen

Este estudio descriptivo, se desarrolló en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de setiembre de 2014 a enero de 2015 en la ciudad de Ayacucho, Perú. Los objetivos planteados fueron determinar el efecto genotóxico *in vitro* de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua” o “piqui pichana” frente a ADN genómicos de: *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, e identificar sus metabolitos secundarios. El extracto hidroalcohólico fue obtenido con alcohol a 80°, realizándose el tamizaje fitoquímico y la determinación genotóxica a diferentes concentraciones, exponiéndose éstos sobre el ADN genómico de *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*; la estimación del daño genotóxico *in vitro* fue determinado con el “Método Tomasevich”, mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% y visualizado en radiación de luz ultra violeta dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra UVsolo TS. Los metabolitos secundarios identificados fueron: alcaloides, flavonoides, fenoles y/o taninos, lactonas y/o cumarinas y quinonas. El extracto hidroalcohólico presentó una importante actividad genotóxica sobre el ADN genómico de *Candida albicans*, *Homo sapiens sapiens* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente, siendo las concentraciones de 100 mg/mL y 50 mg/mL con mayor efecto genotóxico. Se concluye que el daño genotóxico *in vitro*, no revela diferencia estadística ($p=0,190$) de su efecto, frente a los ADNs genómico de *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Las concentraciones del extracto hidroalcohólico, sí influye en la actividad genotóxica *in vitro*, frente a cada ADN genómico de *Homo sapiens sapiens* ($p=0,006$), *Candida albicans* ($p=0,045$) y *Staphylococcus aureus* ($p=0,006$), determinados por la prueba de Kruskal Wallis.

Palabras clave: Genotoxicidad, *Schkuhria pinnata*, *Homo sapiens sapiens*, *Cándida albicans*, *Staphylococcus aureus*.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son utilizadas por billones de personas en la mayor parte de los países en vías de desarrollo, debido a la carencia de asistencia de los servicios de salud, su bajo costo y efectividad, así como las creencias y preferencias culturales.¹

Uno de los problemas que actualmente enfrentan los tratamientos médicos a las infecciones crónicas micóticas y bacterianas, que resultan ser prolongados y en muchos casos sin resultados óptimos, se presenta el uso de los productos de origen vegetal como una alternativa frente a este problema. La incidencia de infecciones oportunistas, incluyendo infecciones por hongos, también ha aumentado. Como resultado, la terapia antifúngica y antibacteriana está jugando un papel muy importante en el cuidado de la salud y el tamizaje de plantas medicinales en busca de nuevas alternativas terapéuticas, es ahora más frecuente. Esta búsqueda de nuevos agentes se basa en gran parte, en información etnobotánica y etnofarmacológica.²

El Perú presenta una riqueza y megadiversidad de plantas medicinales nativas, desde la época pre incaica hasta la actualidad. Siendo éstas utilizadas en forma empírica por sus bondades terapéuticas en el cuidado y restauración de la salud, debido a la actividad farmacológica que poseen, pero a la vez pudiendo ocasionar

toxicidad en el organismo humano, dependiendo de la dosis y vía de administración.¹

La justificación para el presente estudio, es que en nuestra región, sobre todo en las comunidades campesinas, *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua" o "piqui pichana" es recurrida para el tratamiento de diversos males, dosificándose por vía oral y dérmica; si bien posee el efecto curativo, aún se desconoce muchos aspectos de sus principios activos, tampoco puede descartarse la posibilidad que a determinadas concentraciones genere toxicidad.¹

Aunque las plantas medicinales tienen propiedades terapéuticas, algunos de los extractos de las plantas superiores constituyen mezclas complejas que contienen un gran número de sustancias con propiedades mutagénicas y carcinogénicas, y su uso constante ha sido correlacionado con la ocurrencia de enfermedades en las poblaciones, de ahí el peligro potencial que encierra el consumo indiscriminado de fármacos de origen vegetal, debido a los escasos datos que se poseen sobre la acción mutagénica de las plantas medicinales consumidas por la población.¹

Es por ello que el estudio de las plantas medicinales sugiere una ruta para su evaluación que consta de: selección de las plantas a investigar, identificación botánica correcta, características fitoquímicas mínimas, estudio farmacológico y estudio toxicológico, para decidir si se continúa o se abandona el uso tradicional.²

Por esto resulta trascendental estudiar las plantas tóxicas como fuente de productos activos, una de las formas de evaluación de toxicidad está dada por su efecto sobre el patrimonio genético, nivel de análisis propio de la "genética toxicológica".²

La genética toxicológica estudia los efectos mutagénicos de sustancias químicas y radiaciones, así como las consecuencias para la salud humana de la exposición a mutágenos, considerando como tal a cualquier agente que induzca mutación genética, aberraciones cromosómicas estructurales o numéricas, alteraciones al

ADN (formación de aductos, alquilación de bases, intercalamiento de bases), mecanismos de reparación (incrementando la sensibilidad a los efectos de muchos mutágenos) y eventos de recombinación mitótica.³

La importancia del presente estudio se establece en que: si bien *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua” o “pique pichana”, es una planta que en la medicina folklórica se emplea las hojas, tallos y flores, por ser considerada como depurador sanguíneo, con propiedades de protector hepático, así mismo para el tratamiento de dermatitis sobre todo en acné juvenil, posee actividad antibacteriana, acción antiinflamatoria, regulador hormonal y de grasas, también como antipruriginoso en pacientes con urticaria^{1,2}, se desconoce los efectos colaterales que podrían ocasionar como la citotoxicidad y genotoxicidad por efecto de los metabolitos secundarios, entre ellos aquel que puede causar daño a nivel del ADN de las células del organismo que está recibiendo el tratamiento directamente con estas plantas o con los productos procesados, por lo que es necesario conocer si estas pueden estar ejerciendo este efecto sobre el ADN y a qué concentraciones se puede presentar.²

Las pruebas de toxicidad se realizan con el fin de identificar posibles daños para el ser humano debido a que, se ha detectado extractos de plantas medicinales que poseen actividad embriotóxica y/o teratogénica, y se ha reportado actividad mutagénica y carcinogénica en productos de origen vegetal (flavonoides y taninos), encontrándose que existe una correlación positiva entre la ocurrencia de enfermedades y tumores en la población.³

El uso de las plantas medicinales en la terapéutica requiere, al igual que los productos sintéticos, de investigaciones previas y posteriores a su

comercialización, donde sigan siendo observadas mediante estudios de farmacovigilancia.²

El presente trabajo de investigación tiene por finalidad comparar la genotoxicidad *in vitro*, de la planta medicinal *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua” o “piqui pichana” frente al ácido desoxirribonucleótido (ADN) genómicos de: *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*.

Este hecho motivó a realizar el presente estudio, con el propósito de determinar el efecto genotóxico de los metabolitos secundarios extraídos de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua” o “piqui pichana”, frente a ADN genómico de: humano, porque es el organismo que recepciona la dosificación cualquiera sea la vía, *Candida albicans*, porque es un hongo oportunista que habita en la piel, y *Staphylococcus aureus*, por ser una bacteria relacionada al acné.

Al demostrar su genotoxicidad, estamos advirtiendo el riesgo que constituye su administración descontrolada, como una contribución en el desarrollo del modelo de atención integral en salud, basado en familia y comunidad.

¿Cuáles serán las similitudes y diferencias de la genotoxicidad *in vitro* de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua” o “piqui pichana” frente a ADN genómicos de: *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*?

El extracto hidroalcohólico de la planta medicinal *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua” o “piqui pichana”, presenta similitudes y diferencias en la genotoxicidad *in vitro* frente a ADN genómicos de: *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*.

El daño genotóxico *in vitro* fue evaluado con el “Método Tomasevich”, mediante electroforesis en gel de agarosa, utilizando el ADN genómico de los tres organismos en estudio.

Como parte del estudio farmacológico y toxicológico de esta planta, en el presente trabajo se formuló los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Comparar la genotoxicidad *in vitro* de la planta medicinal *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua” o “piqui pichana”, frente a ADN genómicos de: *Homo sapiens sapiens*, *Cándida albicans* y *Staphylococcus aureus*.

Objetivos Específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios en extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua” o “piqui pichana”.
- Contrastar similitudes y diferencias de la genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de la planta medicinal en estudio, frente a ADN genómicos de: *Homo sapiens sapiens*, *Cándida albicans* y *Staphylococcus aureus*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

En cuanto a los trabajos de investigación realizados referente a la planta en estudio, podemos mencionar:

Miranda y col.⁴ realizaron un estudio fitoquímico de la planta completa tallos, hojas y flores de *Schkuhria octaristata* "piqui pichana", detectó la presencia de los siguientes metabolitos secundarios: alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos libres y taninos.

Carballo³ en su estudio realizado en el Centro de Investigación en Citogenética Humana y Genética Toxicológica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, Argentina, cita entre los principios activos de origen vegetal más utilizados en terapéutica, son las extraídas de *Chenopodium multifidum* L. (Chenopodiaceae); *Lithraea molleoides* Vell. Engl. (Anacardiaceae); *Styphnolobium japonicum* L. Schott. (Fabaceae); *Prosopis alba* Gris (Mimosaceae); *Schkuhria pinnata* (Lam.) (Asteraceae); *Solanum sisymbriifolium* Lam. (Solanaceae). En este estudio realiza un relevamiento de las hierbas medicinales, así como un sondeo a nivel genotóxico mediante el ensayo de electroforesis de una sola célula con los extractos de estas plantas mencionadas. En los ensayos realizados, se determinó que cuatro de ellas, *Chenopodium multifidum* (paico); *Schkuhria pinnata* (canchalagua), *Solanum sisymbriifolium*

(espino colorado) y *Lithraea molleoides* (Molle de beber), indujeron daño al ADN, induciendo roturas de cadena simple y doble. De esta forma se verifica la necesidad de regulación en el consumo masivo e indiscriminado de las plantas medicinales.

Furlan⁵, en su estudio compara el conocimiento y la utilización de plantas medicinales por pobladores rurales. En La Rancherita observa que *Dichondra microcalyx* es la especie que presenta mayor abundancia en el terreno. Por otro lado, la especie con mayor cantidad de menciones y uso efectivo es *Aloe saponaria*, utilizada principalmente como cicatrizante. Siguen en cantidad de menciones las especies *Schkuhria pinnata* ("canchalagua", con propiedades de protector hepático según los informantes; se prepara como té toda la planta), *Achyrocline satureoides* ("vira vira", "marcela", utilizada para resfríos y afecciones de las vías respiratorias), *Equisetum giganteum* ("cola de caballo", se utiliza "para los riñones") y *Usnea spp.* ("barba de piedra", cuyo uso está muy difundido para "curar úlceras internas y externas").

Bussmann⁶, su estudio estuvo dirigido para investigar la actividad de las plantas tradicionalmente usadas contra el acné en el norte del Perú. Se han identificado varias bacterias, especialmente *Propionibacterium acnes* como uno de sus agentes causantes y *Staphylococcus epidermis* usualmente ocasionando infecciones superficiales. El tratamiento del acné en medicina occidental causa a menudo efectos secundarios como irritaciones a la piel. Perú tiene una variedad de plantas que demuestran tener propiedades antibacterianas y antiinflamatorias. Se realizó una encuesta a los herbalistas del mercado Mayorista de Trujillo Perú. El estudio encontró que la "canchalagua" *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze, "hercampuri" *Gentianella alborosea* (Gilg.) Fabris y "corpus way" *Gentianella bicolor* (Wedd.) J. Pringle, poseen propiedades antibacterianas contra

Staphylococcus aureus, corroborando que estas plantas medicinales son prometedoras contra el acné.

Añanca⁷ Determinó el efecto antibacteriano del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa*, en concentraciones que corresponden a 17.5, 16.25, 15, 13.75, 12.5, 11.25, 10, 8.75, 7.5, 6.25 µg/ml, en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, usando inóculos estandarizados con el Nefelómetro de McFarland N° 0.5. Se encontró que se inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* cuyo CMI fue de 12.5 µg/mL y el CMB fue de 15 µg/mL; para la inhibición de *Staphylococcus pyogenes* el CMI fue de 13.7 µg/mL y el CMB fue de 16.25 µg/mL. Se determinó que el extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* "tara" tiene actividad antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus pyogenes*.

Ayala⁸. Estudió el efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antibacterianas *Spartium junceum* L. "retama", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto". Los resultados demuestran que los extractos hidroalcohólicos de estas dos plantas tienen efecto genotóxico sobre ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, donde el tiempo de incubación a una y cuatro horas, no influye en el efecto; mientras que las concentraciones de los extractos, sí influyen en el efecto genotóxico.

Pillaca⁹. En su estudio demostró el efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antivirales *Ficus carica* "higo" y *Euphorbia peplus* "leche leche". Los resultados revelan que el látex de estas dos plantas tienen efecto genotóxico sobre ADN genómico de linfocitos humano, donde el tiempo de incubación a una y cuatro horas, no influye en el efecto; mientras que las concentraciones de los extractos, sí influyen en el efecto genotóxico.

2.2. *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua”.

2.2.1. Clasificación taxonómica¹⁰

Se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

División	:	MAGNOLIOPHYTA
Clase	:	MAGNOLIOPSIDA
Subclase	:	ASTERIDAE
Orden	:	ASTERALES
Familia	:	ASTERACEAE
Género	:	<i>Schkuhria</i>
Especie	:	<i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze
Nombre Vulgar	:	“piqui pichana”, “canchalagua”.

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

2.2.2. Descripción botánica

Planta de 75 cm de altura, muy ramificada y tallos con estrías. Las hojas son muy angostas, están divididas en segmentos muy delgados, verticiladas, pinatisectadas, con segmentos lineal-filiformes, indumento eglanduloso y punteado-glanduloso . Tiene pequeñas cabezuelas agrupadas, las flores centrales son amarillas, rodean a cada cabezuela unas hojitas (involucro) verdes que están coloreadas de rojo, amarillo o morado en los bordes; estas flores se presentan, en capítulos completos o fragmentados, flores dimorfas, una pistilada con corola ligulada y el resto perfectas con corola tubulosas . Los frutos son secos y no se abren; aquenio, obpiramidal, tetrágono con 8 páleas ovadas, místicas o aristadas.¹¹

De origen desconocido, habita en clima templado de 1 875 msnm a más. Está asociada a la agricultura de riego y de temporal, así como a matorral xerófilo.

2.2.3. Distribución geográfica

Esta especie no es propia nuestra flora, es de amplia distribución geográfica en África y América. En América abarca desde Estados Unidos de Norteamérica, México, en Sudamérica Perú, Bolivia, Paraguay y Argentina.^{11,12}

2.2.4. Usos en la medicina tradicional

La *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua" o "pique pichana", es una planta medicinal conocida en países como México, Ecuador, Perú y Argentina; en la medicina folklórica se emplea las hojas, tallos y flores, por ser considerada como depurador sanguíneo, con propiedades de protector hepático, así mismo para el tratamiento de dermatitis sobre todo en acné juvenil, posee actividad antibacteriana, acción antiinflamatoria, regulador hormonal y de grasas, también como antipruriginoso en pacientes con urticaria.^{2,12}

2.2.5. Composición química

Las partes aéreas de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua", contienen los sesquiterpenos cromolaenólido, 3-beta-hidroxi-8-beta-(4'-5'-dihidroxi-tigloiloxi)-costunólido y dos derivados más del costunólido, encanabinólido, el derivado dehidrogenado del hemiacetol, dos derivados hidroxilados del germacradienólido, heliangólido, las hidrodorilactonas A, B y C, liliólido, schkuhripinatólidos A, B, C y D y un derivado de zaluzanín; el lignano schkuhrianol y el flavonoide pectolinarigenín.

En la raíz se han identificado dos componentes azufrados derivados de ditiín y tiofeno, el monoterpeno isobutirato de 4-5-dihidro-9-acetoxi-nerol y el alquino trideca-12-ene-2-4-6-8-10-pentaíno.^{13,14}

2.3. ADN genómico de *Homo sapiens sapiens*.

Uno de los más grandes descubrimientos científicos en biología es el del código genético. En este código, los seres vivos almacenan la información para conservar los rasgos característicos y las funciones que los identifican a través de generaciones de la misma especie. El ordenamiento típico de moléculas relativamente simples en secuencias de moléculas está escrito nuestro destino biológico, el color de la piel, el color de los ojos, etc., la protección contra algunas enfermedades o la susceptibilidad para otras y todo lo que nos puede suceder está en paquetes de información dentro del núcleo de las células.¹⁵

El genoma de un organismo es todo el material genético o ADN que está organizado en paquetes de información o genes. Los genes tienen la información codificada para la síntesis de proteínas. Las proteínas son las moléculas que dan las características morfológicas o estructurales a los organismos, esto es: qué apariencia tienen, qué funciones realizan y qué grado de especialización poseen, entre muchas otras. El principio aplica para organismos de una sola célula, como la bacteria, o a organismos pluricelulares complejos, como el humano. La información genética almacenada en el ADN y transferida al ARN durante el proceso de transcripción se presenta como un código de tres letras que dirigen la especificidad de los 20 aminoácidos y las de iniciación y terminación de la síntesis proteica. La síntesis se basa en ADN transcripción (de un gen) ARN, que luego se traduce a proteína.^{15,16}

El genoma del hombre contiene 3 gigabases, equivalente a 3 000 megabases (Mb) de pares de nucleótidos, pudiéndose diferenciar 80 000 genes en la especie humana, y un genoma intragénico y uno extragénico.^{15,16}

2.4. *Candida albicans*.

Es un hongo dimórfico, es decir, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C en el huésped y como hongo de aspecto filamentoso a 25°C en la naturaleza. Pertenece al filo Ascomycota y se reproduce de forma asexual por gemación. En forma de levadura presenta un aspecto de células redondas u ovaladas de 3-8 x 2-7 micras de tamaño, agrupadas en pequeños grupos, mientras que, en forma de hongo filamentoso, las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia de filamento de pseudo-hifas o pseudo micelo.¹⁷

El dimorfismo le permite evadir los mecanismos de defensa relacionados con la inmunidad celular del huésped. En forma de levadura se comporta como saprofito, conviviendo en simbiosis con el huésped, mientras que, en forma de hongo filamentoso se comporta como un parásito patógeno produciendo síntomas en el huésped.¹⁷

Macroscópicamente, en agar Sabouraud crece formando colonias blancas, blandas, cremosas y lisas.¹⁷

Es una infección cosmopolita. Se considera una de las infecciones oportunistas más frecuente en seres humanos. Su incidencia ha aumentado considerablemente en los últimos 20 años. Las levaduras son causantes del 7,45% de las micosis, el 25% de las micosis superficiales y 88% de las infecciones fúngicas nosocomiales. Afecta a individuos de cualquier edad, sexo o grupo étnico.¹⁷

Las levaduras del género *Candida* existen en la naturaleza, en el suelo y agua dulce, vegetales, frutas, exudado de árboles, granos y en general toda sustancia rica en hidratos de carbono simples. El sistema gastrointestinal humano tiene una población pequeña pero constante de *Candida albicans*. En el adulto, dos factores regulan el número de levaduras en el intestino: 1- otros miembros de la flora

intestinal que ejercen un control sobre la densidad de población de las levaduras (principalmente lactobacilos y bacterias anaerobias) a través de factores antimicrobianos, inhibidores de la adherencia, potenciales de óxido-reducción y competencia por los nutrientes disponibles y 2- la dieta, ya que la ingestión excesiva de frutas frescas, dulces u otros materiales fermentables darán lugar a un aumento considerable en el número de levaduras intestinales, particularmente de *Candida albicans*.¹⁷

2.5. *Staphylococcus aureus*

Los integrantes del género *Staphylococcus*, son cocos gram positivos, de 0.5-1.5 µm de diámetro, catalasa positivos, que se encuentran microscópicamente aislados, en pares, tétradas o formando racimos irregulares, inmóviles, facultativamente anaerobios, no formadores de esporas, generalmente no capsulados o con limitada formación de cápsula. Una especie representativa viene a ser el *Staphylococcus aureus*, es un coco que crece agrupado en racimos (de ahí su raíz "Staphylo"), es aerobio y anaerobio facultativo por lo que puede crecer tanto en una atmósfera con oxígeno y también sin el mismo, no presenta movilidad ni forma cápsula. Es capaz de crecer hasta con un 10% de sal común. El *Staphylococcus aureus* es un agente patogénico que actúa como microorganismo saprófito, se encuentra en la piel del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas de la piel caen puede causar enfermedad. Puede producir enfermedades que pone en peligro la vida como neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome del shock tóxico (SST) y sepsis.¹⁷

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

Fc, de las moléculas de la inmunoglobulina e interferir en la opsonización y fagocitosis. Las hialuronidasas son enzimas que hidrolizan el cemento intercelular de los tejidos, facilitando la diseminación de los microorganismos. Las exfoliatinas también tienen esta capacidad, pero su acción está limitada al estrato granuloso de la piel, produciendo ampollas y escaras en la epidermis. Las leucocidinas son exotoxinas que ejercen efectos tóxicos directos sobre los neutrófilos, granulación de los lisosomas celulares y muerte celular. Las enterotoxinas estafilocócicas, un grupo de proteínas termoestables de cadena simple con un peso molecular de 2 8000 a 3 5000 dalton, se dividen en siete tipos: A, B, C, C2, D, E y F. Las enterotoxinas A y B habitualmente se asocian con envenenamiento estafilocócico de alimentos humanos; la enterotoxina B por lo común es producida por cepas relacionadas con infecciones hospitalarias.¹⁷

2.6. Cuantificación y determinación de pureza de ADN

La pureza del ADN es un factor muy importante para los subsecuentes análisis moleculares. Existen en general métodos diferentes para medir la cantidad de ácidos nucleicos en solución entre los cuales podemos mencionar al método de absorbancia y el de fluorescencia.¹⁸

2.6.1. Espectrofotometría

La capacidad que tiene el ADN de absorber luz a una determinada longitud de onda (260 nm) permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico de la muestra. Si la densidad óptica (OD) es 1, corresponde a aproximadamente 50 µg/mL de cadena doble de ADN, entonces calculamos la concentración de ADN que tenemos en nuestras muestras, midiendo simplemente su absorbancia, sin necesidad de realizar una curva patrón. Las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 (principalmente por residuos de triptófano), así las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existen algún contaminante proteico. El cálculo de una relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm es una manera común para hacer

un estimado de la pureza o evaluar la contaminación de una preparación de ADN con proteínas de ácido nucleico, esta relación debe estar entre los valores de 1,8 y 2,0. Si la muestra es pura, el primer método comúnmente usado para la cuantificación es el de espectrofotometría.¹⁸

2.7. Electroforesis en gel

La electroforesis es la aplicación de las técnicas de separación de macromoléculas en un campo eléctrico en función de su tamaño y carga eléctrica superficial, se define como el método de separación de sustancias cargadas al aplicar un campo eléctrico, de modo que se diferencian en el comportamiento en un campo eléctrico. Aquellas partículas cargadas positivamente (cationes) migrarán hacia el cátodo y las cargadas negativamente (aniones) hacia el ánodo.¹⁸ Entre las macromoléculas, las más utilizadas son las proteínas seguidas de los ácidos nucleicos, ya que ambos tipos presentan una carga importante, algo que no presentan los lípidos, sin contar con que son insolubles. El método consiste en inmovilizar las muestras en estudio en un material gelatinoso (gel). El gel se somete a una corriente eléctrica durante un período de tiempo determinado. Cada muestra comenzará a migrar a través de los poros del gel con una velocidad diferencial, que dependerá de la carga eléctrica y del tamaño molecular. Cuando las separaciones se han completado se interrumpe el paso de corriente y las muestras separadas se tiñen para visualizarse. Cada muestra se encontrará a una distancia distinta respecto al origen. Los ácidos nucleicos presentan carga y son solubles ya que tienen un grupo fosfato, parte que confiere la carga, y está presente de forma regular en la estructura. Los ácidos nucleicos tienen la capacidad de migrar en un campo eléctrico y por tanto, son susceptibles de ser separados por electroforesis. El gel se encuentra sumergido en un electrolito tamponado con tris-Borato (no glicina), para garantizar que los ácidos nucleicos estén cargados negativamente; por esto a la técnica se le denomina electroforesis

de inmersión. Las moléculas migrarán hacia el polo positivo, de modo que viajarán en esa dirección por el gel, separándose por tamaño (nº de nucleótidos), a la hora de cargar la muestra se colocan unos marcadores de frente (loading dye) que nos permita detener la electroforesis en el momento que lo creamos oportuno. Para visualizar las bandas, hay que teñir el gel o marcar radiactivamente las moléculas. El método más utilizado en geles de agarosa es el bromuro de etidio, el cual se comporta como un agente intercalante, de modo que además de disminuir la densidad de la molécula, tiene la capacidad de emitir luz cuando se le excita con luz ultravioleta. Hay que tener cuidado con este compuesto ya que es altamente cancerígeno.¹⁸

La electroforesis en gel es muy utilizada en la detección, control de pureza, caracterización, cuantificación (por comparación con controles) así como preparación y purificación (por extracción de bandas desde el gel) de moléculas y fragmentos de DNA y RNA. Tiene dos mecanismos de separación: la electroforesis, que separa por la relación carga/tamaño y el tamizado por el gel, que separa mayormente por tamaño. Los geles más comunes son agarosa y poliacrilamida.¹⁸

2.8. Actividad genotóxica

La genética toxicológica estudia los efectos mutagénicos de sustancias químicas y radiaciones, así como las consecuencias para la salud humana de la exposición a mutágenos, considerando como tal a cualquier agente que induzca mutaciones génicas (cambio de uno o pocos pares de bases), aberraciones cromosómicas estructurales (cambios en la estructura) o numéricas (aneuploidías y poliploidías por afecciones en los componentes del aparato mitótico o meiótico) o alteraciones al ADN (formación de aductos, alquilación de bases, intercalamiento de bases), a los mecanismos de reparación (incrementando la sensibilidad a los efectos de muchos mutágenos), a los eventos de recombinación mitótica.¹⁹

Las plantas medicinales no llevan una indicación metodológica especial para su evaluación genotóxica, por lo que deben ser sometidas a las mismas regulaciones que rigen los fármacos en general. La evaluación genotóxica de extractos de plantas medicinales deben ser realizadas, en primera instancia, mediante ensayos *in vitro*, validados internacionalmente, que midan el daño en los niveles de mutaciones genéticas y cromosómicas.²⁰

En el mundo las guías o rutas críticas para los estudios genotóxicos persiguen como objetivo fundamental evidenciar qué tipo o a qué nivel de organización del ADN opera el daño causado por el compuesto evaluado. En concordancia con ello se reconocen cuatro niveles: mutación génica (nivel I), mutación cromosómica (nivel II), daño primario del ADN (nivel III), transformaciones celulares (nivel IV), entre otras alteraciones. Los ensayos pertenecientes a los dos primeros niveles son muy variados y ampliamente utilizados, en especial las pruebas *in vitro* que se caracterizan por tener una alta sensibilidad y precisión.⁴⁰ En los últimos años las pruebas para medir daño a nivel primario del ADN, han alcanzado gran importancia entre los análisis de genotoxicidad.¹⁹

Si los resultados *in vitro* son negativos, debe continuarse, en segunda instancia, con ensayos *in vivo* que respondan a los mismos niveles de daño genético que se evaluaron *in vitro*. Una vez evaluados los niveles génico y cromosómico, con ensayos *in vitro* e *in vivo*, se deben incluir ensayos que midan daño primario al ADN y de acuerdo con el resultado obtenido, se debe tomar la decisión de realizar ensayos que midan otras alteraciones y carcinogenicidad. En cualquiera de los ensayos y niveles de daño evaluados se deben emplear protocolos estandarizados (validados internacionalmente) que tomen en consideración las dosis, el tipo de exposición y la vía de administración propuesta para el fármaco.²⁰ Con el fin de detectar en sus etapas iniciales la acción sobre el material genético se utilizan las siguientes determinaciones *in vitro* que son muy utilizadas en el

campo de la investigación científica para detectar genotoxicidad inicial:
Aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas; micronúcleos,
síntesis de ADN no programada y electroforesis de una célula (ensayo cometa).¹⁹

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación se desarrolló en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH), durante los meses de setiembre de 2014 a enero de 2015 en la ciudad de Ayacucho.

La obtención del extracto hidroalcohólico y tamizaje fitoquímico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua”, la obtención de ADN genómico de *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, y los ensayos de genotoxicidad, se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática (CIBMB) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.2. Definición de población y muestra²¹

Población: Plantas de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua” o “pique pichana”, que crecen en la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga de la región Ayacucho.

Muestra:

- 1000 g de plantas frescas (tallos, hojas y flores) de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua”.

Unidad experimental:

- ADN genómicos de: *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, a una concentración de 1500 ng/μL por cada ensayo.

3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos

3.3.1. Recolección e identificación de la muestra.²²

Las muestras fueron recolectadas en la Ciudad Universitaria de la UNSCH distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga de la región Ayacucho, en horas de la mañana y fueron inmediatamente transportadas al laboratorio del CIBMB, donde fueron secadas a temperatura ambiente bajo sombra previamente acondicionada, teniendo como base papel Kraft que fue cambiada constantemente y volteando la muestra para un secado uniforme, evitando el deterioro por la humedad y separando aquellas que cambien de color o muestren signos de alteración. Una vez secada la muestra, se trituró empleando una licuadora eléctrica, con la finalidad de reducir hasta un polvo fino y se procedió a realizar la preparación del extracto hidroalcohólico. Para la identificación taxonómica se empleó muestras con tallos, hojas y flores, se realizó en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas por la Blga. Laura Aucasime Medina.¹⁰ (Anexo 1)

3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico

Los 100 g de muestra seca y pulverizada de la planta medicinal en estudio, se maceró en un frasco de vidrio color ámbar por siete días, para ello se utilizó 1 L de alcohol a 80° y cubrir a la muestra por lo menos con 1 cm de diferencia; durante el proceso se agitó el frasco por 15 minutos dos veces al día para que el alcohol se distribuya homogéneamente en la muestra. Las muestras en maceración se mantuvieron en un lugar fresco y oscuro. Luego se procedió a filtrar con ayuda del papel filtro, se llevó a evaporación del solvente en baño maría marca Memmert a 37°C y se concentró a sequedad en una estufa Memmert a 37°C, hasta obtener el

producto con textura de "pasta". A partir de éste extracto se realizó el tamizaje fitoquímico y ensayos de genotoxicidad.^{22, 23}

3.3.3. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua".

Se realizó una marcha fitoquímica al extracto hidroalcohólico obtenido de la planta medicinal en estudio, para determinar la presencia de los diferentes metabolitos secundarios, que se fundamentan en los cambios estructurales ocasionados en los metabolitos presentes, como aparición o desaparición de una coloración, formación o dilución de un precipitado o desprendimiento de gas.^{22, 23} (Anexo 2 y 3).

3.4. Extracción de ADN genómico de linfocitos humanos:

Una unidad de bolsa colectora de sangre "cuádruple" fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos (bolsa para descarte), se consiguió en donación del Banco de Sangre del Hospital Regional de Ayacucho "Miguel Ángel Mariscal Llerena", para la obtención del ADN genómico de linfocitos.

Se desarrolló con el siguiente protocolo modificado por Miranda.²⁴

1. Se transfirió 1 ml de sangre (paquete globular) a un tubo de centrifuga con tapa rosca y se adicionó 9 ml del tampón Tris– HCL 50 mM (pH 7,7) precalentado a 37 °C.
2. Se homogenizó e incubó a 37 ° C por 30 minutos, se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos para sedimentar los linfocitos.
3. Se descartó el sobrenadante aspirándolo con una micropipeta, dejando 1 ml del centrifugado en la parte inferior del tubo.
4. Se repitió dos veces, los procedimientos 3 (esta vez con 5 ml de tampón Tris – HCl 50 mM (pH 7,7), 4 y 5 hasta tener un preparado claro.
5. A 1 ml del centrifugado, se adicionó 9 ml de solución salina (NaCl al 0,85%) se homogenizó y centrifugó a 2 500 rpm/ 10 minutos.

6. Se aspiró y descartó el sobrenadante dejando solo el sedimento, se resuspendió el paquete celular en 0,4 ml de la solución "high TE" (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 100 mM), luego se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
7. Se adicionó 0,4 ml de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 40 mM; SDS al 1%; NaCl 10 mM) precalentada a 50 °C.
8. Se agregó 7 µL de la solución de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó por una noche a 53 °C.
9. Luego se adicionó 750 µL de la solución cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y homogenizó por inversión, delicadamente durante 10 minutos.
10. Se instaló el tubo en la microcentrífuga por 10 minutos a 14 000 rpm para separar las fases, luego se aspiró la fase superior acuosa que contiene el ADN y transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1,5 ml.
11. A la fase acuosa, se adicionó 750 µL de la solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y homogenizó por inversión durante 5 minutos. Nuevamente se centrifugó por 10 minutos a 14 000 rpm, se aspiró la fase acuosa que contiene el ADN y transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2 ml.
12. Se adicionó la solución de acetato de sodio 3M, pH 5,2; en cantidad de 20 µL.
13. Se agregó 600 µL de alcohol isopropílico helado y dejó en reposo por 1 hora en hielo. Luego se centrifugó por 15 minutos a 14 000 rpm.
14. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y enjuagó el sedimento con 1 ml de etanol al 70%.
15. Se centrifugó nuevamente por 10 min a 14 000 rpm. Eliminando el alcohol y dejando secar el sedimento a temperatura ambiente.
16. Se resuspendió el sedimento con 80 µL de la solución "low TE" (Tris HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) y se guardó en la nevera a 4°C.

3.5. Extracción de ADN genómico de *Candida albicans*:

Se realizó la reactivación de la cepa *Candida albicans* en caldo Sabouraud y luego se cultivó en placa de Petri con Agar Sabouraud, con la finalidad de obtener una masa celular micótica y extraer el ADN genómico con el siguiente protocolo: ^{24, 25}

1. Se colocó 400 μ L de buffer TE 1X a un tubo eppendorf de 2 mL y en ella se transfirió con un asa de kolle aproximadamente 100 mg de masa celular del cultivo joven de *Candida albicans*.
2. Se incubó en baño maría a 85° C por 25 minutos.
3. Luego se adicionó SDS/proteinasa K (100 μ L SDS 10% + 5 μ L PK 10 mg/mL) y se incubó en baño maría a 65 °C por 30 minutos.
4. Se aumentó 100 μ L NaCl 5M más 5 μ L de CTAB (N-cetil-N, N, N-Trimetil bromuro de amonio), y se incubó en baño maría a 65 °C por 15 minutos.
5. Se agregó 750 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó agitando suavemente con la mano durante cinco minutos y se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos.
6. Luego de la formación de dos capas en el tubo eppendorf, se trasvasó cuidadosamente el sobrenadante a otro tubo eppendorf.
7. Se adicionó 600 μ L isopropanol helado al 100%, luego se llevó a refrigeración a – 20 °C por una noche.
8. Se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante.
9. Se añadió 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos.
10. Se descartó el sobrenadante y se dejó en la estufa a 37° C por media hora, para evaporar el resto de alcohol.
11. Se rehidrató el sedimento con 80 μ L de TE 0.1X, luego se dejó en baño maría a 37°C por una hora, para que el ADN se extienda en el buffer.
12. Se agregó 1 μ L ARNasa de 20 mg/ μ L y se incubó en baño maría a 37°C durante una hora.

13. Luego se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

3.6. Extracción de ADN genómico de *Staphylococcus aureus*:

Se realizó la reactivación y cultivo de la cepa *Staphylococcus aureus*, en caldo Trypticase soya y luego en Agar Trypticase soya, respectivamente, con la finalidad de obtener una masa celular bacteriana y extraer el ADN genómico con el siguiente protocolo: ^{24, 25}

1. Se colocó 400 μL de buffer TE 1X a un tubo eppendorf de 2 mL y en ella se transfirió con un asa de kolle aproximadamente 100 mg de masa celular del cultivo joven de *Staphylococcus aureus*.
2. Se añadió 60 μL de lisozima (10 mg/mL) y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dos horas en baño maría.
3. Luego se adicionó SDS/proteinasa K (75 μL SDS 10% + 5 μL PK 10 mg/mL) y se incubó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.
4. Se aumentó 100 μL NaCl 5 M más 5 μL de CTAB (N-cetil-N, N, N-Trimetil bromuro de amonio), y se incubó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.
5. Se agregó 750 μL de cloroformo : alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó agitando suavemente con la mano durante cinco minutos y se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos.
6. Luego de la formación de dos capas en el tubo eppendorf, se trasvasó cuidadosamente el sobrenadante a otro tubo eppendorf.
7. Se adicionó 600 μL isopropanol helado, luego se llevó a refrigeración a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por una noche.
8. Se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante.
9. Se añadió 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 14000 rpm por diez minutos.
10. Se descartó el sobrenadante y se rehidrató el sedimento con 100 μL de agua bidestilada estéril, luego se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

3.7. Cuantificación de ADN genómico de *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*:

3.7.1. Por espectrofotometría. ^{24, 25}

Procedimiento:

1. Se homogenizó lentamente las muestras de ADN con una micropipeta de 100 μL , por diez veces.
2. Se preparó el espectrofotómetro UV marca Eppendorf Bio Photometer plus, con la opción de cuantificar el ADN.
3. Para limpiar la superficie de muestra del adaptador se depositó 2 μL de agua bidestilada estéril y se absorbió el agua utilizando papel tizú, para mejor limpieza se repitió por dos veces.
4. Nuevamente se depositó 2 μL de agua bidestilada estéril sobre la superficie del adaptador, se colocó la tapa de factor 50 – Lp 0,2 mm y se presionó la opción BLANK para calibrar y obtener “cero de Absorbancia” (0.000 A°).
5. Se absorbió el agua utilizando papel tizú, luego se depositó 2 μL de la muestra de ADN, se colocó la tapa y presionó la opción SAMPLE para ver el resultado de la cuantificación y pureza de ADN en la pantalla del equipo; luego se absorbió la muestra con papel “tizú”.
6. Se repitió los pasos 4 y 5 para la cuantificación de cada muestra de ADN.
7. Terminada la cuantificación de ADN, se depositó 2 μL de agua bidestilada estéril, se secó con papel “tizú” y se apagó el equipo.

3.7.2. Por electroforesis

El ADN obtenido, puede ser visualizado por electroforesis, realizando los siguientes pasos:

1. A partir de la muestra de ADN, se procedió a preparar volúmenes de carga para electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, según la siguiente tabla:

Tabla 1. Preparación de carga de ADN para visualización de banda en electroforesis. Ayacucho, 2015.^{24, 25}

Nº de carril en gel de agarosa	ADN stock (µL)	Buffer Loading 6X (µL)	Volumen de agua PCR (µL)	Volumen final de carga (µL)
1	4	1	7	12

2. Se cargó todo el contenido de las mezclas a cada uno de los pocillos del gel de agarosa al 1%, en sus respectivos carriles.
3. Luego se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se dejó correr a 50 voltios por dos horas.
4. Se coloreó el gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% por diez minutos y dos enjuagues suaves con agua corriente, luego se visualizó por radiación en UV en el sistema de registrador de imágenes marca Biometra UV solo TS. Adicionalmente se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; en ambos casos para visualizar las bandas de ADN a diferentes concentraciones.²⁴

3.8. Ensayos de la genotoxicidad *in vitro*, “método Tomasevich”:

Se desarrolló siguiendo el “método Tomasevich” propuesto por Miranda²⁴; con las siguientes fases:

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

El ADN genómico obtenido (para cada uno de los organismos en estudio), fue cuantificado por espectrofotometría UV marca Eppendorf BioPhotometer plus; luego se preparó un stock a concentración de 1 500 ng/µL en volumen final de 150 µL, para cada planta medicinal en estudio.²⁴

- Fase de ensayo de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua”, sobre el ADN genómico del organismo en estudio.

Se preparó las soluciones de los extractos hidroalcohólico de la planta medicinal en estudio *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua”, a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, con agua bidestilada estéril.

Se acondicionó las mezclas para ensayo de genotoxicidad *in vitro* de ADN genómico (para cada uno de los organismos en estudio), de acuerdo al detalle siguiente:

Tabla 2. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad *in vitro* de extracto de planta medicinal, sobre ADN genómico. Ayacucho, 2015.²⁴

Condiciones	Mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>					
Nº de tubo	1	2	3	4	5	6
Stock de ADN (1 500 ng/µL) Volumen en µL	14	14	14	14	-	14
Extracto hidroalcohólico	Concentración (mg/mL)	5	10	50	100	100
	Volumen (µL)	6	6	6	6	20
Agua bidestilada estéril	-	-	-	-	-	6
Volumen total (µL)	20	20	20	20	20	20
Incubación en baño María a 37°C	1 hora					

Se realizaron cuatro repeticiones de los ensayos de genotoxicidad *in vitro*, de la planta medicinal en estudio.

- **Fase de electroforesis para la detección de genotoxicidad.**

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

Para el volumen de carga en gel de agarosa, se utilizó las siguientes cantidades: 1 μ L de *loading* (colorante señalizador de migración de las bandas), 4 μ L de la solución para la prueba de genotoxicidad *in vitro* y 2 μ L de agua bidestilada estéril, volumen final 7 μ L; se mezcló y se cargó en el respectivo pozo del gel de agarosa para electroforesis.

Se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y programó a 30 voltios (V) por cinco horas.²⁴

- **Fase de radiación UV para la visualización de genotoxicidad.**

Luego del tiempo de corrido electroforético, se sumergió el gel de agarosa en una solución de bromuro de etidio al 1% durante diez minutos aproximadamente, se enjuagó con agua corriente dos veces y para visualizar las bandas y/o fragmentos de ADN productos de la genotoxicidad, se colocó el gel en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra *UVsolo TS*.²⁴

Adicionalmente se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; en ambos casos para visualizar las bandas de ADN a diferentes concentraciones.²⁴

- **Fase de interpretación y clasificación del registro visual de genotoxicidad.**

La escala de los valores numéricos correspondientes a los niveles de fragmentación del ADN como producto de la genotoxicidad, visualizados en el

registro fotográfico, fueron basados en la clasificación del “ensayo cometa” propuesto por Speit (1995) y Collins (2004), en tesis de Mónica Marisol Larrea Poma.²⁶

Tabla 3. Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.

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

Fuente: Larrea Poma M., 2007

3.9. Análisis de datos

Los datos fueron agrupados y presentados en tablas, expresados en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. El daño genotóxico se evaluó mediante el paquete estadístico SPSS, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para más de dos muestras independientes. El valor de $p \leq 0,05$, se consideró como el nivel estadísticamente significativo.²¹

IV. RESULTADOS

Tabla 4. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua”. Ayacucho, 2015.

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

Leyenda:

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

Tabla 5. Cuantificación por espectrofotometría ultra violeta marca Eppendorf Bio Photometer plus de ADN genómico obtenido mediante extracción orgánica. Ayacucho, 2015.

Organismo	Muestra	Concentración ADN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ADN	Proteínas	Pureza de ADN
			A 260	A 280	A260/A280
<i>Homo sapiens</i> <i>sapiens</i>	1	1987,6	0,763	0,399	1,91
	2	2180,0	0,912	0,480	1,90
<i>Candida albicans</i>	1	2479,2	0,978	0,557	1,76
	2	1934,7	0,654	0,352	1,86
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	1	1558,6	0,583	0,300	1,94
	2	2610,7	1,048	0,596	1,76

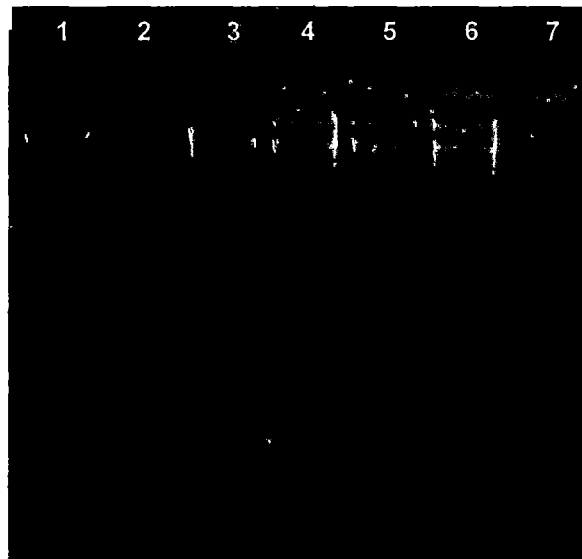


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de muestras del ADN genómico obtenido mediante extracción orgánica. Ayacucho, 2015.

Leyenda:

Carril 1: Muestra 1 de *Homo sapiens sapiens*.

Carril 2: Muestra 2 de *Homo sapiens sapiens*.

Carril 3: Muestra 1 de *Candida albicans*.

Carril 4: Muestra 2 de *Candida albicans*.

Carril 5: Muestra 1 de *Staphylococcus aureus*.

Carril 6: Muestra 2 de *Staphylococcus aureus*.

Carril 7: Marcador de tamaño molecular de 1kb.

Volumen de carga:

Muestra (4 μL) + colorante (1 μL) + agua bidestilada estéril (7 μL) = 12 μL

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por 1 hora con 30 minutos.

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

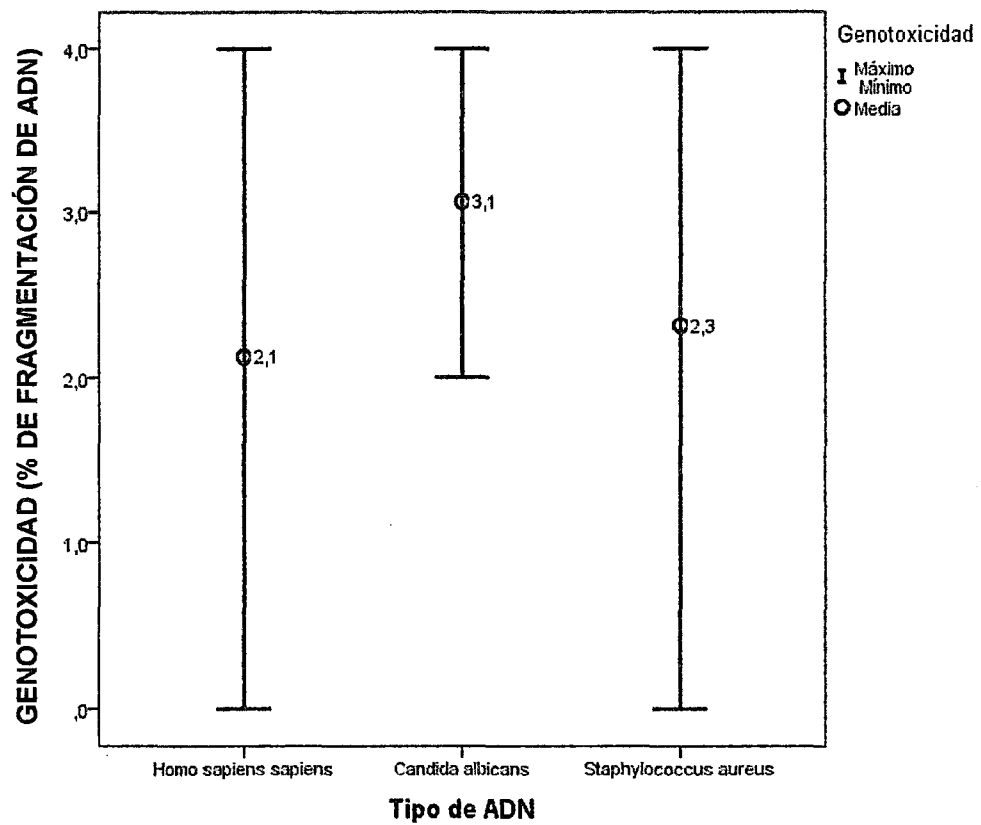


Figura 2. Prueba de Kruskal Wallis para el efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua", frente a los ADNs genómico de *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.



Figura 3. Electroforesis del producto de la genotoxicidad *in vitro* de extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua" a diferentes concentraciones, sobre el ADN genómico de *Homo sapiens sapiens*, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.

Leyenda:

Carril 1: Con 100 mg/mL de extracto.

Carril 2: Con 50 mg/mL de extracto.

Carril 3: Con 10 mg/mL de extracto.

Carril 4: Con 5 mg/mL de extracto.

Volumen de carga:

Muestra (4 μ L) + colorante (1 μ L) + agua bidestilada estéril (2 μ L) = 7 μ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

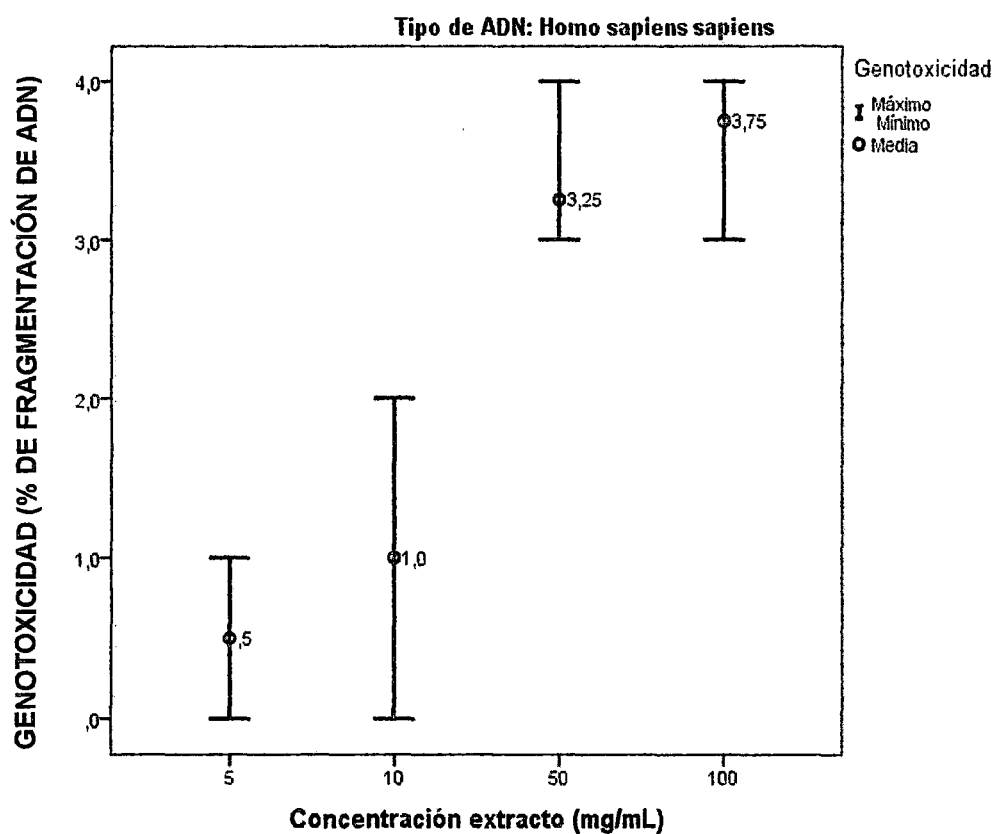


Figura 4. Prueba de Kruskal Wallis para el efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua" a diferentes concentraciones, sobre el ADN genómico de *Homo sapiens sapiens*, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.



Figura 5. Electroforesis del producto de la genotoxicidad *in vitro* de extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua" a diferentes concentraciones, sobre el ADN genómico de *Candida albicans*, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.

Leyenda:

Carril 1: Con marcador de tamaño molecular 100pb.

Carril 2: Con 100 mg/mL de extracto.

Carril 3: Con 50 mg/mL de extracto.

Carril 4: Con 10 mg/mL de extracto.

Carril 5: Con 5 mg/mL de extracto.

Volumen de carga:

Muestra (4 μ L) + colorante (1 μ L) + agua bidestilada estéril (2 μ L) = 7 μ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

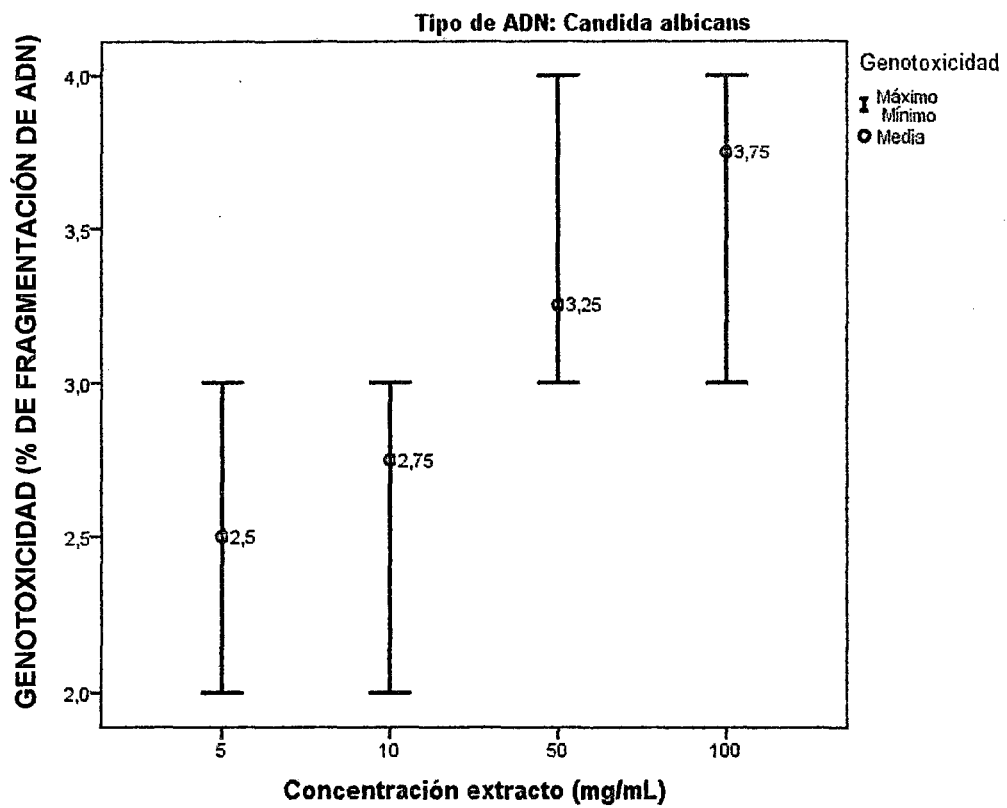


Figura 6. Prueba de Kruskal Wallis para el efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua" a diferentes concentraciones, sobre el ADN genómico de *Candida albicans*, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.

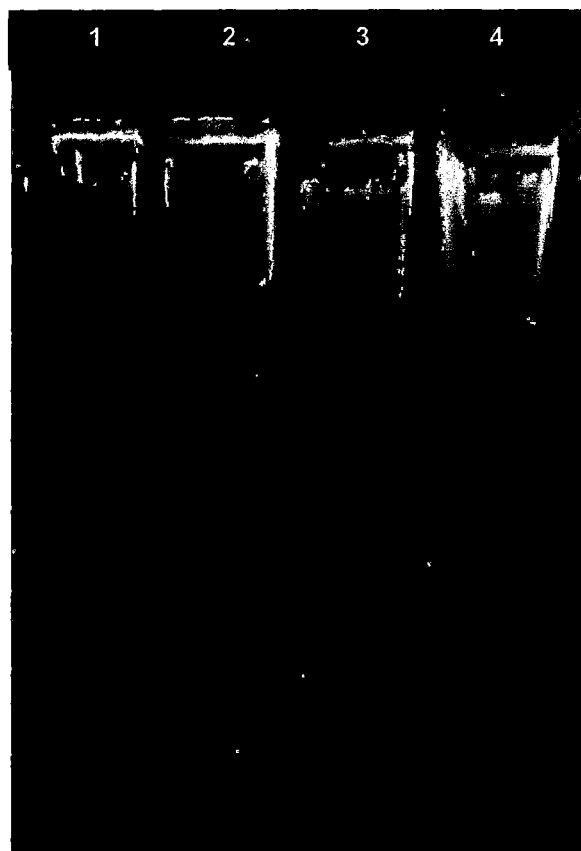


Figura 7. Electroforesis del producto de la genotoxicidad *in vitro* de extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua" a diferentes concentraciones, sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.

Leyenda:

Carril 1: Con 100 mg/mL de extracto.

Carril 2: Con 50 mg/mL de extracto.

Carril 3: Con 10 mg/mL de extracto.

Carril 4: Con 5 mg/mL de extracto.

Volumen de carga:

Muestra (4 μ L) + colorante (1 μ L) + agua bidestilada estéril (2 μ L) = 7 μ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por cinco horas.

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

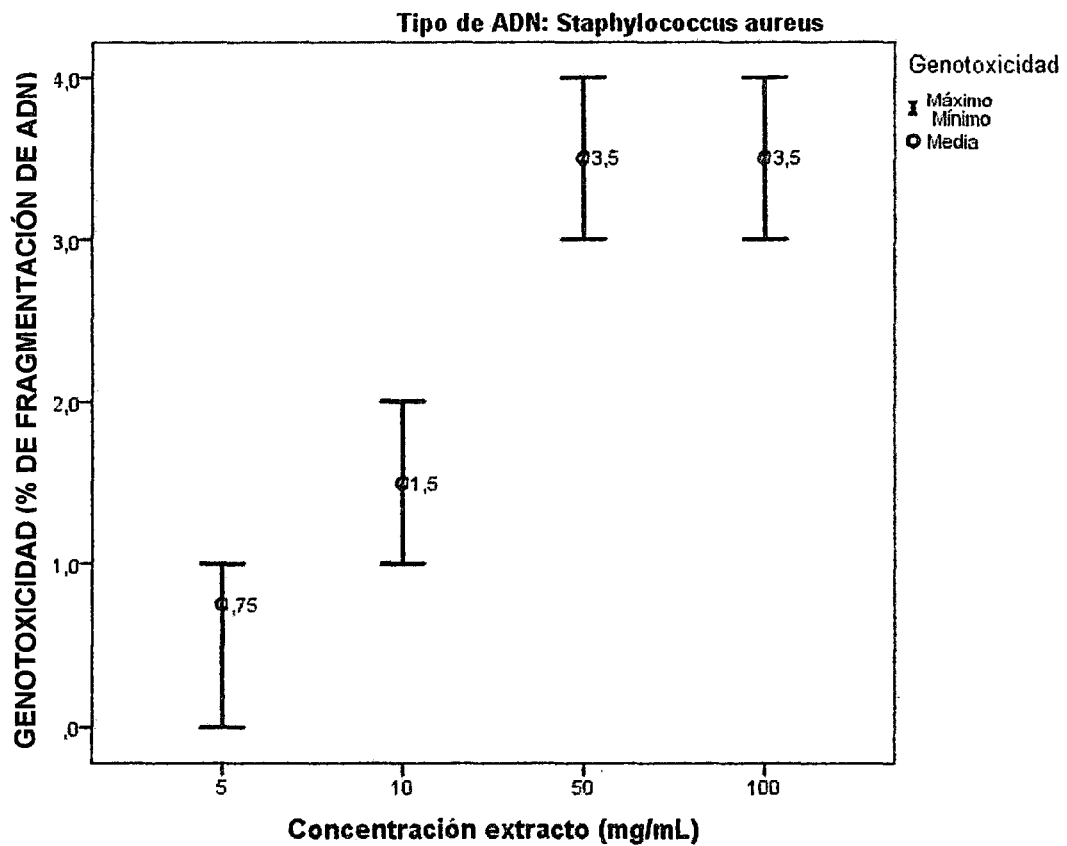


Figura 8. Prueba de Kruskal Wallis para el efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua" a diferentes concentraciones, sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.

V. DISCUSIÓN

El tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico del tallo, hojas y flores de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua", muestra la tabla 4, con presencia de alcaloides, flavonoides y fenoles y/o taninos, en concentración abundante, el resultado positivo para identificar alcaloides fue la presencia de precipitado con el reactivo de Wagner, con la reacción de Shinoda el cambio de color de amarillo a rojo indicó la presencia de flavonoides, los compuestos fenólicos y/o taninos fueron detectados por el intenso color verde, azul o negro que producen cuando se le agregó el cloruro férrico al 1%; en concentraciones moderadas se identificó lactonas y/o cumarinas y quinonas, con la prueba de Baljet identificó lactonas y/o cumarinas resultando un precipitado de color naranja a rojo y para la identificación de quinonas una coloración rojiza al ejecutar la prueba de Borntrager, fue considerado positivo.^{22,23} Estudios desarrollados por otros autores corroboran la presencia de estos metabolitos encontrados al realizar el tamizaje fitoquímico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze, así como el de Miranda y col.⁴ en el estudio fitoquímico de la planta completa tallos, hojas y flores de *Schkuhria octaristata* "piqui pichana".⁴

La tabla 5 es referido a la cuantificación mediante espectrofotometría, del ADN genómico extraído del *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus*

aureus, con 2 muestras por cada uno de los organismos, la cuantificación de ADN se realizó con A 260 y para las proteínas con A 280. Las concentraciones de ADN obtenidos va desde 1 558,6 µg/mL hasta 2 610,7 µg /mL, el nivel de pureza óptimo debe ser entre 1,8 a 2,0 y se observa que cuatro de ellas están dentro de ese rango con excepción de la tercera y sexta muestra, pero las concentraciones obtenidas son altas y el nivel de pureza es aceptable.

La figura 1 es el registro fotográfico, que nos muestra la integridad y concentración de ADN que se ha obtenido de los 3 organismos utilizados para el presente estudio, fue corrido en gel de agarosa 0,8%, las concentraciones en los carriles 1 y 2, son similares que corresponden al ADN extraído de linfocitos humanos, los carriles 3 y 4 con una mayor concentración corresponde a cultivos jóvenes de *Candida albicans*, y los carriles 5 y 6 corresponden a las muestras obtenidas de cultivos jóvenes de *Staphylococcus aureus*. Estas bandas coinciden directamente con las concentraciones determinadas por el método de espectrofotometría UV. Para hacer el corrido electroforético en el gel de agarosa 0,8% se realizó una dilución de 1 en 10 de la muestra de ADN obtenido de cada organismo y esto nos permitió ver las bandas bien definidas, aun así se ve que es bastante concentrado el contenido de ADN motivo por el que éstas quedan en los pocillos donde se ha sembrado.

En la figura 2, se grafica los resultados de la prueba de Kruskal Wallis, demostrando que no existe diferencia estadística ($p=0,190$) del efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua", frente a los ADNs genómico de *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente; por tanto, no hay diferencia en la actividad genotóxica ante el ADN de cada uno de estos tres organismos, estos son afectados en forma general; correlacionando con la valoración numérica de la genotoxicidad (Tabla 3), es de amplio rango desde menor a 5%

hasta mayor que 95% de fragmentación del ADN para *Homo sapiens sapiens* y *Staphylococcus aureus* con media de 2,1 y 2,3, respectivamente; mientras que para *Candida albicans*, el rango va fragmentación de ADN va entre 20 a 40% hasta mayor del 95%, con media de 3,1.

Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Carballo² que en su estudio realizó un relevamiento de las hierbas medicinales, así como un sondeo a nivel genotóxico mediante el ensayo de electroforesis de una sola célula con los extractos de seis plantas. En los ensayos realizados, determinó que cuatro de ellas, *Chenopodium multifidum* (paico); *Schkuhria pinnata* (canchalagua), *Solanum sisymbriifolium* (espino colorado) y *Lithraea molleoides* (Molle de beber), indujeron daño al ADN, induciendo roturas de cadena simple y doble. De esta forma se verifica la necesidad de regulación en el consumo masivo e indiscriminado de las plantas medicinales.

El registro fotográfico de la figura 3, electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad *in vitro* manifestado por la fragmentación del ADN genómico de *Homo sapiens sapiens* a concentración inicial de 1 500 ng/ μ L, por efecto del extracto hidroalcohólico extraído de los tallos, hojas y flores de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, que fueron incubados en baño maría a 37°C durante 1 hora; el carril 1 muestra el producto de la genotoxicidad de mayor a 95%, el carril 2 fragmentación entre 40 a 95%, el carril 3 fragmentación entre 20 a 40% y el carril 4 fragmentación de 5 a 20%.

Los resultados de la prueba de Kruskal Wallis (Anexo 13), mostrados en la figura 4, determina la diferencia estadística ($p=0,006$) en la actividad genotóxica *in vitro* sobre el ADN genómico de *Homo sapiens sapiens*, dependiendo de la concentración del extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua", observándose que a 5 mg/mL y 10 mg/mL, son similares, con baja

actividad y medias de 0,5 y 1,0 respectivamente; mientras que a concentraciones de 50 mg/mL y 100 mg/mL muestran mucha mayor actividad genotóxica, con medias de 3,25 y 3,75 respectivamente y comportamiento cercano entre ambos. El efecto genotóxico sobre ADN genómico de linfocitos humanos con el método aplicado en el presente trabajo coinciden, con los resultados obtenidos por Pillaca⁹, en su estudio demostró el efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antivirales *Ficus carica* "higo" y *Euphorbia peplus* "leche leche". Los resultados revelaron que el látex de estas dos plantas tienen efecto genotóxico sobre ADN genómico de linfocitos humano, donde el tiempo de incubación a una y cuatro horas, no influye en el efecto; mientras que las concentraciones de los extractos, sí influyen en el efecto genotóxico.

El registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1% de la figura 5, nos muestra los productos de la genotoxicidad *in vitro* expresado por la fragmentación del ADN genómico de *Candida albicans* a concentración inicial de 1 500 ng/μL, por efecto del extracto hidroalcohólico extraído de los tallos, hojas y flores de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua" a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, que fueron incubados en baño maría a 37°C durante 1 hora; el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (DNA Ladders -100bp) que muestra las bandas de abajo hacia arriba con 100pb, 200pb, 300pb, 400pb, 500pb, claramente visibles, y luego de 600pb y 700pb: el carril 2 muestra los productos de la degradación del ADN con fragmentos en tamaño menores a 100pb, producto de la genotoxicidad de mayor a 95% de fragmentación por efecto del extracto a 100 mg/mL, siendo similar el producto en el carril 3 con 50 mg/mL. En el carril 4 la fragmentación del ADN entre 40 a 95% con tamaños mayores a 100pb, son producidos por el extracto a 10 mg/mL, y en el carril 5, con extracto a 5 mg/mL, la fragmentación del ADN también entre 40 a 95%, con tamaños mayores a 200pb.

En la figura 6 los resultados de la prueba de Kruskal Wallis (Anexo 13) determina la diferencia estadística ($p=0,045$) en la actividad genotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua” sobre el ADN genómico de *Candida albicans*, que depende de la concentración del extracto, observándose que a 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, son todas altas, en incremento gradual, cuyas medias va de 2,5, 2,75, 3,25 y 3,75, respectivamente.

A concentraciones de 5 mg/mL y 10 mg/mL el efecto es similar, de manera genérica es menor la fragmentación en comparación con el efecto a concentraciones de 50 mg/mL y 100 mg/mL del extracto hidroalcohólico.

La fotografía de la figura 7 de electroforesis en gel de agarosa al 1%, revela la genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico obtenido de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua” sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a concentración de 1 500 ng/ μ L, el efecto genotóxico luego de una incubación a 37°C en baño maría durante 1 hora; en los carriles 1 y 2 con 100 mg/mL y 50 mg/mL respectivamente, muestran fragmentaciones que va entre 40 a 95% hasta mayor que el 95%, con media de 3,5 en ambos, en el carril 3 con 10 mg/mL la fragmentación va del rango de 5 a 20% hasta el rango entre 20 y 40% con media de 1,5; mientras que en el carril 4 con concentración de 5 mg/mL la fragmentación va desde menores del 5% hasta el rango entre 5 a 20%, con media de 0,75.

La actividad genotóxica *in vitro* sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, depende de la concentración del extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* Lam “canchalagua”, la figura 8 de la prueba de Kruskal Wallis determina la diferencia estadística ($p=0,006$) (Anexo 13); observándose que a 5 mg/mL y 10 mg/mL, son similares, con baja actividad genotóxica y medias de 0,75 y 1,5, respectivamente; mientras que a concentraciones de 50 mg/mL y 100 mg/mL

muestran mucha mayor actividad genotóxica, ambas con medias de 3,5 y el mismo comportamiento en ellos.

Estos resultados son similares a los reportados por Ayala⁸, que estudió el efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antibacterianas *Spartium junceum* L. "retama", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto"; demostró que los extractos hidroalcohólicos de estas plantas tienen efecto genotóxico sobre ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, donde el tiempo de incubación a una y cuatro horas, no influye en el efecto; mientras que las concentraciones de los extractos, sí influyen en el efecto genotóxico.

Varios estudios realizados, de las plantas medicinales de otras familias, nos refiere que la actividad antibacteriana, así como la actividad genotóxica se le atribuye a la presencia de los flavonoides, alcaloides y taninos.

VI. CONCLUSIONES

- El extracto hidroalcohólico de la planta medicinal *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua” o “pique pichana”, presenta efecto genotóxico *in vitro* sobre el ADN genómico de *Homo sapiens sapiens*, *Cándida albicans* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente.
- Los metabolitos secundarios presentes en los tallos, hojas y flores de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua” o “pique pichana” son alcaloides, flavonoides, fenoles y/o taninos, lactonas y/o cumarinas y quinonas.
- El extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze “canchalagua” o “pique pichana”, no revela diferencia estadística ($p=0,190$) de su efecto genotóxico *in vitro*, frente a los ADNs genómico de *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Las concentraciones del extracto hidroalcohólico, sí influye en su actividad genotóxica *in vitro*, sobre ADN genómico de *Homo sapiens sapiens* ($p=0,006$), *Candida albicans* ($p=0,045$) y *Staphylococcus aureus* ($p=0,006$), determinados por la prueba de Kruskal Wallis.

VII. RECOMENDACIONES

- Desarrollar trabajos de genotoxicidad en cultivos celulares con el “ensayo cometa” y ensayos *in vivo* para continuar con el conocimiento de estos efectos.
- Ampliar estudios de genotoxicidad con extractos de metabolitos secundarios fraccionados de otras plantas medicinales de uso común en nuestra sociedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cueva, A. Plantas medicinales: Propiedades y usos. 1 edición, Editorial A.F.A., Lima Perú. 2003.
2. Carballo M, Cortada C, Gadano A. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. Revista teoría, historia y fundamentos de la Ciencia [revista en Internet] 2005 [acceso febrero 2014]; 14(2): 95-108. Disponible en: <http://www.redalyc.org/artículo.oa?id=29914211>.
3. Carballo M, Cortada C, Gadano A. Citogenética Humana y Genética Toxicológica. CIGETOX. Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA. Buenos Aires- Argentina; 2005.
4. Miranda T, Yarlequé J, Vila P, Ramírez A. Contribución al Estudio Fitoquímico y Farmacológico de *Schkuhria octaristata* "piqui pichana". XI Congreso Nacional de Biología. V Simposio Nacional de Educación en Ciencias Biológicas. Tacna, Perú; 1994.
5. Furlan, V., Torres C. y Galetto L. Conocimiento y utilización de plantas medicinales por pobladores rurales del Bosque Chaqueño Serrano de Córdoba (Argentina). Bonplandia 20(2): 285-307. 2011.
6. Bussmann R, Sharon D, Díaz D. y Barocio Y. Las plantas peruanas "canchalagua" *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze, "hercampuri", *Gentianella alborosea* (Gilg.) Fabris y "corpus way" *Gentianella bicolor* (Wedd.) J. Pringle eficaces en el tratamiento del acné. *Arnaldoa* 15(1): 149 – 152. 2008. ISSN: 1815-8242.
7. Añanca Cotrado E. Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* "tara" en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* [tesis de grado]. Tacna, Perú; 2009.
8. Ayala E. Efecto genotóxico in vitro de plantas medicinales antibacterianas *Spartium junceum* L. "retama", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto". Ayacucho-Perú, 2013.
9. Pillaca L. Efecto genotóxico in vitro de plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* "leche leche" y *Ficus carica* "higo", Ayacucho - 2013. Tesis de Químico Farmacéutico. UNSCH.
10. Aucasime L. Herbario Huamangensis de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2013.

11. Mostacero J. Taxonomía de Fanerógamas del Perú. Primera Edición. Editorial. Libertad E.I.R.L. Trujillo-Perú. 1993.
12. Sung, I. Plantas Medicinales. 7ª ed. Lima: Isabel; 2000.
13. Sánchez A, Fonseca G, Capiro N, & Fernández D. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. Revista Cubana de Farmacia, 34, 34-43. 2000.
14. Ramírez M. Mutágenos, químicos, físicos y biológicos. Guadalajara. Genética Ambiente y Salud. Universidad de Guadalajara; 2001.
15. Lodish H, Berk A, Lawrence Z, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Biología celular y molecular. 4ª ed. Madrid: Médica Panamericana S.A.; 2002.
16. Lehninger A, Nelson D, Cox M. Principios de Bioquímica. 2ª ed. Barcelona: Omega; 1995.
17. Madigan M, Martinko J, Parker J. Biología de los Microorganismos. 8ª ed. Madrid: Printice Hall Iberia; 1997.
18. Peña E, Barrueco C, Herrera A, & García P. Ensayos de genotoxicidad: una alternativa a la experimentación animal. Revista de Experimentación Animal, 1, 41-52. 1990.
19. Brunenton J. Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España. 2001.
20. Villarreal M, Alonso D, & Melesio G. Cytotoxic activity of Mexican plants used in traditional medicine. Fitoterapia, 43, 518–521. 1992.
21. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. Quinta edición. Perú. Editorial Mc Graw Hill. 2010.
22. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad De La Habana Instituto de Farmacia y Alimentos. Cuba; 2000.
23. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. 2ª ed. Lima: Fondo editorial; 1994.
24. Miranda T, Valer G. Protocolos de Biología Molecular. Guía de Prácticas. Editorial Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2013.
25. Yoc A, Soto E, Gutiérrez J, Arriola M. Estudios de actividad biocida, citotóxica y genotóxica de tres plantas medicinales de la familia euphorbiaceae: *euphorbia lancifolia*, *cnidoscolus aconitifolius* var. *mansa* y *cnidoscolus*

- aconitifolius* var. *estrella* [tesis de grado]. Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos; 2012.
26. Larrea Poma M. Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay [tesis de grado]. La Paz. Universidad Mayor de San Andrés; 2007.

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 6. Certificado de clasificación taxonómica de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua". Ayacucho, 2015.¹⁰



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

C E R T I F I C A

Que, la Lic. en Enfermería, Srta. Rina Mariola, INFANTE CÁRDENAS ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis de maestría.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	ASTERALES
FAMILIA	:	ASTERACEAE
GENERO	:	Schkuhria
ESPECIE	:	<i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze
N.V.	:	"piqui pichana", "canchalagua"

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

Ayacucho, 23 de Diciembre del 2014

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

Biga. Laura Aucasime Medina
JEFE

Anexo 2

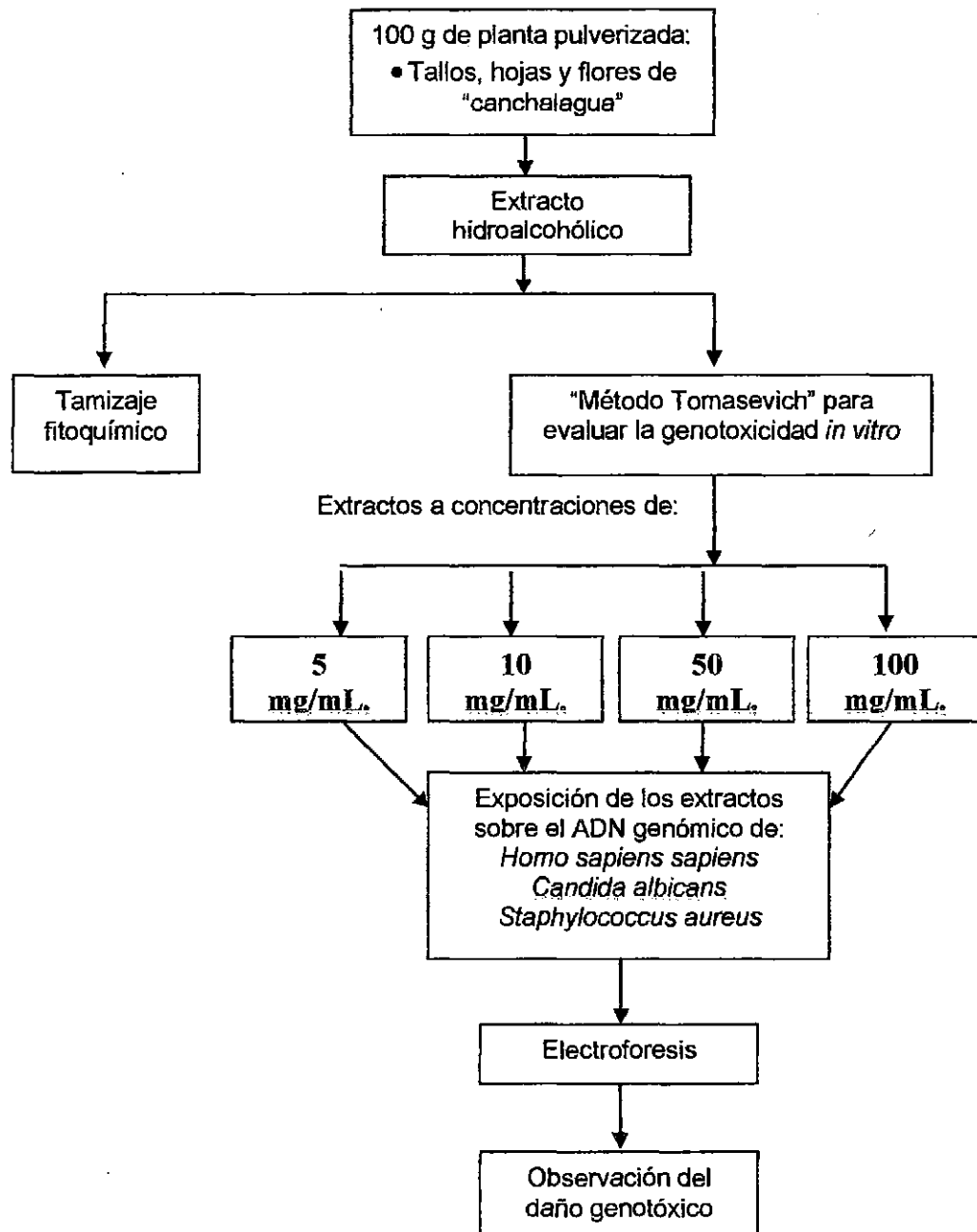


Figura 9. Esquema de obtención del extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua", tamizaje fitoquímico y ensayo de genotoxicidad. Ayacucho, 2015.

Anexo 3

Tabla 7. Características producidas en los ensayos para la identificación de los metabolitos secundarios de las plantas medicinales.

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

Fuente: Miranda M., 2000.²²

Anexo 4

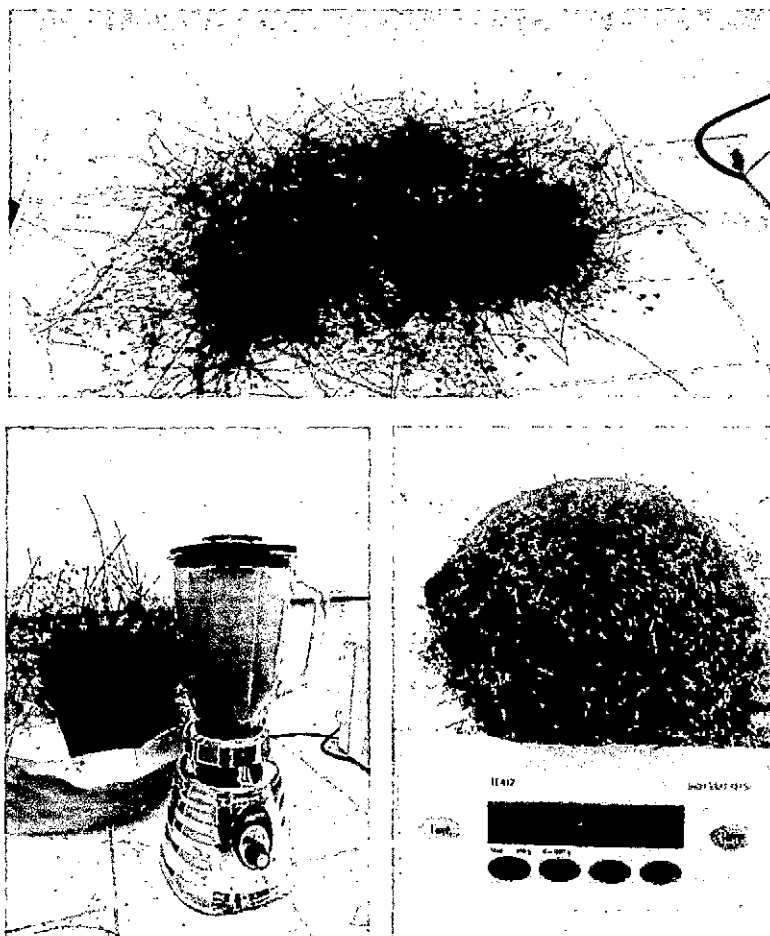


Figura 10. Secado a temperatura ambiente, molienda y pesado de tallos, hojas y flores de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua". Ayacucho, 2015.

Anexo 5

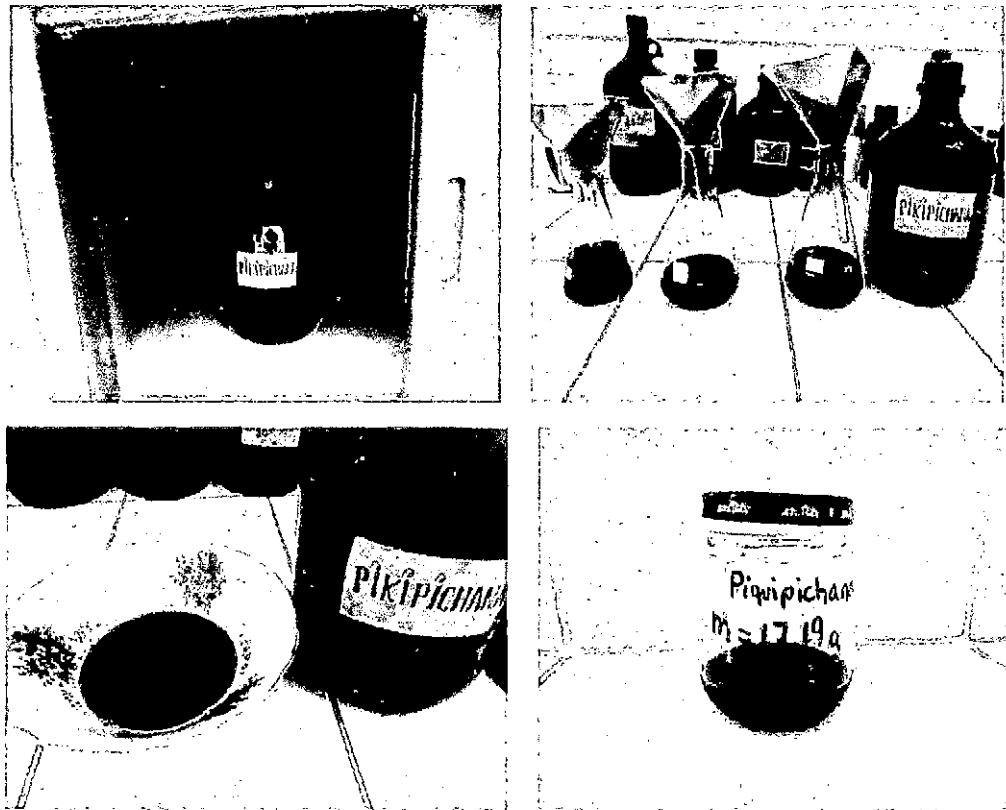


Figura 11. Macerado y obtención del extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua". Ayacucho, 2015.

Anexo 6

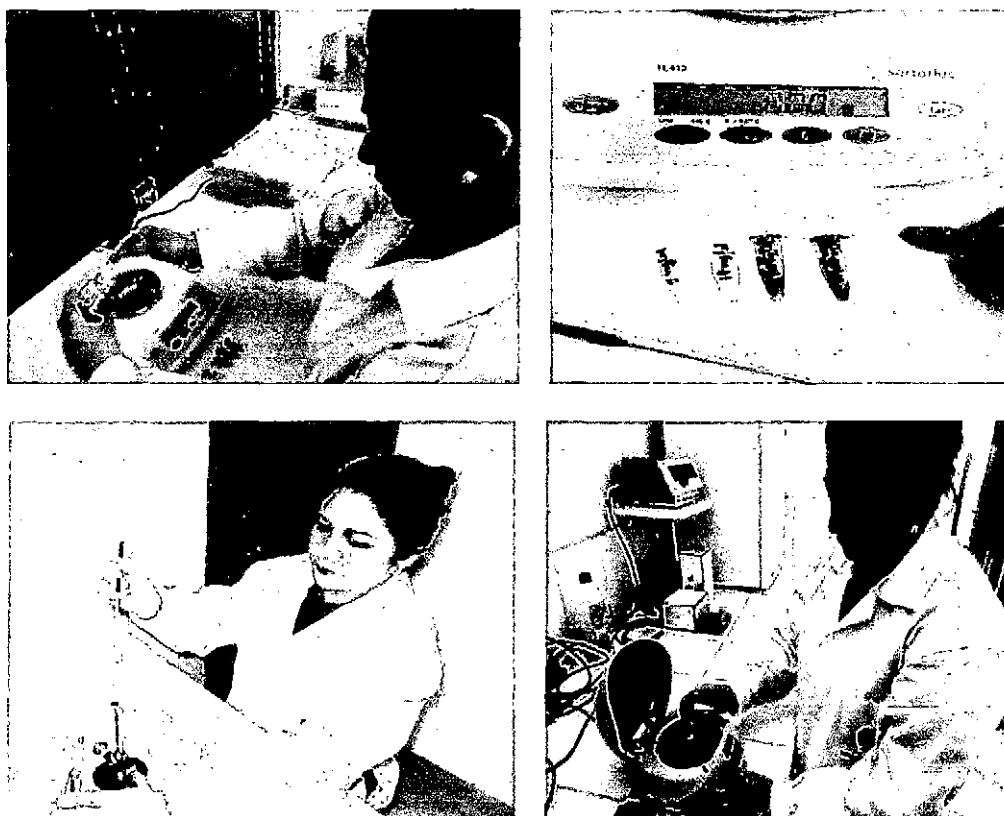


Figura 12. Preparación del extracto hidroalcohólico a diferentes concentraciones, cultivo de las cepas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* y obtención del ADN genómico para la evaluación de genotoxicidad de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua". Ayacucho, 2015.

Anexo 7

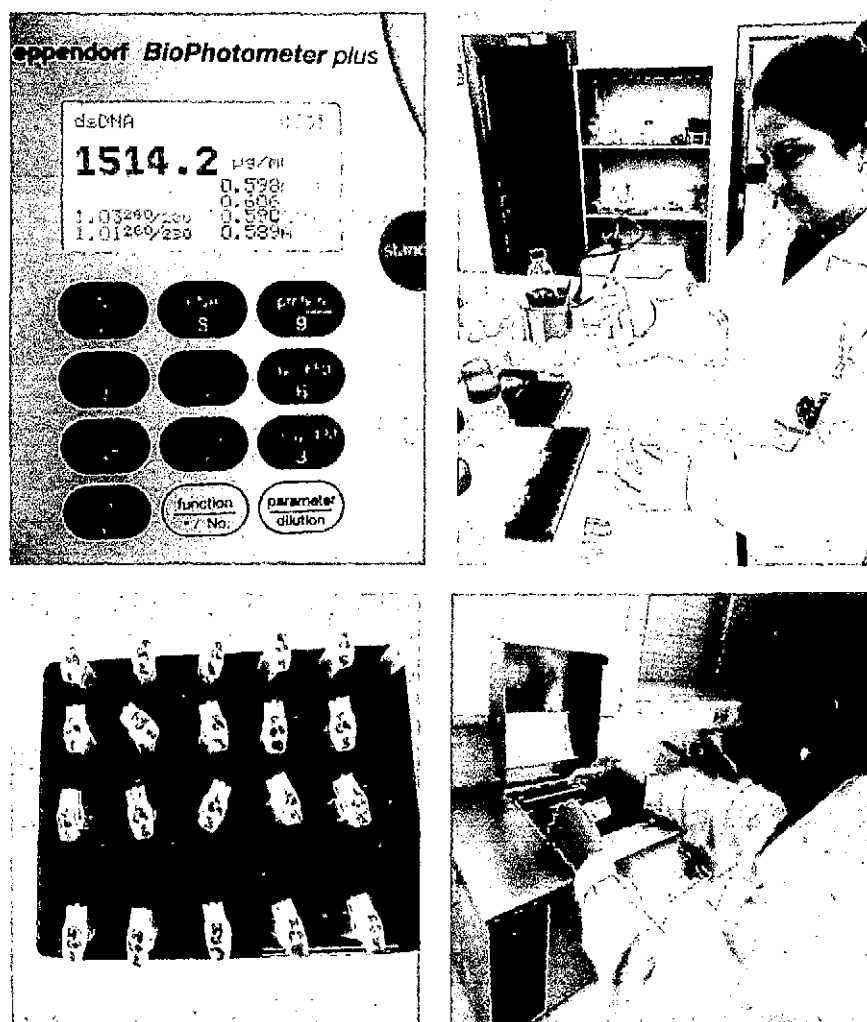


Figura 13. Cuantificación por espectrofotometría UV de ADN genómico extraído de *Homo sapiens sapiens*, *Cándida albicans* y *Staphylococcus aureus*, preparación e incubación de la mezcla para la evaluación de genotoxicidad de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua". Ayacucho, 2015.

Anexo 8

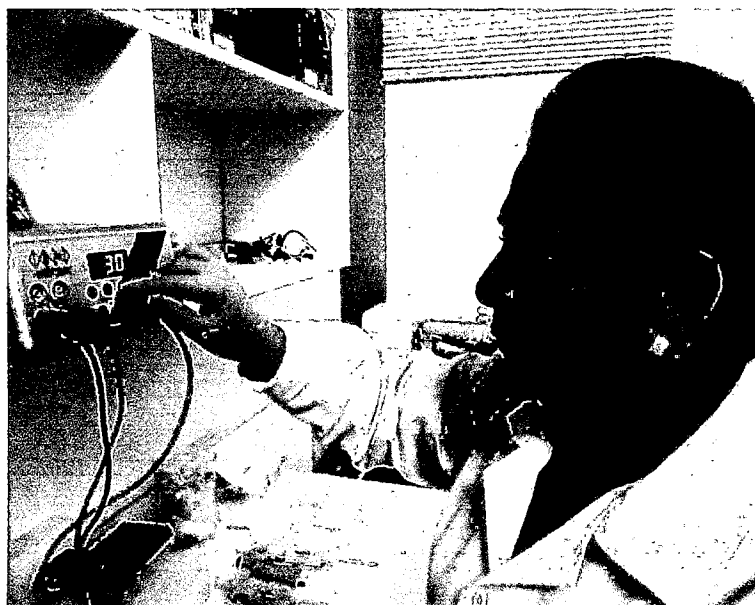


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, para la evaluación de genotoxicidad *in vitro* de extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua". Ayacucho, 2015.

Anexo 9



Figura 15. Registro fotográfico del gel de agarosa para interpretación de la genotoxicidad *in vitro* de extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua" frente a ADNs genómicos. Ayacucho, 2015.

Anexo 10

Tabla 8. Valores numéricos del grado de genotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua", según la concentración, frente a ADN genómicos de: *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.

Organismo	ADN-genómico											
	<i>Homo sapiens sapiens</i>				<i>Candida albicans</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>			
<i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze	Concentración del extracto hidroalcohólico (mg/ml)											
	5	10	50	100	5	10	50	100	5	10	50	100
Grado de genotoxicidad en 1 hora a 37°C.	0	0	4	4	3	3	3	4	1	1	3	3
	1	1	3	4	2	2	3	4	1	2	4	4
	0	1	3	4	2	3	4	4	0	1	4	4
	1	2	3	3	3	3	3	3	1	2	3	3

Anexo 11

Tabla 9. Estadísticos descriptivos del efecto genotóxico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua", frente a los ADNs genómico de *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.

Organismo		Media	N	Desv. tip.	Mínimo	Máximo
<i>Homo sapiens sapiens</i>	ADN genómico de linfocito humano	2,125	16	1,5438	0,0	4,0
	Total	2,125	16	1,5438	0,0	4,0
<i>Candida albicans</i>	ADN genómico de Candida	3,063	16	,6801	2,0	4,0
	Total	3,063	16	,6801	2,0	4,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	ADN genómico de <i>Staphylococcus</i>	2,313	16	1,3525	0,0	4,0
	Total	2,313	16	1,3525	0,0	4,0

Anexo 12

Tabla 10. Resultados de la prueba de Kruskal Wallis comparando el efecto genotóxico *in vitro* del extracto de hidroalcohólico de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze "canchalagua", frente a los ADNs genómico de *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.

Estadísticos de contraste ^{a,b}	
	Genotoxicidad
Chi-cuadrado	3,318
Gl	2
Sig. asintót.	,190

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Tipo de ADN

Anexo 13

Tabla 11. Resultados da la prueba de Kruskal Wallis comparando el efecto genotóxico *in vitro* de cuatro diferentes concentraciones frente a los ADNs genómico de *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente, durante 1 hora de incubación a 37°C. Ayacucho, 2015.

Estadísticos de contraste ^{a,b}		
Tipo de ADN		Genotoxicidad
Homo sapiens sapiens	Chi-cuadrado	12,469
	gl	3
	Sig. asintót.	,006
Candida albicans	Chi-cuadrado	8,056
	gl	3
	Sig. asintót.	,045
Staphylococcus aureus	Chi-cuadrado	12,606
	gl	3
	Sig. asintót.	,006

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Concentración extracto (mg/mL)

Anexo 14

Tabla 12. Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Comparación de la genotoxicidad <i>in vitro</i> de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze "canchalagua" frente a ADN genómicos de: humano, <i>Candida</i> y <i>Staphylococcus</i> . Ayacucho, 2014.	¿Cuáles serán las similitudes y diferencias de la genotoxicidad <i>in vitro</i> de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze "canchalagua" frente a ADN genómicos de: <i>Homo sapiens sapiens</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> ?	<p>GENERAL</p> <ul style="list-style-type: none"> Comparar la genotoxicidad <i>in vitro</i> de la planta medicinal <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze "canchalagua", frente al ADN genómicos de: <i>Homo sapiens sapiens</i>, <i>Candida albicans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>. <p>Específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> Identificar los metabolitos secundarios en extracto hidroalcohólico de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze "canchalagua". Contrastar similitudes y diferencias de la genotoxicidad <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de la planta medicinal en estudio, frente a ADN genómicos de: <i>Homo sapiens sapiens</i>, <i>Candida albicans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>. 	<p>Aspectos Botánicos de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze "canchalagua":</p> <p>Clasificación taxonómica, Descripción Botánica, Composición Química, Actividades Biológicas. Genotoxicidad.</p>	El extracto hidroalcohólico de la planta medicinal <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze "canchalagua", presenta similitudes y diferencias en la genotoxicidad <i>in vitro</i> frente a ADN genómicos de: <i>Homo sapiens sapiens</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	<p>Variable Principal: Planta medicinal <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze "canchalagua" o "piqui pichana".</p> <p>Indicador: - Concentración del extracto hidroalcohólico (mg/mL).</p> <p>Variable secundaria: Genotoxicidad <i>in vitro</i> de la planta medicinal..</p> <p>Indicador: - ADN genómico de <i>Homo sapiens sapiens</i>. - ADN genómico de <i>Candida albicans</i>. - ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i>. - Fragmentación del Ácido desoxirribonucleico (ADN).</p>	<p>Tipo de investigación : Descriptivo.</p> <p>Nivel de investigación: Básico</p> <p>Definición de la población y muestra: Procedimiento para la recolección de muestra de extracto hidroalcohólico de: • <i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze "canchalagua" o "piqui pichana".</p> <p>Diseño Experimental: Los ensayos se realizarán con un modelo <i>in vitro</i> para estudiar la actividad genotóxica del extracto sobre el ADN genómico, demostrándose por su fragmentación. Se aplicará el análisis de varianza del efecto genotóxico de las plantas medicinales en estudio, que indica una actividad diferencial sobre ADN de <i>Homo sapiens sapiens</i>, <i>Candida albicans</i>, de <i>Staphylococcus aureus</i> y estadísticamente significativa ($p < 0,05$).</p>