

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Ensayos de degradación *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas, tallos y zumo de *Minthostachys mollis* Griseb “muña” frente a DNA genómico humano. Ayacucho, 2017.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA, EN LA ESPECIALIDAD DE MICROBIOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Bach. MARTINEZ VEGA, Emavel

ASESOR:

Mg. MIRANDA TOMASEVICH, Tomás Yuret

AYACUCHO – PERÚ

2022

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Bach. Emavel MARTINEZ VEGA
R.D. N° 021-2022-UNSCH-FCB-D

A los veintiocho días del mes de enero del año dos mil veintidós, siendo las cuatro de la tarde, se reunieron a través de la plataforma virtual Google Meet, los docentes miembros del jurado calificador conformado por: Dr. Saúl Alonso CHUCHÓN MARTÍNEZ (Presidente); Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA (Miembro jurado); Dr. Gilmar PEÑA ROJAS (Miembro jurado) Mg. Tomás Yuret MIRANDA TOMASEVICH (Miembro asesor), actuando como secretaria docente la Dra. Nilda Aurea Apayco Espinoza, para recepcionar la sustentación de tesis titulada: “**Ensayos de degradación *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas, tallos y zumo de *Minthostachys mollis* Griseb “muña” frente a DNA genómico humano. Ayacucho, 2017**”; presentada por la **Bach. Emavel MARTINEZ VEGA**, previa verificación de la documentación exigida, el presidente autorizó el inicio del acto académico precisando que el sustentante dispone de cuarenta y cinco minutos, conforme lo establece el reglamento de grados y títulos de la Facultad de Ciencias Biológicas. Finalizada la sustentación, el presidente invitó a los miembros del jurado a participar con observaciones, aclaraciones y preguntas relacionadas al tema; el asesor se comprometió cumplir con las correcciones y sugerencias realizadas. Concluida esta etapa, el presidente invitó al sustentante y a los asistentes abandonar la sala virtual a fin de proceder a la deliberación y calificación correspondiente.

Seguidamente procedieron a la calificación, alcanzando los siguientes resultados:

MIEMBROS DEL JURADO EVALUADOR	EXPOSICIÓN	RESPUESTA A PREGUNTAS	PROMEDIO
Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA	17	17	17
Dr. Gilmar PEÑA ROJAS	16	14	15
		PROMEDIO	16

La sustentante alcanzó el promedio de 16 (dieciséis) aprobatorio. Acto seguido, el presidente invitó al sustentante y público reingresar a la sala virtual para dar a conocer el resultado de la evaluación; finalizando el presente acto académico siendo las seis y treinta de la noche, firmando al pie del presente en señal de conformidad.



Dr. Saúl Alonso CHUCHÓN MARTÍNEZ
Presidente



Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA
Miembro – Jurado



Dr. Gilmar PEÑA ROJAS
Miembro – Jurado



Mg. Tomás Yuret MIRANDA TOMASEVICH
Miembro - Asesor



Dra. Nilda Aurea Apayco Espinoza
Secretaría - Docente



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

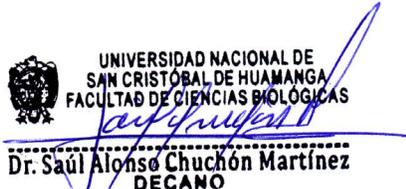
DECANATURA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS N° 012-
2022-FCB-D

Yo, SAÚL ALONSO CHUCHÓN MARTÍNEZ, Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional De San Cristóbal De Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **“Ensayos de degradación in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas, tallos y zumo de *Minthostachys mollis* Griseb “muña” frente a DNA genómico humano. Ayacucho, 2017.”**, presentado por la Bach. MARTINEZ VEGA, EMAVEL; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 24%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario N° 039-2021-UNSCH-C.

En tal sentido, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 10 de junio de 2022.


UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez
DECANO

Ensayos de degradación in vitro
del extracto hidroalcohólico de
hojas, tallos y zumo de
Minthostachys mollis Griseb
“muña” frente a DNA genómico
humano. Ayacucho, 2017.

por Emavel Martinez Vega

Fecha de entrega: 10-jun-2022 06:14p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 1854552702

Nombre del archivo: 1C_Martinez_Vega_Emavel_Pregrado_2022_TURNITIN.docx (1.88M)

Total de palabras: 12897

Total de caracteres: 66598

Ensayos de degradación in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas, tallos y zumo de *Minthostachys mollis* Griseb “muña” frente a DNA genómico humano. Ayacucho, 2017.

INFORME DE ORIGINALIDAD

24%

INDICE DE SIMILITUD

19%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

17%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	12%
2	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	8%
3	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	2%
4	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1%
5	rpmesp.ins.gob.pe Fuente de Internet	<1%
6	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo

A Dios por darme la oportunidad, el entusiasmo y la fortaleza de culminar mis estudios brindándome salud.

A mis padres Maximiliana y Eduardo por enseñarme que todo sueño se cumple pero con esfuerzo y perseverancia.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a nuestra *Alma Mater* a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, que me acogió durante estos años de estudio y me dio la oportunidad de adquirir conocimientos, forjadora de excelentes profesionales al servicio de la comunidad ayacuchana, dentro y fuera del país.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, a la Escuela Profesional de Biología, así mismo, a todos los docentes que me brindaron sus conocimientos y experiencias en el transcurso de mi vida estudiantil.

A mi asesor Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico.

A mis padres, hermanas y a todas las personas especiales por su apoyo incondicional y confianza brindada en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes del estudio	3
2.2. Bases teóricas	6
2.2.1. <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”	6
2.2.2. Extracto hidroalcohólico y zumo	9
2.2.3. DNA, Estructura físico química	9
2.2.4. Extracción de DNA humano	12
2.2.5. Efecto de los metabolitos secundarios sobre el DNA	14
2.2.6. Ensayo de exposición directa del DNA genómico humano a extractos vegetales	15
III. MATERIALES Y METODOS	17
3.1. Lugar de ejecución	17
3.2. Definición de la población y muestra	17
3.2.1. Población	17
3.2.2. Muestra	17
3.2.3. Muestreo	17
3.2.4. Lugar de muestreo	18
3.3. Unidad experimental	18
3.4. Procedimiento	18
3.4.1. Recolección de la muestra	18
3.4.2. Obtención de polvo de muña	18
3.4.3. Obtención del extracto hidroalcohólico y zumo	19
3.4.4. Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de hojas, tallos y zumo de <i>Minthostachys mollis</i> G. “muña”	19
3.5. Extracción de DNA genómico humano a partir de muestra de sangre	20

3.6.	Valoración del DNA extraído	21
3.6.1.	Determinación de la concentración con espectrofotómetro	21
3.6.2.	Evaluación de la calidad del DNA extraído por electroforesis	22
3.7.	Ensayo de degradación de DNA <i>in vitro</i>	23
3.7.1.	Fase de cuantificación y preparación de stock de DNA genómico obtenido para el ensayo	23
3.7.2.	Fase de ensayo de degradación <i>in vitro</i> del DNA genómico humano frente al extracto hidroalcohólico y zumo de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”, respectivamente	23
3.7.3.	Fase de electroforesis para la detección de genotoxicidad	24
3.7.4.	Fase de lectura por radiación UV	26
3.7.5.	Fase de interpretación visual y clasificación de la degradación <i>in vitro</i> del DNA en términos de fragmentación frente al extracto o jugo de la planta, plasmado en el registro fotográfico	26
3.8.	Tipo	26
3.9.	Diseño	26
3.10.	Análisis de datos estadísticos	27
IV.	RESULTADOS	29
V.	DISCUSIÓN	45
VI.	CONCLUSIONES	53
VII.	RECOMENDACIONES	55
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
	ANEXOS	61

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Características generadas en los ensayos para la identificación de los metabolitos secundarios de plantas.	20
Tabla 2.	Preparación de carga de DNA para visualización de banda en electroforesis. Ayacucho, 2017.	22
Tabla 3.	Preparación de las mezclas para ensayo de degradación <i>in vitro</i> del DNA genómico humano frente a múltiples cantidades del extracto hidroalcohólico de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña” (primer grupo), Ayacucho 2017.	23
Tabla 4.	Preparación de las mezclas para ensayo de degradación <i>in vitro</i> del DNA genómico de humano frente a múltiples cantidades del extracto hidroalcohólico de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña” (segundo grupo), Ayacucho 2017.	24
Tabla 5.	Preparación de las mezclas para ensayo de degradación <i>in vitro</i> de DNA genómico de humano frente a diferentes cantidades de zumo de hojas y tallos de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”, Ayacucho 2017.	24
Tabla 6.	Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de DNA genómico humano (primer grupo) con el extracto hidroalcohólico de “muña”, para el ensayo de degradación <i>in vitro</i> . Ayacucho 2017.	25
Tabla 7.	Preparar el volumen de carga de la solución en pocillos de gel de agarosa con solución de digestión de DNA del gen humano (segundo grupo) con el extracto hidroalcohólico de “muña”, para el ensayo de degradación <i>in vitro</i> . Ayacucho 2017.	25
Tabla 8.	Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de DNA del gen humano con el zumo de “muña”, para el ensayo de degradación <i>in vitro</i> . Ayacucho 2017.	25
Tabla 9.	Clasificación visual de la degradación <i>in vitro</i> del DNA, en términos de niveles de su fragmentación (valores numéricos), observados en registro fotográfico.	26
Tabla 10.	Diseño de investigación con pos prueba únicamente y grupo	27

	de control.	
Tabla 11.	Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Minthostachys mollis</i> G. "muña". Ayacucho, 2017.	31
Tabla 12.	Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el zumo de hojas y tallos de <i>Minthostachys mollis</i> G. "muña". Ayacucho, 2017.	32
Tabla 13.	Valor de cuatro ensayos de degradación <i>in vitro</i> de DNA genómico humano en extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Minthostachys mollis</i> G. "muña" en cantidades de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, expresados en fragmentos, 400 con 500 mg/ ml, 37°C por 1 hora. (CIBMB-UNSCH). Ayacucho 2017.	39
Tabla 14.	Valores de cuatro ensayos de degradación <i>in vitro</i> de ADN genómico humano en extractos hidroalcohólicos de tallos de <i>Minthastachys mollis</i> G. "muña" en cantidades de 5 – 10 – 25 – 50 – 100 – 200 – 300 - 400 y 500 mg/mL, una hora de incubación a 37°C. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2017.	40
Tabla 15.	Valores para cuatro ensayos de degradación <i>in vitro</i> de ADN genómico humano, expresado como fragmentos, en savia de hojas y tallos de <i>Minthhostachys mollis</i> G. "muña" a concentraciones de 5 – 10 – 25 – 50 - 100%, incubados a 37°C mantener por 1h. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2017.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”.	7
Figura 2. Estructura del DNA.	11
Figura 3. Mapa de ubicación del distrito de Huamanguilla, lugar del muestreo.	18
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del DNA del gen humano, corrida a 30V durante 60 min. Carriles (1-7).	33
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de DNA del gen humano versus extracto hidroalcohólico de hojas de muña. Funciona a 40 V x 150 minutos. Carril (M), marcador de volumen molecular de 1 kb; carriles (1-5), extractos hidroalcohólicos de muña en cantidades de 100 – 50 – 25 - 10 y 5 mg/mL; carril (6), control puro extracto hidroalcohólico de muña (100 mg / mL); carril (7), control de DNA genómico humano; carril (8), ADN genómico humano + extracto hidroalcohólico puro (100 mg/mL) + proteinasa K.	34
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de DNA del gen humano versus extracto hidroalcohólico de hojas de muña. Funciona a 40 V x 150 minutos. Carril (M), marcador de volumen molecular de 1 kb; carriles (1-4), extracto hidroalcohólico de muña en cantidades de 200 – 300 - 400 y 500 mg/mL; carril (5), extracto hidroalcohólico puro de muña control (500 mg/ mL); carril (6), control de DNA genómico humano; carril (7), ADN genómico humano + extracto hidroalcohólico puro (500 mg/mL) + proteinasa K.	35
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de DNA del gen humano en comparación con extractos hidroalcohólicos de tallos de muña. Funciona a 40 V x 150 minutos. Carril (M), marcador de volumen molecular de 1 kb; carriles (1-5), extractos hidroalcohólicos de muña en cantidades de 5 – 10 – 25 - 50 y 100 mg/mL; carril (6), control puro extracto hidroalcohólico de muña (100 mg/ mL); carril (7), control de ADN genómico humano; carril (8), ADN genómico humano + extracto hidroalcohólico puro (100 mg/mL) + proteinasa K.	36

- Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de DNA del gen humano en comparación con extractos hidroalcohólicos de tallos de muña. Funciona a 40 V x 150 minutos. Carril (M), marcador de volumen molecular de 1 kb; carriles (1-4), extracto hidroalcohólico de muña a concentra en cantidades de 200 – 300 - 400 y 500 mg/mL; carril (5), extracto hidroalcohólico puro de muña de control (500 mg/ mL); carril (6), control de DNA genómico humano; carril (7), DNA genómico humano + extracto hidroalcohólico puro (500 mg/mL) + proteinasa K. 37
- Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de DNA del gen humano contra jugo de hoja y tallo de muña. Correr a 40 V x 150 min Carril (M), marcador de dimensión de 1 kb, carriles (1-5), jugo de muña al 5 – 10 – 25 - 50 y 100% de concentración, carril (6), jugo de muña puro de control (100 %); carril (7), control de DNA genómico humano; carril (8), ADN genómico humano + jugo puro (100%) + proteinasa K. 38
- Figura 10. Degradación *in vitro* del ADN genómico humano (expresado como fragmentación) en extractos hidroalcohólicos de hojas de *Minthostachys mollis* G. "muña" en cantidades de 5 – 10 – 25 – 50 – 100 – 200 – 300 - 400 y 500 mg/mL, incubar a 37°C por 1h. Prueba de Kruskal-Wallis (H=32,86, GL=8, P=0.000); CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2017. 42
- Figura 11. Grado de degradación *in vitro* del DNA del gen humano, expresado en su fragmentación, frente al extracto hidroalcohólico de tallos de *Minthostachys mollis* G. "muña" en cantidades de 5 – 10 – 25 – 50 – 100 – 200 – 300 - 400 y 500 mg/mL, incubados a 37°C por 1h. Prueba de Kruskal-Wallis (H=31,42, GL=8, P=0.000); CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2017. 43
- Figura 12. En savia de hojas y tallos de *Minthostachys mollis* G. "muña" incubada a 37°C por 5, 10, 25, 50, 100% en concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100%, en fragmentos Grado de *in vitro* degradación del DNA del gen humano indicado durante 1 hora. Prueba de Kruskal-Wallis (H=2,29, GL=4, P=0.683); CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2017. 49

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Certificado de clasificación taxonómica de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”.	63
Anexo 2. Recolección de muestra y secado a temperatura ambiente de las hojas y tallos de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”.	64
Anexo 3. Obtención de extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”.	65
Anexo 4. Obtención del zumo de <i>Minthostachys mollis</i> G. “muña”. Ayacucho 2018.	66
Anexo 5. Protocolo de extracción de DNA genómico de glóbulos blancos humano.	67
Anexo 6. Diagrama para la obtención del extracto hidroalcohólico del <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña” y ensayo de degradación in vitro de DNA. Ayacucho 2018.	68
Anexo 7. Diagrama para la obtención del zumo de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”. y ensayo de degradación in vitro de DNA. Ayacucho 2018.	69
Anexo 8. Diagrama para la identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico y del zumo de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”. Ayacucho 2017.	70
Anexo 9. Proceso de preparación de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”. Ayacucho 2018.	71
Anexo 10. Proceso de preparación a diferentes concentraciones del zumo de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”. Ayacucho 2018.	72
Anexo 11. Fase de electroforesis en gel de agarosa. Ayacucho 2018.	73
Anexo 12. Proceso para la determinación del efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico y zumo de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña” frente a DNA genómico humano. Ayacucho 2018.	74
Anexo 13. Matriz de consistencia.	75

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo demostrar la degradación *in vitro* del DNA genómico humano frente al extracto hidroalcohólico y zumo de *Minthostachys mollis* G. "muña". El tipo de investigación fue experimental con diseño post test, el tipo de muestreo fue no probabilístico, intencional, constituido por 4 kg de las hojas y tallos de muña obtenidas del Centro poblado de 24 de junio, distrito de Huamanguilla, provincia de Huanta, región de Ayacucho. El extracto hidroalcohólico, se obtuvo después de haber macerado el polvo de las hojas y tallos secos durante 5 días; mientras que el zumo se extrajo directamente de las hojas y tallos frescos; posteriormente, se realizó el tamizaje fitoquímico correspondiente. La estimación del daño degradativo *in vitro* se estableció mediante el protocolo modificado y descrito por Miranda (2017); las concentraciones para los ensayos de degradación del DNA genómico humano fueron de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL y para el zumo de 5, 10, 25, 50 y 100%. Se identificaron los siguientes metabolitos secundarios: compuestos fenólicos (hojas y tallos), flavonoides y catequinas (hojas) en el extracto hidroalcohólico y compuestos fenólicos en el zumo; todos en concentraciones abundantes. Los mayores daños degradativos *in vitro* del DNA genómico humano, frente al extracto hidroalcohólico de hojas y tallos, se manifestaron a concentraciones de 300, 400 y 500 mg/mL, en tanto que, para el zumo fueron del 5 al 100 %. Mediante la prueba de Kruskal-Wallis se confirmó que el daño degradativo del DNA es directamente proporcional a la concentración del extracto hidroalcohólico; mientras que, para el zumo no existe dependencia. Se concluye que el extracto hidroalcohólico y el zumo de *Minthostachys mollis* Griseb "muña", genera daño degradativo *in vitro* en el DNA genómico humano.

Palabras clave: Degradación, *Minthostachys mollis*, "muña".

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas que tienen efectos medicinales representan cerca del 25% total de las prescripciones médicas en países industrializados (Harvey et al., 2000; Sharapin, 2000) y en los países en desarrollo, la Organización Mundial de la Salud menciona, que el 80% de la población mundial, depende exclusivamente de hierbas para su atención primaria de salud (Muhammad et al., 2011). Las plantas medicinales, contienen nuevas identidades moleculares que son importantes, para que logren sintetizar y producir componentes que son difíciles de conseguir mediante una síntesis química (Munari et al., 2010). Estos elementos provenientes de fuentes naturales sirven como prototipos para sintetizar de fármacos con acciones terapéuticas y biológicas, pueden modificarse parcialmente para que sean menos tóxicos y con mayor efectividad (Regner et al., 2011). *Minthostachys mollis* Griseb es una de las plantas más utilizadas en el ámbito culinario siendo ingrediente en diferentes comidas y con fines medicinales (Arcila-Lozano et al., 2004). Las plantas medicinales contienen un gran número de compuestos biológicamente activos y tienen propiedades comprobadas farmacológicamente, diversos estudios demuestran que dichas plantas, pueden originar toxicidad, dependiendo especialmente de la cantidad consumida (Sponchiado, 2016). Por la gran afinidad que hay entre las enfermedades hereditarias y el daño al DNA a causa de que las células del organismo en este caso el DNA, recibe el tratamiento directamente con las plantas medicinales ya sean zumos, extractos o aceites se desconoce los efectos adversos que pueden estar ocasionando la genotoxicidad y la citotoxicidad por efecto de los metabolitos secundarios presentes en cada planta medicinal. (Ananthi, 2010).

Por ello la tarea fundamental es conocer si dichos metabolitos secundarios podrían estar causando este efecto en el DNA y si es así en qué concentración

se puede presentar, por lo tanto resulta imprescindible evaluar la genotoxicidad (Sponchiado, 2016). Existen estudios que concluyen que existen algunas plantas medicinales que son genotóxicas, siendo extremadamente dañinas para el humano. (Melo-Reis et al 2011).

En las últimas 3 décadas se vienen desarrollando, diversas estrategias y metodologías para evaluar los efectos genotóxicos (Lopez et al., 2010). Los ensayos de degradación se usan comúnmente para identificar extractos, sustancias capaces de interactuar con concentraciones bajas o altas de ácido nucleico, lo que puede provocar aberraciones en la estructura del ADN o cambios cromosómicos que afectan la fidelidad de la información y conducen a cambios celulares irreversibles y susceptibilidad a enfermedades. (García, 2003). El propósito del presente trabajo es estudiar el daño degradativo *in vitro* del DNA genómico humano bajo los efectos del extracto hidroalcohólico y el zumo de *Minthostachys mollis* Griseb cuya estimación del daño fue expresado en su fragmentación, determinado con el protocolo modificado y descrito por Miranda, el estudio radica en exponer al DNA genómico humano a desiguales cantidades del extracto hidroalcohólico y del jugo de “muña”, en seguida se sometió éste elemento a electroforesis en gel de agarosa al 1% y bromuro de etidio al 1% para luego visualizar con ayuda de la emisión de luz ultra violeta e descifrar el efecto causado en la estructura del DNA, por tanto, forma una técnica con eficacia y eficiencia para establecer la genotoxicidad de los extractos de las plantas medicinales. Como también se realizó la marcha fitoquímica con la intención de ver la presencia de múltiples metabolitos secundarios existentes en la muña. Los objetivos que se formularon fueron:

Objetivo general

Demostrar la degradación *in vitro* del DNA genómico humano frente al extracto hidroalcohólico de hojas y tallos y zumo de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”.

Objetivos específicos

1. Identificar la presencia de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas, tallos y zumo de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”.
2. Comprobar el daño degradativo *in vitro* del DNA genómico humano frente al extracto hidroalcohólico de hojas, tallos y zumo de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

Azaña (2010), realizó una investigación con el objeto de establecer lo efectivo y antibacteril *in vitro* del óleo esencial de *Minthostachys mollis* Griseb “muña” a nivel cuantitativo y cualitativo, dicho estudio lo realizó haciendo uso del procedimiento de “difusión en agar con disco”, Las cepas con enfermedad periapical crónica en las investigaciones existentes son: *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella*, así como inflamación periapical crónica apical en muestras de conducto radicular. Por arrastre de vapor, los investigadores obtuvieron el aceite esencial de los componentes activos totales de la planta (hojas, flores y tallos). Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* arrojaron los siguientes resultados: El aceite esencial puro de *Minthostachys mollis* "muña" y su dilución a 70° fueron más antimicrobianos que el etanol pero menos que el alcanfor p-monoclorofenol.

Cano (2008), realizó un estudio con el objetivo de comprobar la elucidación como la acción anti hongos *in vitro* de ciertos metabolitos del óleo esencial de hojas de *Minthostachys mollis* (muña). El método usado para la obtención del aceite esencial fue la destilación por transporte de vapor de agua, el que se colocó para estudio físico-químico y cromatografía de gases para la determinación de su composición química. Del mismo modo, a través del procedimiento de agar en difusión, Cano evidenció la inhibición del crecimiento fúngico de *Candida albicans*, y mediante el procedimiento para diluir en tubo para *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* y *Microsporun canis*. Uno de los efectos más importantes al que arribó el investigador fue que el óleo esencial de *Minthostachys mollis* (muña) inhabilitó totalmente el desarrollo de *T. tonsurasn*, *T. mentagrophytes* y *M. canis* con los dos técnicas de valoración y dosis. Sin embargo, el hongo *C. albicans* solo consiguió un halo de inhibición de 30 mm para el óleo esencial al 100% y de 35 mm al 50%. Se encontró estos

monoterpenos: pulegona, mentona, limoneno y mirceno. Llegando a la conclusión que fue demostrada la acción anti hongos del óleo esencial de muña, posiblemente por la labor de los monoterpenos hallados.

Carvajal (1988), realizó un estudio sobre la actividad mutagénica de la “muña” (*Minthostachys mollis*), optaron por trabajar con células linfoblásticas de la línea AHH, debido a que tienen la habilidad de metabolizar una amplia variedad de sustancias químicas reactivas y no reactivas y convertirlas en mutágenos activos. Esta línea celular tiene la capacidad de oxigenación y es capaz de mutar en presencia de nitrosaminas, compuestos aromáticos policíclicos y micotoxinas; llegando a la conclusión que las células linfoblastos estudiadas reaccionan mutando en cada exposición simple al extracto natural de la muña, incrementándose en función de la concentración aplicada y aumenta considerablemente por encima de las observadas en cultivos no tratados.

Bravo et al. (2004), realizaron un estudio con el propósito de determinar la existencia de flavonoides en *Minthostachys mollis* “muña” y *Lepechinia meyenni* Epling así como, la acción antimicrobios de sus extractos contrastado con cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Cuya conclusión se basa en que *Minthostachys mollis* “muña” presentó una actividad antimicrobiana a causa de la presencia de flavonoides.

Marca et al. (2018). Realizaron un estudio de “Genotoxicidad *in vitro* del extracto etanólico y zumo de *Allium sativum* L. “ajo”. Los investigadores realizaron una maceración por 5 días donde obtuvieron un extracto etanólico, mientras que, los zumos lo obtuvieron directamente de la planta fresca; la determinación genotóxica a diferentes concentraciones de extracto y del zumo, respectivamente, lo enfrentaron al ADN genómico de *Staphylococcus sp.* La evaluación del daño genotóxico *in vitro* fue establecido mediante el protocolo modificado y descrito por Miranda (2017). Los investigadores identificaron diferentes metabolitos secundarios del extracto etanólico del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo” entre ellos los fenoles en altas concentraciones; en el zumo: en mayor concentración encontraron los taninos y saponinas. En bajas concentraciones se encuentran a los cardenólidos. El extracto etanólico del “ajo” de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL de concentración, los investigadores no hallaron efectos genotóxicos frente al ADN genómico de *Staphylococcus sp.*; en el zumo del bulbo de *Allium sativum* L. “ajo”, incluso a bajas cantidades existe un potente efecto genotóxico, fragmentando el 100% del

ADN. Concluyeron que el zumo “ajo”, si contiene una alta acción genotóxica frente al DNA genómico de *Staphylococcus sp.*

Ayala (2013), realizó una investigación para determinar si las vegetaciones medicinales antibacterias como: las flores de retama, vainas de la tara y hojas eucalipto tienen efecto genotóxico *in vitro* cuando se exponen sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*; el investigador utilizó el protocolo modificado y descrito por Miranda (2017). El investigador concluyó que la tara y el eucalipto tienen un efecto genotóxico mayor a cantidades de 50 y 100 mg/mL a diferencia de que ocurre con la retama. Igualmente, en la retama se consiguió la existencia de metabolitos secundarios como: flavonoides, quinonas, alcaloides, fenoles y/o taninos, en abundantes cantidades, en regular suma encontramos a las quinonas; en la tara el investigador encontró en cantidades abundantes a: quinonas; alcaloides; flavonoides; lactonas; fenoles y/o taninos y en el eucalipto fenoles y/o taninos; alcaloides; flavonoides en concentraciones abundantes, en regular cantidad están las quinonas y lactonas y/o cumarinas.

García et al. (2018), realizaron un estudio de “Genotoxicidad *in vitro* del zumo de las flores y del extracto hidroalcohólico de hojas de *Brugmansia arborea* (L.) Lagerh “floripondio” frente a DNA del gen humano”, las hojas secas y trituradas lo maceraron en etanol: agua (3:1), posteriormente lo filtraron y lo llevaron a evaporación obteniendo el extracto; mientras que, el zumo lo obtuvieron previa molienda en mortero estéril. Se realizó la marcha fitoquímica para identificar los metabolitos secundarios del zumo de las flores y del extracto hidroalcohólico de las hojas del floripondio. El efecto genotóxico *in vitro*, lo determinaron con el protocolo modificado y descrito por Miranda (2017) el extracto y zumo a diferentes concentraciones, respectivamente, enfrentaron *in vitro* al DNA, sometieron a electroforesis, posteriormente los investigadores visualizaron con radiación de luz UV y finalmente tomaron los registros fotográficos. Concluyeron que el extracto de flor de *Brugmansia arborea* (L.) presenta mayor efecto genotóxico que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brugmansia arborea* (L.) Lagerh “floripondio” frente al ADN genómico humano.

Inga y Guerra (2000), mediante diversos análisis señalaron como influye el aceite del *Minthostachys mollis* en diferentes cepas bacterianas como: *Bacillus cereus* MC, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella Panasonic MC*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Asimismo evaluaron el impacto fungicida y bacteriostático sobre el *Fusarium* y *Aspergillus niger*.

Carhuapoma et al. (2009), realiza un estudio para evaluar el impacto anti-*Helicobacter pylori* frente aceite esencial de *Clinopodium brevicalyx* Epl. "Urqumuña" (antes llamado *Satureja brevicalyx*). Los investigadores utilizaron el método de difusión de discos y demostraron la actividad antioxidante y anti-*Helicobacter pylori*. Su alta citotoxicidad de los aceites que se encuentran en la muña afirman que su actividad biológica es alta.

Montes (2013), determinó la acción antihongos del extracto hidroalcohólico y óleo esencial de la "wayra muña" sobre una cepa de *Candida albicans*, el investigador realizó para el extracto hidroalcohólico, diversos ensayos fitoquímicos donde reportó metabolitos como: fenoles, lactonas, flavonoides, para el aceite esencial realizó exámenes físicos como densidad, rotaciones ópticas, índice refractorio. Montes analizó la concentración Mínima de fungicida (CMF) y la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite de *Satureja brevicalyx* Epl. Donde concluyó que el extracto hidroalcohólico de la wayra muña tiene una mayor actividad antimicótica a comparación del aceite esencial en las cepas de *Candida albicans*.

Maquera et al (2009). Realizó una investigación para determinar los componentes químicos que se encuentran en los aceites esenciales del *Minthostachys mollis* "muña" dicha investigación se llevó a cabo en laboratorios Holandeses: Quest Internacional y Givaudan, los investigadores utilizaron método de espectrometría de masas y cromatografía de gases (CG/MS). Concluyeron que en concentración, la pulegona es el componente principal del aceite esencial seguido por la menthona.

Benites et al., (2018), realizaron un estudio para determinar la composición del aceite esencial que fue obtenido a partir de hojas y tallos de *Minthostachys mollis* Griseb (Lamiaceae) el método que utilizaron los autores fue la hidrodestilación para la determinación de la actividad citotóxica usaron el ensayo colorimétrico para células sanas y que no sean tumorales en líneas celulares de cáncer humano, los investigadores concluyeron que la composición del aceite esencial son: Mentona, pulegona, cis-dihidrocarvona y acetato de carvacrol. También se concluyó que el aceite esencial presenta una baja actividad antioxidante.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. *Minthostachys mollis* Griseb "muña".

2.2.1.1. Ubicación taxonómica

Según Cronquist (1981). La muestra vegetal (**Anexo 1**), posee la asiento taxonómico a continuación detallada:

División	= Magnoliophyta
Clase	= Magnoliopsida
Sub clase	= Asteridae
Orden	= Lamiales
Familia	= Lamiaceae
Género	= <i>Minthostachys</i>
Especie	= <i>Minthostachys mollis</i> Griseb
Nombre vulgar	= “muña”.

2.2.1.2. Descripción botánica

Planta subfrútice o semileñosa, de 50 – 70 cm. de alto, erguida o decumbente, de tallos cuadrangulares, bastante ramificados y delgados, algo frágiles, generalmente los tallos tiernos posee pelos blanquecinos, hojas simples opuestas, pecioladas y enteras, ovalado-lanceoladas de bordes ligeramente aserradas sin estípulas. Los pelos glandulares contienen aceites esenciales que son los responsables de dar el aroma característico. Inflorescencias cimosas formado por numerosas flores pequeñas que nacen en los nudos del tallo; flores heteroclamídeas, bisexuales, zigomorfas, bilabiales y pentámeras; cáliz formado por 5 sépalos tubuladas, verdosas, corola por 5 pétalos blanquecinos, epipétalos, ovario súpero bicarpelar tetralocular presenta estilo ginobásico y el estigma bifido, con un ovulo en cada celda.

Crece en zonas frías y templadas, en forma silvestre en bordes de chacras, cercos y muy poco se cultivan en huertos familiares (Aucasime, 2013).



Figura 1. *Minthostachys mollis* Griseb “muña”.

Fuente: Elaboración propia

2.2.1.3. Propiedades medicinales de la muña

Por su alto contenido en esencias se usa para la extracción de aceites de menta, mentona y mentol para uso industrial y farmacológico, en medicina popular se usa como desinflamante de las amígdalas en forma de gárgaras, como digestivo contra gases tomando en infusión, como biocida y repelente para conservar tubérculos de papa, olluco, oca y mashua contra hongos, bacterias, gorgojas y otros agentes biológicos (Aucasime, 2013).

2.2.1.4. Composición química de la muña

El óleo esencial de *Minthostachys mollis* Griseb “muña, presenta en su composición química un porcentaje mayor los ésteres, éteres y terpenos tiene una distribución cetónica, aldehídica, alcohólica (mentol y mentona) y a la vez contiene: esteroides; glicósidos; mucílagos; calcio; taninos; trazos de vitamina B1; óleo esencial; esencias; saponinas; fósforo; mentol; alcaloides; Hidratos de carbono y hierro. (Gibaja, 1960).

a) Pulegona

Conocido como poleo (*Mentha pulegium*) al ser consumida en cantidades abundantes produce daño hepático, daño fetal y provoca abortos, el aceite esencial es usado para la eliminación de plagas y parásitos por su alto índice de toxicidad, el aceite también es utilizado como saborizante en lo culinario y en la perfumería.

b) Mentona

La mentona es otro componente importante, constituye el 75% y más de la constitución del óleo total. El componente de la menta que más se conoce es la (*Mentha piperita*). Posee una fragancia y sabe a menta bastante agradable, utilizada también en la perfumería y contiene propiedades digestivas.

c) Carvacrol

El carvacrol está presente en varias hierbas como la “ajedrea de jardín” (*Satureja hortensis*), el “tomillo del monte serpolio” (*Thymus serpyllum*), y “orégano” (*Origanum vulgare*). Dicho componente es altamente dominante y se encuentra en mayor proporción.

d) Carvona

Tiene propiedades digestivas y es utilizada como saborizante y es conocida porque se produce de las pepitas de alcaravea (*Carum carvi*), un Apiaceae.

e) Mentol

Es utilizado para aliviar el dolor de garganta.

f) Linalol

Comúnmente conocido como “cilantro” (*Coriandrum sativium*) de la familia Apiaceae es empleado como insecticida y en lo culinario es un condimento infaltable en diferentes potajes.

g) Timol

Componente de los óleos esenciales de diferentes especies de tomillo. Funciona con propiedad antiséptica y alivia la tos y el malestar en la garganta. Es un dispositivo menor presente en el óleo de *Minthostachys mollis* G. (Inga y Guerra, 2000; Mora, 2009).

2.2.2. Extracto hidroalcohólico y zumo

2.2.2.1. Extracto

Al someter una droga a la acción disolvente de un líquido y luego evaporando el soluto obtenido, al eliminarlo nos quedará un residuo que es lo que constituye el EXTRACTO.

Los extractos contienen dos clases de principios inmediatos: Inertes o modificantes de la energía terapéutica de los primeros donde se encuentran, gomas, mucílagos y colorantes etc. Activos o medicinales, entre los que se encuentran: alcaloides glucósidos, amidos, ácidos, principios amargos y aromáticos, algunas resinas etc. (Viveros, 1923)

2.2.2.2. Extracto hidroalcohólico

Proceso que consiste en la maceración de la corteza seca, trozada o molida en alcohol de 70°. Se remojan o maceran durante 5 días como mínimo, en recipientes de plástico, vidrio o acero inoxidable. Para acelerar el proceso se debe agitar el macerado, una vez finalizado el proceso se prensa, se filtra y se envasa (Rodríguez, 1998).

2.2.2.3. Zumo

Es un líquido que se logra cuando las frutas, vegetales, flores, plantas, etc. se les aplican una fuerza determinada con el único objetivo de triturar la materia orgánica para que se descomponga y se tenga como producto el zumo.

Hoy en día, se puede encontrar en el mercado diversas variedades de zumos naturales aunque al industrializarlo se pierden algunos nutrientes en comparación cuando se realiza en la forma tradicional. (Yirda, 2021).

2.2.3. DNA, Estructura físico química

El ácido desoxirribonucleico o el DNA, es aquella molécula que tiene información genética de todos los organismos vivos y de ciertos virus. El DNA se organiza

estructuralmente en cromosomas. Funcionalmente, está organizado en genes, y estos son partes del DNA que dan las características físicas exclusivas a cada organismo vivo y virus. Estas características provienen de una molécula llamada ARN, que se forma a partir del ADN y codifica proteínas. Se denomina: el fundamento central de la biología molecular, hay genes en el ADN que producen ARN mensajero, y esos genes producen proteínas. Esto da lugar a las múltiples propiedades físicas que vemos en las personas, como la altura, el color de ojos o tono de piel. (McPherson, 2001).

2.2.3.1. Estructura primaria del DNA

Es aquella secuencia de nucleótidos del polinucleótido linearizado. Todos los datos genéticos están ordenados precisamente de las bases nitrogenadas que conforman los nucleótidos, la información simplemente se alterará, si alguna de las bases se desordena o se modifica.

2.2.3.2. Estructura secundaria del DNA

El DNA en células eucariotas, está presente como una cadena doble de polidesoxirribonucleótidos. El DNA tiene 2 cadenas que forman una estructura helicoidal que giran en torno a un eje de simetría, de aquí proviene la denominación de “doble hélice del DNA” explicada en 1953 por Watson y Crick. En la hélice del DNA, la cadena que está ubicada en el exterior de la molécula, es una columna hidrofílica de desoxirribosa-fosfato y en el interior se orientan las bases nitrogenadas hidrófobas. El vínculo espacial creado por la torsión entre las dos hebras de la hélice genera un surco más grande y otro más pequeño. La doble cadena del DNA posee principales propiedades que son:

- Es antiparalela.
- Representación un giro helicoidal dextrógiro o levógiro.
- Es complementaria.

Es antiparalela porque el extremo 5' se asocia con el extremo 3' de la otra. Se complementan; es decir, las bases nitrogenadas de una se acoplan por puentes de hidrógeno a las bases nitrogenadas de la otra cadena.

La secuencia de nucleótidos de una cadena define y complementa la secuencia de nucleótidos de la otra cadena. Las reglas de Chargaff muestra los apareamientos específicos de las bases: en donde la cuantía de purinas es similar a la de pirimidinas. (Salazar et al., 2013).

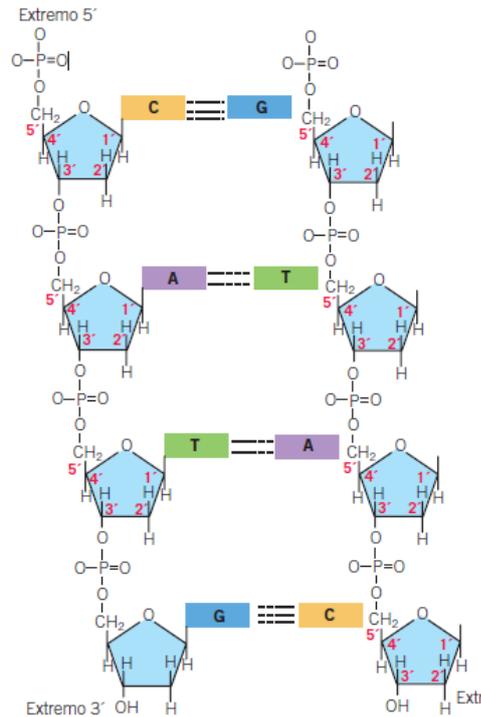


Figura 2. Estructura del DNA

2.2.3.3. Importancia de los enlaces covalentes y no covalentes para la estructura y estabilidad de las moléculas biológicas

Los enlaces químicos sirven para que los átomos puedan interaccionar entre ellos, dichos enlaces químicos incluyen alianzas covalentes que precisan la distribución de las moléculas y las uniones no covalentes que son de gran importancia bioquímica.

a) Enlaces covalentes

Son más fuertes y se encuentran en los compuestos bioquímicos, estas se mantienen unidas a los átomos de las bases individuales. El enlace covalente carbono – carbono (C-C) tiene una longitud de 1,54Å y una energía de enlace de 356 KJ mol⁻¹. Para romper los enlaces covalentes se deberá gastar una gran cantidad de energía.

b) Enlaces no covalentes

Son enlaces más débiles, son fundamentales en el proceso bioquímico, como la alineación del doble helicoidal. Existen 4 tipos esenciales de enlaces no covalentes que son los siguientes:

c) Interacciones electrostáticas

Conjunto cargado en una molécula logra atraer a un conjunto con carga opuesta en otra molécula, y la energía de la interacción electrostática que se da por la ley de Coulomb. (Berg, Tymoczko, & Lubert, 2007).

d) Puentes de hidrogeno

Son responsables de que se formen pares de bases determinados de la doble hélice del DNA, los enlaces de hidrogeno son más largos que los enlaces covalentes. Cuanto más fuertes sean los enlaces de hidrogeno llegan a ser aproximadamente lineales, por lo tanto el átomo de hidrogeno es responsable de las características de las propiedades del agua es por ellos que el agua es un disolvente especial.

Entre dos átomos relativamente electronegativos, como el nitrógeno y el oxígeno el átomo de hidrogeno se encuentra parcialmente compartido.

e) Interacciones de Van der Waals

Las interacciones están en las distribuciones de la carga electrónica próxima de un átomo que el tiempo lo modifica.

f) Interacciones hidrofóbicas

Son interacciones de moléculas no polares con agua, y estas interacciones no son tan buenas como las interacciones entre moléculas de agua. Resulta que las moléculas no polares del agua muestran una tendencia creciente a unirse entre sí. Las moléculas apolares no pueden participar en las interacciones iónicas ni en los puentes de hidrogeno (Berg, Tymoczko, & Lubert, 2007).

2.2.4. Extracción de DNA humano

La obtención de DNA de un individuo se usa para ejecutar diversos estudios que van a permitir caracterizar el genotipo de dicha persona. Para extraer el DNA se pueden utilizar tejidos de cualquier parte ya que las células humanas mayormente tienen una copia de DNA. Para que las muestras de ADN se puedan obtener sin ningún tipo de daño a las personas y se puedan obtener de manera fácil y rápida, existen innumerables métodos: lo más usual es a partir de sangre entera. La sangre está compuesta por diferentes tipos celulares entre ellos los glóbulos rojos no presentan núcleo es decir, los glóbulos rojos no tienen DNA a diferencia de los glóbulos blancos que si tienen un núcleo y ADN (Hartl et al., 2003)

Para poder purificar el ADN a partir de cualquier muestra, en el laboratorio se necesita realizar diferentes etapas como son:

- Disgregación del tejido: En un inicio, se elimina de la matriz extracelular, etc.
- Lisis celular: En esta etapa se utilizan diversos detergentes cuya función es destruir la membrana celular, y liberar al exterior el contenido de las células.

- Eliminación de proteínas o desproteización: Se realiza mediante extracciones repetidas de las proteínas con disolventes orgánicos (como el cloroformo y fenol) algunas veces se realiza después de incubar con enzimas que degradarán las proteínas (proteasas).
- Precipitación de ADN: Cuando el DNA está purificado, se usa el alcohol que puede ser isopropanol o etanol en presencia de sales para conseguir la precipitación. En la actualidad, existen una gran diversidad de “kit” que ayudan a simplificar la purificación de ADN genómico para cualquier tipo de tejido, son recomendables cuando se tienen gran cantidad de muestras para procesar. (Castaño, 1996).

Para obtener el ADN de glóbulos blancos se realizó con el protocolo modificado y explicado por (Miranda, 2017).

2.2.4.1. Proteinasa K

Para asegurar que el aislamiento del DNA este intacto, se debe una enzima proteasa estable como es la proteinasa K, con el objetivo de prevenir la hidrolisis del ADN por nucleasas celulares.

Esta enzima actúa exclusivamente en las uniones peptídicas. Esta proteasa, necesita una temperatura óptima de 65°C. (Martínez, 2007)

2.2.4.2. Cuantificación y determinación de pureza de DNA

Uno de los factores principales para cualquier análisis molecular, es la pureza del ADN, y para medir la cantidad de ácidos nucleicos se utilizan métodos como la absorbancia y fluorescencia. (Granero et al., 2018; Monroy et al., 2014).

La pureza del DNA, es una forma de controlar la calidad del mismo, por la tanto la calidad es un factor que condiciona el tipo de aplicaciones sean a nivel de investigación o de diagnóstico motivo por el cual el ADN no debe tener ningún contaminante como; proteínas, alcoholes, cebadores, nucleótidos.

Otros factores importantes son la concentración, integridad, funcionalidad y trazabilidad.

Posterior a la extracción de ácidos nucleicos se realiza la lectura a 260nm y 280nm longitudes de onda, se debe realizar a 260nm con el objetivo de cuantificar la cantidad de ácidos nucleicos que está presente en la muestra.

Se tiene como referencia que una Densidad Óptica (O.D.), medida a 260nm, concierne cerca de:

- 20 ug/ml cuando se trata de oligonucleótidos.
- 40 ug/ml de ARN o de DNA de cadena simple

- 50 ug/ml de DNA de doble cadena.

Por lo general, existen diferentes formas de medir la cantidad de ácido nucleico en solución. (Gallou et al., 2015).

2.2.4.3. Electroforesis en gel de agarosa

Es un método de separación de sustancias cargadas cuando se aplican un campo eléctrico, con el objetivo de diferenciar la conducta en el campo eléctrico. Si las partículas cargadas son positivas (cationes) podrán emigrar hacia cátodo y las de forma negativa en dirección al ánodo (Fairbairn et al., 1995).

Con este método se inmovilizan las muestras estudiadas en material gelatinoso. El gel es sometido a corriente eléctrica en un lapso de tiempo. La muestra iniciará la migración mediante los poros del gel a diferentes velocidades, según la carga y el tamaño de la molécula. Cuando se completa la separación, la ruta actual se cierra y la muestra separada se pinta para visualizarlas. Cada muestra está a una distancia diferente del principio. Los ácidos nucleicos están cargados y son solubles porque poseen un grupo fosfato, el resto que imparte la carga y, a menudo, existe en la estructura. Los ácidos nucleicos pueden traducirse en un campo eléctrico y, por lo tanto, pueden separarse mediante electroforesis. El gel se sumerge en un electrolito tamponado con triborato para demostrar que los ácidos nucleicos tienen una carga negativa, razón por la cual el método se llama electroforesis de inmersión. Las moléculas se trasladarán hacia el polo positivo, por lo que transitarán por el gel en esa dirección, separadas por tamaño (número de nucleótidos), colocando unas etiquetas (cargando colorantes) al cargar la muestra, permitiéndonos hacerlo en el momento que veamos. Para poder observar las bandas, el gel debe ser teñido o las moléculas deben radiomarcarse. El procedimiento de mayor uso en geles de agarosa es el bromuro de etidio, que procede como intercalador y, por tanto, conjuntamente con reducir la densidad de la molécula, es capaz de presentar luminosidad cuando es excitado por la luz ultravioleta. Este compuesto debe usarse con cuidado porque es altamente cancerígeno. (Speit et al., 2009).

2.2.5. Efecto de los metabolitos secundarios sobre el DNA

Los metabolitos secundarios son compuestos derivados de intermediarios de varias vías metabólicas primarias y se clasifican según sus precursores formados el primer día de gasto energético. (Kaul et al., 2012).

La OMS estima que el 80% de la población utiliza diversas plantas para la medicina tradicional, y estas plantas también se utilizan en la medicina moderna;

de igual forma, se calcula que alrededor de una cuarta parte de todos los medicamentos recetados contienen extractos de plantas o principios activos obtenidos de plantas o Ingredientes activos sintetizados a partir del conocimiento botánico. Estos compuestos que se encuentran en las plantas con propiedades terapéuticas pueden estar indirecta o directamente relacionados con el ADN, dando lugar a mutaciones que deterioran la función celular y conducen a trastornos de la salud. Las plantas tienen la capacidad de producir compuestos, la mayoría de los cuales están relacionados con fenoles, quinonas, taninos y alcaloides. Los compuestos fenólicos y monoterpenoides contenidos en los aceites esenciales funcionan al descomponer los lípidos en la membrana plasmática de los organismos microscópicos, lo que facilita el flujo de electrones y nuevos contenidos celulares, y se pierden partículas y compuestos llevando a la espiración de los organismos microscópicos, timol y carvacrol actúan sobre las membranas celulares provocando inestabilidad y aumento de la permeabilidad (Inga y Guerra, 2000; Mora, 2009).

2.2.6. Ensayo de exposición directa del DNA genómico humano a extractos vegetales

(Miranda, 2017), Se desarrolló un procedimiento para determinar la influencia genotóxica *in vitro* de matas terapéuticas y/o productos de fitoterapia sobre el DNA genómico. ¿Esto sugiere que es necesario saber exactamente cuál órgano de la mata? para la elaboración de medicinas hogareños y obtención de extractos de los mismos, que pueden ser acuosos, hidroalcohólicos o utilizados con otro disolvente orgánico, si se estudia látex o Jugo, se sugiere obtenerlo directamente de la planta.

El método incluye preparar soluciones de extractos de plantas medicinales de múltiples cantidades: 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL; en el caso del látex, se prepararon disoluciones a cantidades de 1 - 2.5 - 5 - 10 - 25 - 50 y 100%. Asimismo, conseguir ADN genómico del organismo estudiado (animal - microbiano o humano) por extracción orgánica o kits comerciales, asegurando que el DNA obtenido esté intacto y no fragmentado, luego preparar a una cantidad de 1.500 ng/200 μ L stock en μ L.

Para evaluar la genotoxicidad *in vitro* por dispersión del ADN, se preparó un juego de 10 tubos de 500 μ L (marcados del 1 al 10), el ADN de 14 μ L de la solución madre se colocó en los tubos del 1 al 7, luego 6 μ L de cada Concentración de extracto o Se agregó látex a los tubos convenientes del 1 al 7;

el tubo 8 se usó como "blanco", depositando 14 μ L de zumo 100% o látex 100% más 6 μ L de agua bidestilada; el tubo 9 se usó como "control", colocar 14 μ l de DNA y 6 μ l de agua bidestilada; coloque 14 μ l de ADN más 6 μ l de extracto 100 % o 100 % de látex, más 6 μ l de proteinasa K en un tubo n.º 10 como "descarte de nucleasa". 1 hora a 37°C, hasta 4 horas si es necesario. Con la excepción del marcador de tamaño molecular (50 pb), los productos de ensayo en cada tubo fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% a 40 voltios durante 3 horas y luego se visualizaron con iluminación hiperluminica. Registros morados y fotografiados. Estos registros fotográficos muestran la acción genotóxica de la desintegración del ADN a siete concentraciones diferentes probadas, "blanco" para comprobar que no hay ADN que contamine el extracto o látex, "control" para cotejar la suma de DNA no tratado, en relación con la 7 tubos que recogieron el tratamiento; y "tratamiento con nucleasas" para confirmar este efecto por el accionar de metabolitos secundarios, no por la acción de las nucleasas, ya que se destruirán por las proteasas durante el período de incubación. El efecto de K se destruye. Los niveles de fragmentación se comparan en porcentajes según la categorización de la "prueba del cometa" propuesta por Speit (1995) y Collins (2004), dando como resultado una calificación numérica de cinco niveles: 0, 1, 2, 3 y 4. Se determinó que el método era eficaz y eficiente para evaluar el daño del ADN y determinar la genotoxicidad en plantas medicinales debido a la fragmentación del ADN.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

Fue desarrollada en Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, entre febrero a octubre de 2017 en la ciudad de Ayacucho. El tamizaje fitoquímico de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”, se desarrolló en laboratorio de Farmacognosia, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud. La identificación taxonómica fue efectuada por la Bióloga Laura Aucasime (Anexo 1); y la obtención del DNA del gen humano, los estudios de genotoxicidad, se realizaron en el (C.I.B.M.B) de la FCB.

3.2. Definición de la población y muestra

3.2.1. Población

Minthostachys mollis Griseb “muña”, que crecen en el Centro poblado de 24 de Junio, distrito de Huamanguilla, provincia de Huanta, región de Ayacucho.

3.2.2. Muestra

Constituida por 4 kg de las hojas y tallos de *Minthostachys mollis* G. “muña”.

3.2.3. Muestreo

El muestreo usado en la investigación fue de tipo no probabilístico, dirigido o intencional, en el que la selección de los elementos de la muestra no es al azar sino según la conveniencia del investigador o de las características propias de la investigación. (Lock, 1994).

a) Criterios de inclusión

Plantas de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”, frescas y en buen estado.

b) Criterios de exclusión

Plantas de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”, secos y en malas condiciones.

3.2.4. Lugar de muestreo

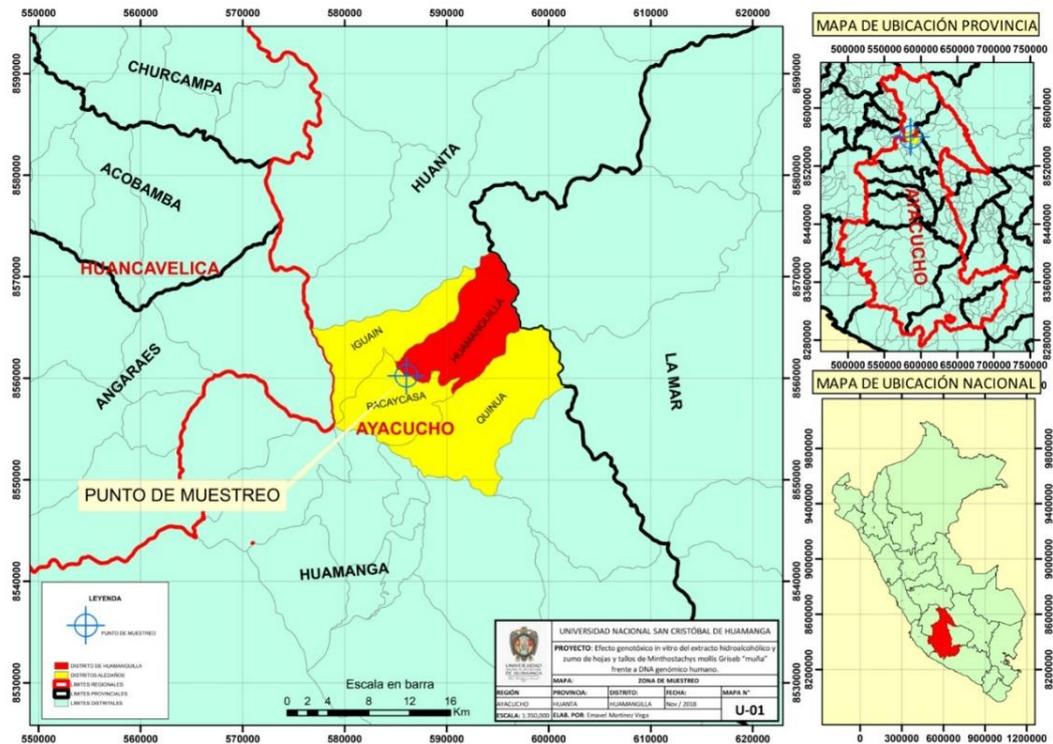


Figura 3. Mapa de ubicación del distrito de Huamanguilla, lugar del muestreo.

Fuente: Elaboración propia

3.3. Unidad experimental

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

3.4. Procedimiento

3.4.1. Recolección de la muestra

La "muña" tomada para prueba, posteriormente se transportaron al laboratorio de Biología Molecular de la FCB de la UNSCH, para el secado conveniente a temperatura ambiente, apartando las muestras que presenten señales de alteración.

La identificación taxonómica se ejecutó por la Blga. Laura Aucasime Medina en el Laboratorio de Botánica de la FCB. (Anexo 1)

3.4.2. Obtención de polvo de muña

Secado. Como primer paso, las muestras fueron lavadas con agua a presión con la finalidad de eliminar los restos de tierra, con el objetivo de conservarlas y que tengan un buen secado, fueron dejados bajo sombra y a temperatura ambiente teniendo como base el papel kraft que fueron cambiadas en varias ocasiones y volteadas las muestras para evitar la humedad y posterior deterioro de las muestras obteniendo un secado. (Anexo 3)

Molienda.- Las muestras secas de “muña” se molieron en un mortero de porcelana previamente esterilizada hasta lograr un polvo fino y para conseguir el extracto, fue con muestras en estado fresco. (Anexo 4 y 5).

3.4.3. Obtención del extracto hidroalcohólico y zumo

Se prepara del extracto hidroalcohólico con un kg de hojas y tallos de *Minthostachys mollis* G. “muña”, seco y en buen estado, molido en mortero de porcelana preesterilizado en autoclave para reducir a una masa uniforme.

Las muestras pulverizadas de hojas y tallos, respectivamente, fueron procesadas independientemente con el siguiente protocolo: fueron pesados 100 gr de la muestra molida y se vació en un envase de vidrio color ámbar, se agregó 1 L de solvente etanol: agua (3:1) que fue producto de combinar 750 mL de etanol de 96° con 250 mL de agua destilada estéril; Cubrir muestras con más de 1 cm de diferencia. Durante los 5 días de inmersión, agite la botella durante 15 min 2 veces diarias para distribuir el solvente uniformemente en la muestra y almacene la botella de inmersión en un sitio fresco y oscuro. Posteriormente se filtró con la ayuda de papel, luego se transfirió a un evaporador rotatorio BUCHI-3000 con una presión que fue reducida y por último se estableció la sequedad en un horno MEMERT a 37°C. Partiendo de este extracto se realizaron ensayos cualitativos fitoquímicos y se prepararon diferentes concentraciones para pruebas preliminares de efectos de degradación.

Para obtener el jugo, utilizar 200 gramos de muña fresca y en buen estado, triturar en un mortero de porcelana esterilizado con anterioridad en autoclave, luego filtrar en gasa estéril, luego aplicar cierta presión en papel filtro estéril, para obtener filtrados de calidad, ensayos fitoquímicos y preparación de varias concentraciones antes de las pruebas de degradación del ADN. (Anexo 6 y 7).

3.4.4. Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de hojas, tallos y zumo de *Minthostachys mollis* G. “muña”

Fue realizada una marcha fitoquímica cualitativa a los extractos hidroalcohólico y zumo obtenido de la “muña”, respectivamente, para identificar los diferentes metabolitos secundarios presentes. (Anexo 8) La reacción de identificación se llevó a cabo según el método propuesto por Lock (Lock, 1994).

Tabla 1. Características generadas en los ensayos para la identificación de los metabolitos secundarios de plantas.

Metabolitos secundarios	Ensayos: con reactivos	Observación
	Dragendorff	
Alcaloides	Mayer Hager Wagner	En toda reacción se observa una formación de precipitados.
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	Presencia de precipitados con una coloración naranja a roja.
Flavonoides	Shinoda	En la fase amílica se observa un color amarillo, naranja, carmelita o rojo.
Quinonas	Borntrager	La etapa amoniacal se torna rojiza o rosada si resulta positiva.
Catequinas	Catequinas	El ensayo se considera positivo si hay una coloración verde carmelita a luz ultravioleta.
Saponinas	Espuma	Si el ensayo es positivo, se observa una formación de espuma en la superficie.
Azúcares Reductoras	Benedict	Si es positivo, se forma un precipitado rojo ladrillo.
Taninos y/o fenoles	Cloruro férrico	Color verde intenso, azul o negro.
Aminas (aminoácidos)	Ninhidrina	Formación de coloración violeta.
Cardenólidos	Kedde	Formación de coloración violácea.

Fuente: Según Lock.1994

3.5. Extracción de DNA genómico humano a partir de muestra de sangre

Se solicitó la donación de una unidad de sangre para transfusión, con fecha expirada (para no usar consentimiento informado de los donantes), al Banco de Sangre del Hospital Regional de Ayacucho, para la conseguir del DNA de glóbulos blancos, se realizó mediante el protocolo modificado y descrito por Miranda (2017). Los pasos se describen a continuación tal como lo describe el autor:

1. Transfiera 1 ml de sangre del tubo de centrifuga tapado y agregue 9 ml de tampón Tris-HCL 50 mM (pH 7,7). Precalear a 37°C.
2. "Se homogeneizó y se incubó a 37°C durante 30 minutos, luego se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos para sedimentar los linfocitos".
3. "Aspirar el sobrenadante con una pipeta Pasteur, dejando una centrifuga de 1 ml (botón de celda) en el fondo del tubo".
4. Repita los pasos 2 y 3 (esta vez con 7 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,7), pasos 4 y 5) hasta completar una preparación transparente.

5. Agregar 1 mL de centrifuga, homogeneizar 9 mL de solución salina (0,85% NaCl) y centrifugar a 2500 rpm/10 min.
6. Aspire y deseche el sobrenadante hasta que solo quede el sedimento (botón celular), luego vuelva a suspender el sedimento en 0,5 ml de solución HIGH TE (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM EDTA). Vuelva a suspender el sedimento y transfíralo a un tubo de microcentrífuga de 2 ml.
7. Añadir 0,5 ml de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 40 mM; SDS al 1%; NaCl 10 mM) precalentada a 50°C.
8. Añadir 10 µL de solución de proteinasa K (20mg/mL) e incubar a 53°C durante 1,5 horas.
9. Agregar 1 mL de una solución de fenol saturada con Tris: cloroformo: isoamyl alcohol (24:1). Y homogeneizar suavemente por inversión durante 10 min.
10. Centrifugarlo en una microcentrífuga durante 10 minutos para separar las fases. A continuación, aspire la capa acuosa superior que contiene ADN y transfírala a un tubo de microcentrífuga de 2 mL.
11. Agregar 1 mL de solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) a la fase acuosa y homogeneizar por inversión por 5 min. Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 min en una microcentrífuga. Aspire la fase acuosa que contiene ADN y transfírala a un nuevo tubo de microcentrífuga de 2 ml.
12. Repita el paso 11 hasta obtener una etapa de agua completamente clara.
13. Se añadió solución de acetato de sodio 3 M, pH 5,2. La suma es igual a 1/10 del volumen del grado del agua.
14. Se añadió un volumen de isopropanol frío y se colocó en hielo durante la noche. Centrifugar a 14.000 rpm durante 15 min en una microcentrífuga.
15. Retire con cuidado el sobrenadante y enjuague el precipitado con 1 mL de etanol al 70%.
16. Girar en una microcentrífuga durante 10 min para eliminar el alcohol y permitir que el sedimento se seque a temperatura ambiente.
17. Vuelva a suspender el sedimento en 400 µL de solución de TE baja (Tris HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) y guárdelo en el refrigerador.” (Miranda, 2017)

3.6. Valoración del DNA extraído

3.6.1. Determinación de la concentración con espectrofotómetro

Se realizó siguiendo el protocolo del equipo Eppendorf Bio Photometer ® plus:

1. Homogeneice lentamente la muestra de ADN 10 veces con una micropipeta de 100 μL .
2. Prepare un espectrofotómetro UV de la marca Eppendorf Bio Photometer plus, opcionalmente para la cuantificación de ADN.
3. Para limpiar la superficie de la muestra del adaptador, coloque 2 μL de agua bidestilada estéril y seque con papel, repitiendo 2 veces para una mejor limpieza.
4. Nuevamente, coloque 2 μL de agua bidestilada estéril en la superficie del adaptador, coloque una tapa de 0,2 mm de 50 Lp, calibre con la opción BLANK y obtenga "absorbancia cero" (0,000 A°).
5. Seque el agua con la seda, luego colóquela en 2 μL de la muestra de ADN, cierre la tapa, presione la opción MUESTRA y vea los resultados de cuantificación y pureza del ADN en la pantalla del dispositivo; luego seque la muestra con la seda.
6. Los pasos 4 y 5 se realizan 2 veces para cuantificar cada muestra de ADN.
7. Una vez completada la cuantificación del ADN, precipitar con 2 μL de agua bidestilada estéril, secar y apagar el dispositivo.

3.6.2. Evaluación de la calidad del DNA extraído por electroforesis

En cuanto a la integridad del ADN obtenido, la calidad se visualiza por electroforesis, realice los siguientes pasos:

- a) Se preparan los volúmenes de carga para la electroforesis en gel de agarosa al 1 % a partir de muestras de ADN de acuerdo con la siguiente tabla.

Tabla 2. Preparación de carga de DNA para visualización de banda en electroforesis. Ayacucho, 2017.

Nº de carril en gel de agarosa	DNA stock (μL)	Buffer Loading 6X (μL)	Volumen de agua PCR (μL)	Volumen final de carga (μL)
1	7	1	2	10

- b) El contenido de la mezcla se carga en cada pozo de un gel de agarosa al 1% en sus respectivos carriles.
- c) A continuación, la cámara de electroforesis se conectó a una fuente de alimentación y se hizo funcionar a 40 voltios durante 1 hora.
- d) Fue sumergido el gel de agarosa en un recipiente con bromuro de etidio al 1% por diez min, luego fueron realizados dos enjuagues suaves con agua corriente, consecutivamente se vio por radiación en UV en el sistema de registrador de imágenes marca Biometra UV solo TS.

3.7. Ensayo de degradación de DNA *in vitro*

Fue desarrollado con los protocolos detallados en Miranda (2017), con estas etapas:

3.7.1. Fase de cuantificación y preparación de stock de DNA genómico obtenido para el ensayo

El DNA del gen humano se ponderó en un espectrofotómetro UV marca Eppendorf BioPhotometer plus, luego en cada ensayo de degradación *in vitro* se prepararon extractos o savia de la planta medicinal en estudio a una cantidad de 1,500 ng/ μ L y un volumen final de 200 μ L de solución de reserva.

3.7.2. Fase de ensayo de degradación *in vitro* del DNA genómico humano frente al extracto hidroalcohólico y zumo de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”, respectivamente

Se preparó en primer lugar las soluciones de los extractos hidroalcohólico de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”, a cantidades de 5 – 10 – 25 - 50 y 100 mg/mL, posteriormente en cantidades de 200 – 300 - 400 y 500 mg/mL, correspondientemente. Con el extracto de “muña” se elaboraron soluciones a cantidades de 5 – 10 – 25 - 50 y 100 %, con agua bidestilada estéril. Así mismo, se usó como “blanco” o “testigo” el extracto hidroalcohólico de 100 mg/mL y de 500 mg/mL; mientras que, con el zumo se usó como “blanco” o “testigo” el de 100 %. Como “control” 20 μ L de DNA genómico humano.

Además, se elaboró un tubo con 14 μ L de DNA más 6 μ L del extracto con la mayor cantidad más 3 μ L de la enzima proteinasa K.

Para mejor disposición, las mezclas de los ensayos de degradación *in vitro* de DNA del gen humano, se prepararon:

Tabla 3. Preparación de las mezclas para ensayo de degradación *in vitro* del DNA genómico humano frente a múltiples cantidades del extracto hidroalcohólico de *Minthostachys mollis* Griseb “muña” (primer grupo), Ayacucho 2017.

Condiciones		Mezclas para ensayo degradativo <i>in vitro</i>							
		1	2	3	4	5	6	7	8
N° de tubo Eppendorf							B	C	C/PK
Stock de DNA (1 500 ng/ μ L)	Volumen en μ L	14	14	14	14	14	-	20	14
Extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de “muña”	Concentración (mg/mL)	5	10	25	50	100	100	-	100
	Volumen (μ L)	6	6	6	6	6	20	-	6
Proteinasa K		-	-	-	-	-	-	-	3
Volumen total (μ L)		20	20	20	20	20	20	20	23
Incubación en baño María a 37 °C x 1 hora									

Tabla 4. Preparación de las mezclas para ensayo de degradación *in vitro* del DNA genómico de humano frente a múltiples cantidades del extracto hidroalcohólico de *Minthostachys mollis* Griseb “muña” (segundo grupo), Ayacucho 2017.

Condiciones		Mezclas para ensayo degradativo <i>in vitro</i>						
N° de tubo Eppendorf		1	2	3	4	5	6	7
						B	C	C/PK
Stock de DNA (1 500 ng/μL)		14	14	14	14	-	20	14
Volumen en μL								
Extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de “muña”	Concentración (mg/mL)	200	300	400	500	500	-	500
	Volumen (μL)	6	6	6	6	20	-	6
Proteinasa K		-	-	-	-	-	-	3
Volumen total (μL)		20	20	20	20	20	20	23
Incubación en baño María a 37 °C x 1 hora								

Tabla 5. Preparación de las mezclas para ensayo de degradación *in vitro* de DNA genómico de humano frente a diferentes cantidades de zumo de hojas y tallos de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”, Ayacucho 2017.

Condiciones		Mezclas para ensayo degradativo <i>in vitro</i>							
N° de tubo		1	2	3	4	5	6	7	8
							B	C	C/PK
Stock de DNA (1 500 ng/μL)		14	14	14	14	14	-	20	14
Volumen en μL									
Zumo de “muña”	Concentración (%)	5	10	25	50	100	100	-	100
	Volumen (μL)	6	6	6	6	6	20	-	6
Proteinasa K		-	-	-	-	-	-	-	3
Volumen total (μL)		20	20	20	20	20	20	20	23
Incubación en baño María a 37 °C x 1 hora									

Se realizaron cuatro repeticiones para cada ensayo de degradación *in vitro* de las plantas medicinales estudiadas, incluidos extractos hidroalcohólicos y jugos de frutas.

3.7.3. Fase de electroforesis para la detección de genotoxicidad

Prepare un gel de agarosa al 1% y colóquelo en una cámara de electroforesis Biometra. Para cargar volúmenes en pocillos de gel de agarosa, utilice los volúmenes descritos:

Tabla 6. Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de DNA genómico humano (primer grupo) con el extracto hidroalcohólico de “muña”, para el ensayo de degradación *in vitro*. Ayacucho 2017.

Condiciones		Volúmenes de carga para ensayo degradativo <i>in vitro</i>									
Nº de carril del gel		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Muestra	Concentración (mg/mL)	Marcador molecular 1kb	5	10	25	50	100	100	B	C	C/ PK
	Volumen (µL)	5	8	8	8	8	8	8	8	8	
	Loading (µL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	Volumen total (µL)	7	10	10	10	10	10	10	10	10	

Inmediatamente se colocó la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se proyectó el corrido a 40 voltios (V) durante 150 minutos.

Tabla 7. Preparar el volumen de carga de la solución en pocillos de gel de agarosa con solución de digestión de DNA del gen humano (segundo grupo) con el extracto hidroalcohólico de “muña”, para el ensayo de degradación *in vitro*. Ayacucho 2017.

Condiciones		Volúmenes de carga para ensayo degradativo <i>in vitro</i>								
Nº de carril del gel		1	4	5	6	7	8	9	10	
Muestra	Concentración (mg/mL)	Marc. Mol. 1kb	200	300	400	500	500	B	C	C/ PK
	Volumen (µL)	5	8	8	8	8	8	8	8	8
	Loading (µL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Volumen total (µL)	7	10	10	10	10	10	10	10	10

A continuación, la cámara de electroforesis se montó en una fuente de alimentación y se programó para funcionar a 40 voltios (V) durante 150 min.

Tabla 8. Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de DNA del gen humano con el zumo de “muña”, para el ensayo de degradación *in vitro*. Ayacucho 2017.

Condiciones		Volúmenes de carga para ensayo degradativo <i>in vitro</i>									
Nº de carril del gel		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Muestra	Concentración (%)	Marcador molecular 1kb	5	10	25	50	100	100	B	C	C/ PK
	Volumen (µL)	5	8	8	8	8	8	8	8	8	
	Loading (µL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	Volumen total (µL)	7	10	10	10	10	10	10	10	10	

A continuación, la cámara de electroforesis se montó en una fuente de alimentación y se programó para funcionar a 40 voltios (V) durante 150 min.. (Anexo 11 y 12)

3.7.4. Fase de lectura por radiación UV

Después del tiempo de ejecución de la electroforesis, el gel de agarosa debe sumergirse en una solución de bromuro de etidio al 1% durante aproximadamente 15 minutos, enjuagarse dos veces con agua destilada y observarse la genotoxicidad de las bandas y/o fragmentos de ADN resultantes. Exponga el gel de agarosa a la luz ultravioleta en el sistema de imágenes Biometra UVsolo TS.

Además, las fotos se tomaron en un transiluminador UV de la marca Ultra Lum utilizando una cámara digital Canon 20x 12,1 megapíxeles full HD. En ambos casos, cada banda de ADN frente a diferentes concentraciones de extracto de planta o savia se observó en los carriles de gel, en comparación con las bandas en los carriles 'control' y 'blanco'.

3.7.5. Fase de interpretación visual y clasificación de la degradación *in vitro* del DNA en términos de fragmentación frente al extracto o jugo de la planta, plasmado en el registro fotográfico

Los niveles de fragmentación del ADN como productos de degradación *in vitro* de los derivados de plantas medicinales investigados se visualizaron en los registros fotográficos, y se probaron en una escala numérica según la clasificación de “cometas” de Speit (1995) y Collins (2004) presentada en el artículo de Mónica Marisol Larrea Poma.

Tabla 9. Clasificación visual de la degradación *in vitro* del DNA, en términos de niveles de su fragmentación (valores numéricos), observados en registro fotográfico.

Clase: Valor numérico	Genotoxicidad
0	Fragmentación de DNA < 5%
1	” de DNA entre: 5 - 20%
2	” de DNA entre: 20 - 40%
3	” de DNA entre: 40 - 95%
4	” de DNA >95%

Fuente: Larrea Poma M, 2007

3.8. Tipo

El estudio que realizamos corresponde al tipo de experimento, ya que este estudio cumple dos requisitos para conseguir la validez de control y la validez interna: a) comparación de grupos (se manipulan las variables independientes), b) equivalencia de grupos.

3.9. Diseño

El estudio realizado fue un diseño post-test y solo control, que constó de dos grupos: un grupo recibió el tratamiento experimental y el otro grupo no (grupo

control). Es decir, la variable independiente es manipulada solo en dos niveles: presencia y ausencia. Una vez finalizado el procedimiento, ambos grupos midieron la variable dependiente.

Tabla 10. Diseño de investigación con pos prueba únicamente y grupo de control.

Grupo	Tiempo de incubación	Tratamiento	Observación
G ₁	1 Hora	Control	O1
		Blanco	O2
		5 mg/ mL	O3
		10 mg/ mL	O4
		25 mg/ mL	O5
		50 mg /mL	O6
		100 mg/ mL	O7
		200 mg/ mL	O8
		300 mg/ mL	O9
		400 mg/ mL	O10
		500 mg/ mL	O11
		PK	O12
G ₂	1 Hora	Control	O13
		Blanco	O14
		5%	O15
		10%	O16
		25%	O17
		50%	O18
		100%	O19

Se realizó por cada ensayo cuatro repeticiones.

3.10. Análisis de datos estadísticos

La información conseguida fue agrupada y demostrados en forma tabular para interpretar mejor los registros fotográficos y las representaciones numéricas de los hallazgos. Los valores que expresan la degradación del ADN *in vitro* se evaluaron mediante el paquete de software estadístico SPSS versión 23, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis para muestras no paramétricas. Un valor de $p < 0,05$ se consideró un nivel estadístico significativo.

Para lo cual se planteó esta hipótesis:

H_0 = Sin efecto degradativo.

H_1 = Con efecto degradativo.

IV. RESULTADOS

Tabla 11. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Minthostachys mollis* G. “muña”. Ayacucho, 2017.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados		Observaciones
		Hojas	Tallos	
	Dragendorff	++	+	Precipitado naranja
Alcaloides	Mayer	+++	-	Precipitado blanco
	Wagner	++	+	Precipitado naranja
Cumarinas y/o lactonas	Borntrager	++	++	Coloración naranja
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico	++++	++++	Precipitado azul negruzco intenso
Flavonoides	Shinoda	++++	+	Coloración naranja
Saponinas	Espuma	-	+	Espuma
Azúcares reductores	Benedict	-	+	Precipitado rojo ladrillo
Catequinas	Catequinas	++++	++	Fluorescencia verde azulada
Triterpenos y/o esteroides	Lieberman	++	+	Coloración azul
Cardenólidos	kedde	-	-	No presentó coloración rojo violeta

Tabla 12. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el zumo de hojas y tallos de *Minthostachys mollis* G. “muña”. Ayacucho, 2017.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados Zumo	Observaciones
	Dragendorff	++	Precipitado naranja
Alcaloides	Mayer	+++	Precipitado blanco
	Wagner	++	Precipitado naranja
Cumarinas y/o lactonas	Borntrager	-	No presentó coloración roja
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico	++++	Precipitado azul negro intenso
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración naranja
Saponinas	Espuma	++	Espuma
Azúcares reductores	Benedict	-	No presentó precipitado rojo ladrillo
Catequinas	Catequinas	++	Fluorescencia verde azulada
Triterpenos y/o esteroides	Lieberman	+++	Coloración azul
Cardenólidos	kedde	+	Coloración rojo violeta

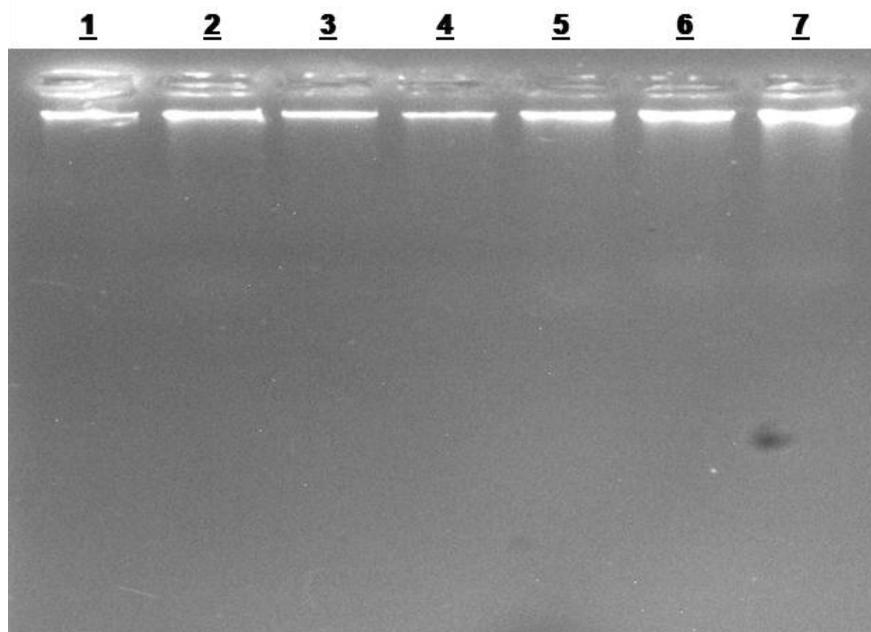


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del DNA del gen humano, corrida a 30V durante 60 min. Carriles (1-7).

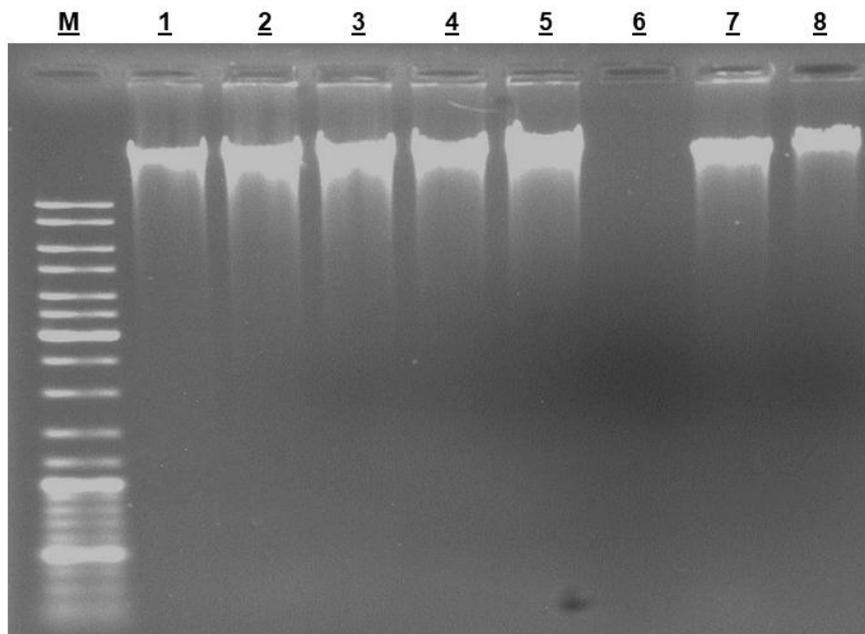


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de DNA del gen humano versus extracto hidroalcohólico de hojas de muña. Funciona a 40 V x 150 minutos. Carril (M), marcador de volumen molecular de 1 kb; carriles (1-5), extractos hidroalcohólicos de muña en cantidades de 100 – 50 – 25 - 10 y 5 mg/mL; carril (6), control puro extracto hidroalcohólico de muña (100 mg / mL); carril (7), control de DNA genómico humano; carril (8), ADN genómico humano + extracto hidroalcohólico puro (100 mg/mL) + proteinasa K.

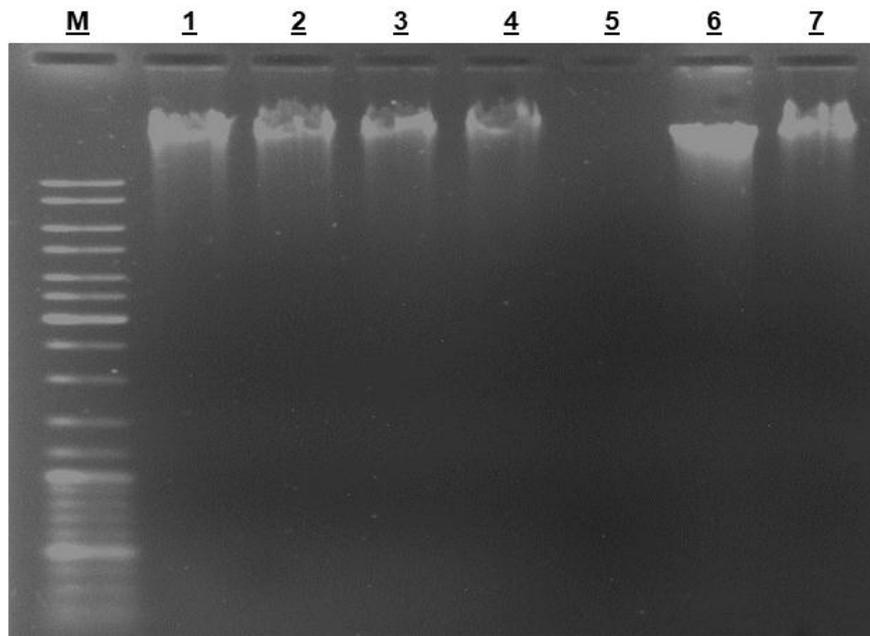


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de DNA del gen humano versus extracto hidroalcohólico de hojas de muña. Funciona a 40 V x 150 minutos. Carril (M), marcador de volumen molecular de 1 kb; carriles (1-4), extracto hidroalcohólico de muña en cantidades de 200 – 300 - 400 y 500 mg/mL; carril (5), extracto hidroalcohólico puro de muña control (500 mg/ mL); carril (6), control de DNA genómico humano; carril (7), ADN genómico humano + extracto hidroalcohólico puro (500 mg/mL) + proteinasa K.

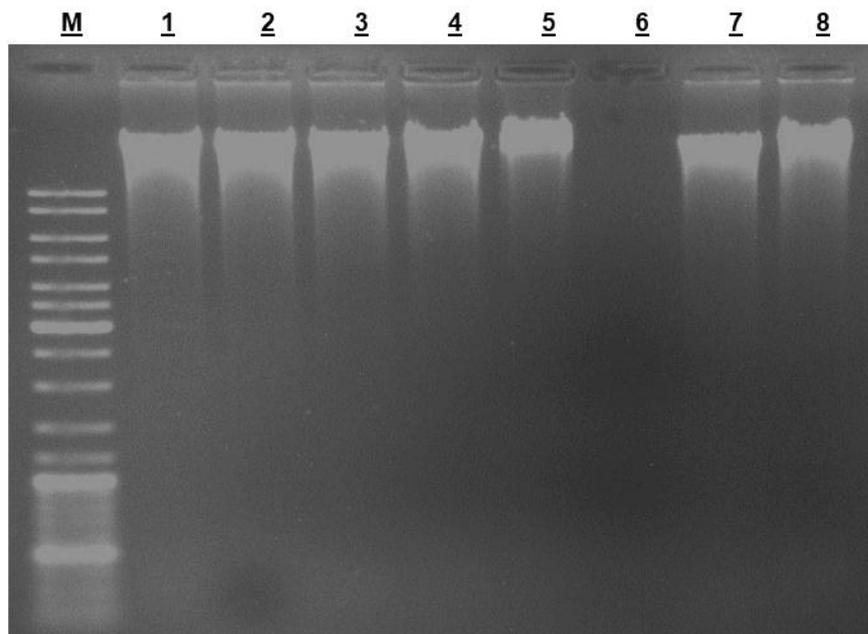


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de DNA del gen humano en comparación con extractos hidroalcohólicos de tallos de muña. Funciona a 40 V x 150 minutos. Carril (M), marcador de volumen molecular de 1 kb; carriles (1-5), extractos hidroalcohólicos de muña en cantidades de 5 – 10 – 25 - 50 y 100 mg/mL; carril (6), control puro extracto hidroalcohólico de muña (100 mg/ mL); carril (7), control de ADN genómico humano; carril (8), ADN genómico humano + extracto hidroalcohólico puro (100 mg/mL) + proteinasa K.

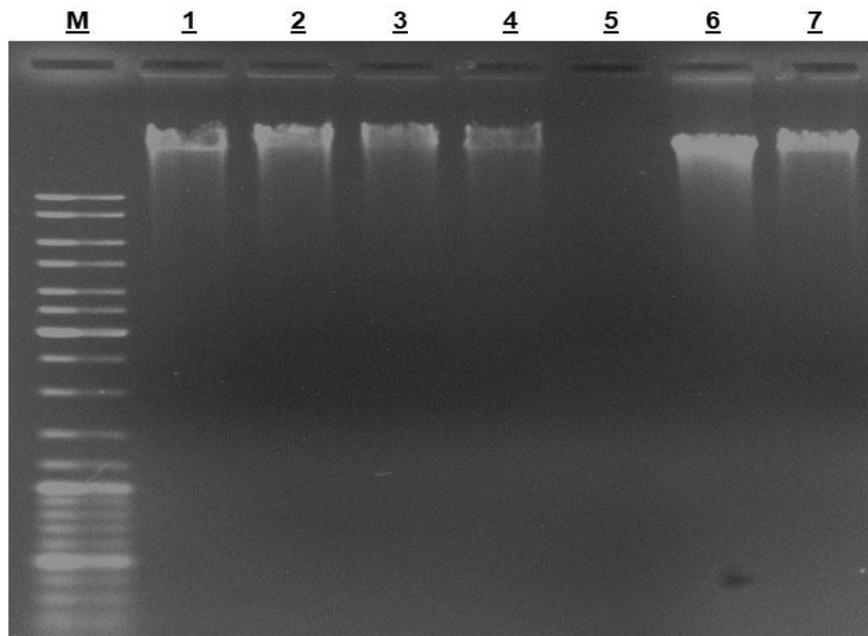


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de DNA del gen humano en comparación con extractos hidroalcohólicos de tallos de muña. Funciona a 40 V x 150 minutos. Carril (M), marcador de volumen molecular de 1 kb; carriles (1-4), extracto hidroalcohólico de muña a concentra en cantidades de 200 – 300 - 400 y 500 mg/mL; carril (5), extracto hidroalcohólico puro de muña de control (500 mg/ mL); carril (6), control de DNA genómico humano; carril (7), DNA genómico humano + extracto hidroalcohólico puro (500 mg/mL) + proteinasa K.

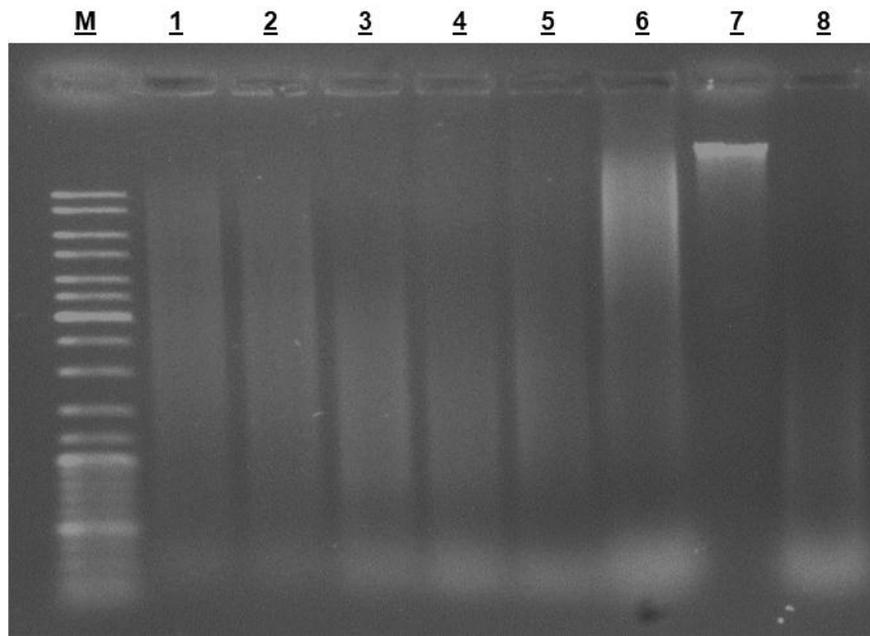


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de DNA del gen humano contra jugo de hoja y tallo de muña. Correr a 40 V x 150 min Carril (M), marcador de dimensión de 1 kb, carriles (1-5), jugo de muña al 5 – 10 – 25 - 50 y 100% de concentración, carril (6), jugo de muña puro de control (100 %); carril (7), control de DNA genómico humano; carril (8), ADN genómico humano + jugo puro (100%) + proteinasa K.

Tabla 13. Valor de cuatro ensayos de degradación *in vitro* de DNA genómico humano en extractos hidroalcohólicos de hojas de *Minthostachys mollis* G. "muña" en cantidades de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, expresados en fragmentos, 400 con 500 mg/ ml, 37°C por 1 hora. (CIBMB-UNSCH). Ayacucho 2017.

Condiciones de la incubación		<i>Minthostachys mollis</i> Griseb "muña"								
		Extracto hidroalcohólico de hojas								
		Concentración en mg/mL.								
		5	10	25	50	100	200	300	400	500
Temperatura	Tiempo	0	0	1	1	2	3	3	3	4
37°C	1h	0	0	1	1	2	3	3	3	4
		0	0	1	1	2	3	3	3	4
		0	0	1	1	2	3	3	3	4

Tabla 14. Valores de cuatro ensayos de degradación *in vitro* de ADN genómico humano en extractos hidroalcohólicos de tallos de *Minthostachys mollis* G. "muña" en cantidades de 5 – 10 – 25 – 50 – 100 – 200 – 300 - 400 y 500 mg/mL, una hora de incubación a 37°C. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2017.

Condiciones de la incubación		<i>Minthostachys mollis</i> Griseb "muña"								
		Extracto hidroalcohólico de tallos								
		Concentración en mg/mL.								
		5	10	25	50	100	200	300	400	500
Temperatura 37 °C	Tiempo	0	0	0	0	1	2	3	3	4
	1h	0	0	0	0	1	2	3	3	4
		0	0	0	0	1	2	3	3	4
		0	0	0	0	1	2	3	3	4

Tabla 15. Valores para cuatro ensayos de degradación *in vitro* de ADN genómico humano, expresado como fragmentos, en savia de hojas y tallos de *Minthostachys mollis* G. "muña" a concentraciones de 5 – 10 – 25 – 50 - 100%, incubados a 37°C mantener por 1h. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2017.

Condiciones de la incubación		<i>Minthostachys mollis</i> Griseb "muña"				
		Zummo de hojas y tallos frescos				
		Concentración en %				
		5	10	25	50	100
Temperatura 37°C	Tiempo	3	4	4	4	4
	1h	4	4	4	4	4
		4	4	4	4	4
		3	4	4	4	4

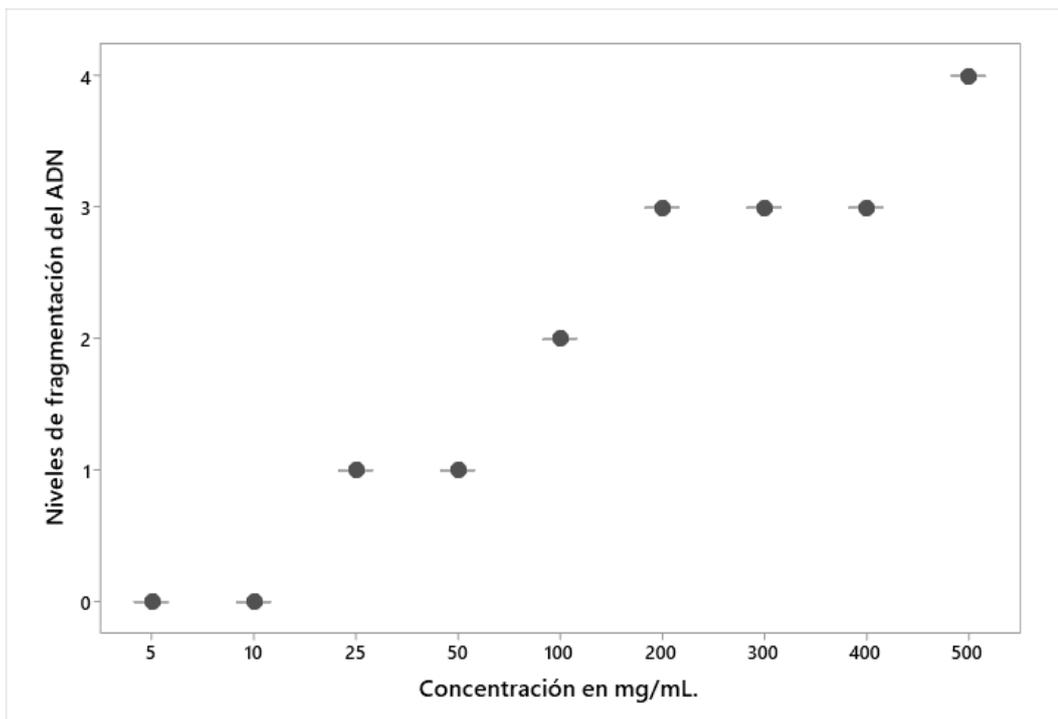


Figura 10. Degradación *in vitro* del ADN genómico humano (expresado como fragmentación) en extractos hidroalcohólicos de hojas de *Minthostachys mollis* G. "muña" en cantidades de 5 – 10 – 25 – 50 – 100 – 200 – 300 - 400 y 500 mg/mL, incubar a 37°C por 1h. Prueba de Kruskal-Wallis (H=32,86, GL=8, P=0.000); CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2017.

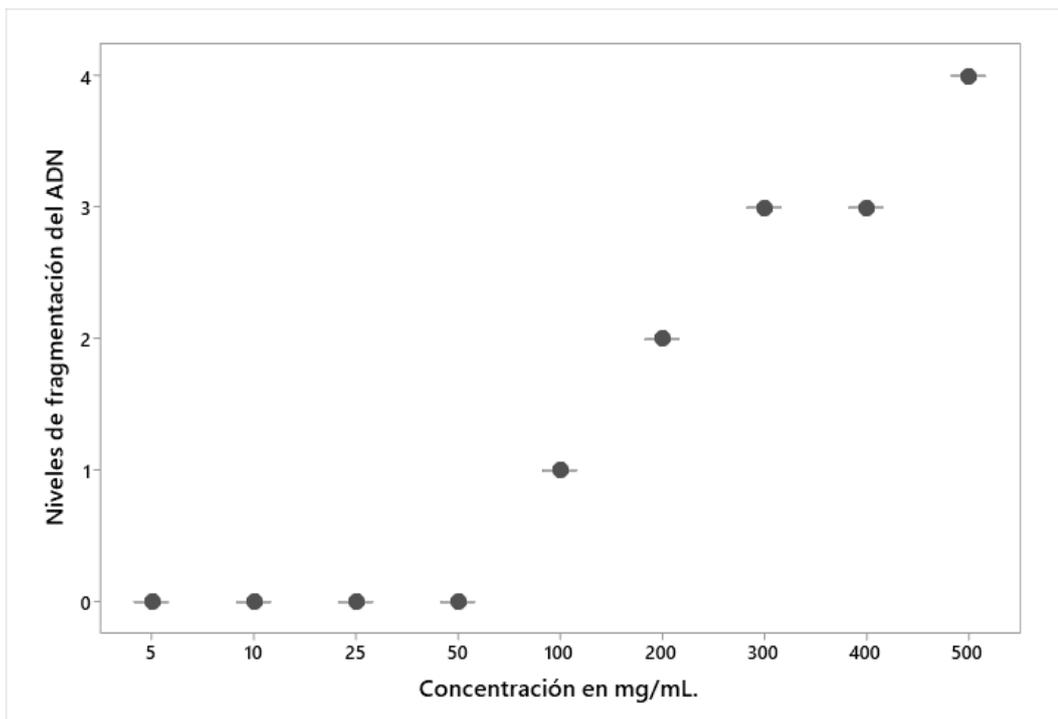


Figura 11. Grado de degradación *in vitro* del DNA del gen humano, expresado en su fragmentación, frente al extracto hidroalcohólico de tallos de *Minthostachys mollis* G. “muña” en cantidades de 5 – 10 – 25 – 50 – 100 – 200 – 300 - 400 y 500 mg/mL, incubados a 37°C por 1h. Prueba de Kruskal-Wallis (H=31,42, GL=8, P=0.000); CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2017.

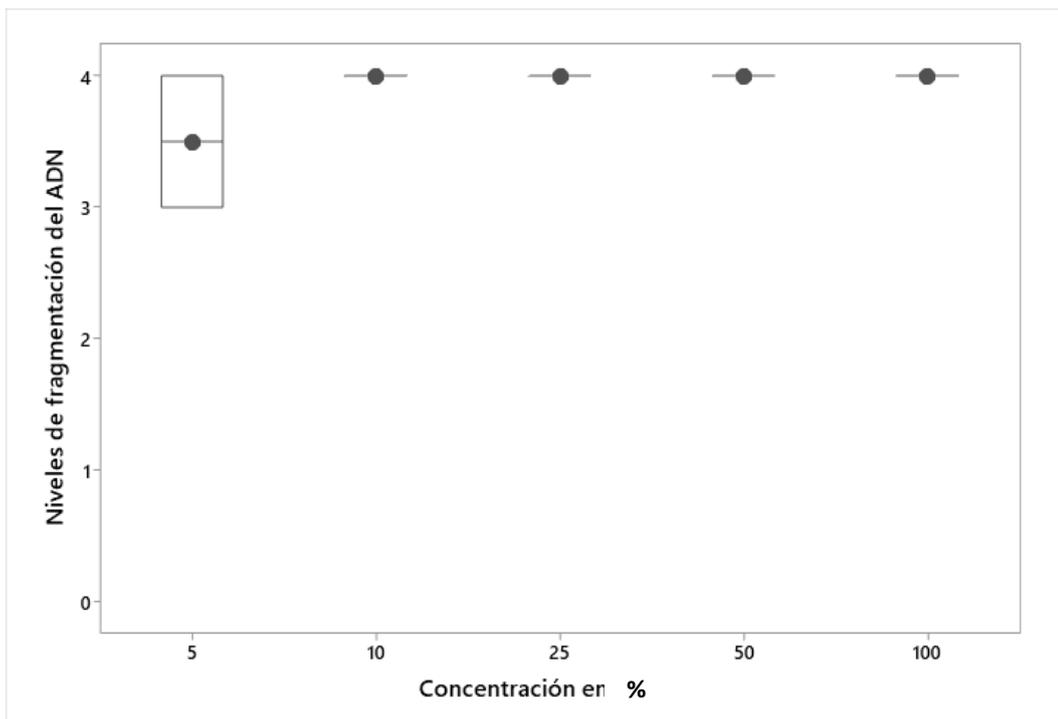


Figura 12. En savia de hojas y tallos de *Minthostachys mollis* G. "muña" incubada a 37°C por 5, 10, 25, 50, 100% en concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100%, en fragmentos Grado de in vitro degradación del DNA del gen humano indicado durante 1 hora. Prueba de Kruskal-Wallis (H=2,29, GL=4, P=0.683); CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2017.

V. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos permiten descifrar los resultados, obteniendo como objetivo demostrar el efecto degradativo “*in vitro*” del DNA genómico humano por acción de los extractos hidroalcohólico y el zumo de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”.

En principio se realizó el tamizaje fitoquímico con la finalidad de identificar los metabolitos secundarios existentes en extractos hidroalcohólico de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”, que se exponen en la tabla 11 resaltando entre ellos, en concentraciones abundantes (++++) compuestos fenólicos en hojas y tallos, flavonoides y catequinas solo en hojas; en poca concentración (++) cumarinas y/o lactonas, triterpenos y/o esteroides en hojas y tallos, mientras que los alcaloides se presentan más en hojas que en tallos.

De igual manera, la tabla 12, muestra el producto del tamizaje fitoquímico del zumo de hojas y tallos de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”, prevaleciendo entre ellos en concentraciones abundantes (++++) compuestos fenólicos; alcaloides, flavonoide y triterpenos y/o esteroides en regular concentración (+++); catequinas y saponinas en poca concentración (++); trazas (+) de cardenólidos; ausencia (-) de azúcares reductores y cumarinas y/o lactonas.

Estos resultados revelan que el extracto hidroalcohólico de las hojas y del jugo de “muña” muestran similar presencia y concentraciones de metabolitos secundarios, destacando los compuestos fenólicos, flavonoides, triterpenos y/o esteroides y alcaloides; mientras que, saponinas y cardenólidos solo en el zumo. Por tanto, estos componentes, estarían relacionados directamente en las actividades o propiedades medicinales.

Estudios de otros autores que confirman la presencia de estos metabolitos secundarios en plantas medicinales, así como estudios de Bravo et al. (2004), identificaron flavonoides y su actividad antibacteriana contra cepas de

Escherichia coli y *Staphylococcus aureus*. marca et al. (2018) informaron que se encontraron concentraciones considerables de fenoles y/o taninos en el extracto etanólico de bulbos de 'ajo'; en jugo: niveles bastante altos de fenoles y/o taninos y saponinas, mientras que mostraron pequeñas cantidades de emodinolida. Asimismo, Ayala (2013) reportó la presencia de estos metabolitos secundarios, grandes cantidades de fenoles y/o taninos-alcaloides-flavonoides-quinonas, y cantidades convencionales de lactonas y/o cumarinas encontradas en "retama"; encontradas ricas en flavonoides-alcaloides. -quinona-fenoles y/o taninos y lactonas y/o cumarinas, alcaloides de eucalipto-flavonoides-fenoles y/o taninos también se encontraron en tala a niveles normales de quinonas y lactonas y/o cumarinas.

García et al. (2018) reportaron que los metabolitos secundarios identificados en el jugo de flor de frambuesa (L) Lager "floripondio" fueron: alcaloides, saponinas, azúcares reductores, gran cantidad de aminas, pequeñas cantidades de lactonas y/o odorantes Legumbres, flavonoides, taninos y fenoles; en extractos hidroalcohólicos de hojas se identificaron alcaloides, flavonoides, catequinas, taninos y fenoles, así como abundantes aminas; cantidades moderadas de azúcares reductores.

La figura 4, corresponde a la electroforesis en gel de agarosa al 1%, mostrando la presencia del DNA del gen humano obtenidos de muestra de sangre, los siete carriles revelan la presencia de abundante DNA por su refringencia, una sola banda, sin fragmentación ni barrido, es decir íntegro, que constituyen condiciones fundamentales del DNA para los ensayos de degradación *in vitro*, además de mostrar el cuidado realizado en el proceso de extracción.

La figura 5 muestra los resultados del análisis de degradación de ADN *in vitro* de genes humanos (1500 ng/ μ L) en extractos hidroalcohólicos de hojas de menta piperita a concentraciones de 100, 50, 25, 10 y 5 mg/mL. , incubar a 37°C durante 1 hora. El carril M es un marcador de tamaño molecular bajo la marca NEW ENGLAND BioLabs, 1 kb Plus DNA Ladder; los carriles 1 a 5 son el tratamiento de ADN genético humano con las cantidades correspondientes de extracto hidroalcohólico; se estima que en los carriles 1, 2 y 3, el tamaño de las bandas de ADN se reduce en comparación con las bandas en el carril 7, que es el ADN genómico humano "control" sin tratamiento de extracto; las bandas en el carril 1 muestran el número de bandas de ADN en relación con el "control" "significativamente reducido, Degradación por extracto de 100 mg/mL; el carril 6

se refiere a un "control" o "blanco", es decir, el extracto hidroalcohólico de "muña" sale a 100 mg/mL, donde no se ve la fuente de "muña" la presencia de ADN . Las bandas en la calle 8 corresponden a corridas electroforéticas de ADN genómico humano (1.500 ng/μL) tratado con extracto hidroalcohólico de hojas de "muña" (100 mg/mL) más enzima proteinasa K, lo que indica que la intensidad de la tinción es similar a "Tanto las bandas de ADN como las bandas de la calle 1 se redujeron con respecto al control"; reiterando que la degradación del ADN se debió a la acción de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico, más que a las nucleasas de la muestra de "muña", ya que se digieren por proteinasa K, que se incubaba a 37°C durante una hora.

La Figura 6 muestra los resultados de un ensayo de degradación in vitro de ADN genómico humano (1500 ng/μL) para 200 – 300 – 400 y 500 mg/mL de un extracto hidroalcohólico de hojas de menta. Baño María a 37°C durante 1h. La calle M se refiere al marcador de tamaño molecular de 1 kb, las calles 1 a 4 son los resultados del tratamiento con extractos hidroalcohólicos. Los carriles 1, 2 y 3 tratados con 200, 300 y 400 mg/mL, respectivamente, muestran bandas de ADN genómico humano que están significativamente reducidas en comparación con el "control" en el carril 6; Degradación por acción del extracto /mL; Carril 5 , en una corrida "control", un extracto hidroalcohólico de "muña" de 500 mg/mL, en el cual no se observó presencia de ADN de la planta en estudio; Carril 6, es ADN genómico humano sin tratar, que se utilizó como "control" para comparar con el ADN de cada tratamiento de varios extractos hidroalcohólicos. El carril 7 involucra una carrera electroforética de ADN de un gen humano (1500 ng/μL) tratado con 500 mg/mL de un extracto hidroalcohólico de hojas de "muña" y la enzima proteinasa K, indicando la intensidad del color en comparación con el "control". 2, las bandas de ADN se han reducido en los carriles 3 o 4, lo que confirma que la degradación del ADN se debe a los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico y no a las nucleasas de *Minthostachys mollis* Griseb "muña" debido a la proteinasa K. Estas enzimas se encuentran digeridas a continuación. Incubar a 37°C durante una hora.

La Figura 7 muestra los resultados del análisis de degradación in vitro del ADN genómico humano (1500 ng/μL) de extractos hidroalcohólicos de tallos de *Minthostachys mollis* Griseb "muña" a 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, incubados a 37°C por 1 hora El carril M se refiere al marcador de tamaño molecular de la marca NEW ENGLAND BioLabs, 1 kb Plus DNA Ladder; los carriles 1 a 5 son el

tratamiento del ADN genético humano con las cantidades correspondientes de extracto hidroalcohólico; calculado, en los carriles 1, 2, 3 e In 4, no hay reducción en el tamaño de la banda de ADN en comparación con la banda en el carril 7, que es ADN genómico humano "control" sin tratar; la banda en el carril 5 muestra un ligero aumento en la concentración de ADN en comparación con el "control" disminuido debido a su degradación por acción del extracto de 100 mg/mL, la calle 6 es el extracto hidroalcohólico "testigo" del tallo de la muña a 100 mg/mL. La banda en el carril 8 es del extracto hidroalcohólico del tallo de "muña" (100 mg/mL) más el tratamiento con enzima proteinasa K del ADN genómico humano (1500 ng/ μ L), lo que representa la intensidad del tono del ADN en bandas en comparación con el "control" Leve disminución en comparación con; degradación confirmada del ADN debido a la acción de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico en lugar de nucleasas de la muestra de "muña".

La Figura 8 muestra los resultados de un ensayo de degradación in vitro de ADN genómico humano (1500 ng/ μ L) sobre extractos hidroalcohólicos de tallos de menta piperita a 200 - 300 - 400 y 500 mg/mL, incubar en baño maría a 37°C durante 1 hora. El carril M se refiere al marcador de volumen molecular de 1 kb, los carriles 1 a 4 son los resultados del tratamiento con extractos hidroalcohólicos. Los carriles 1, 2 y 3 tratados con 200, 300 y 400 mg/mL, respectivamente, muestran bandas de ADN genómico humano que están significativamente reducidas en comparación con el "control" en el carril 6; Degradación por acción del extracto /mL; carril 5, extracto hidroalcohólico "control" que involucra "muña" corrido a 500 mg/mL, No se observó la presencia de ADN de las plantas estudiadas, la calle 6 es el ADN del gen humano no tratado, que es un "control" para comparar con cada ADN tratado con cantidades variables de extracto hidroalcohólico. La pista 7 corresponde a una corrida de electroforesis de ADN de un gen humano (1500 ng/ μ L) tratado con 500 mg/mL de extracto hidroalcohólico de tallo de 'muña' y la enzima proteinasa K, mostrando el tamaño de las bandas como 'control', El ADN se redujo, la degradación del ADN aprobada se debió a la acción de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico más que a la acción de nucleasas posiblemente de la planta en estudio.

Los fotorregistros electroforéticos de la Figura 9 representan el ensayo de degradación in vitro del ADN genómico humano en el jugo de hojas y tallos de *Mintthostachys mollis* Griseb "muña" en cantidades de 5 - 10 - 25 - 50 y 100%,

incubados a 37°C en 1 hora. El carril M es un marcador de tamaño molecular bajo la marca NEW ENGLAND BioLabs, 1 kb Plus DNA Ladder; los carriles 1 a 5 son carriles de ADN genómico humano tratado con las cantidades correspondientes de jugo, y se observó que en todos estos carriles, debido a la degradación total que tienen, no mostraron bandas claras de ADN, pero barrieron el efecto del jugo en comparación con la banda de ADN no tratada en el carril 7 como un "control" de 5, 10, 25, 50 y 100%; el carril 6 pertenecía a Corrida "Control", jugo de "muña" (100%), en la que también se observaron escaneos de ADN de "muña" triturada en un mortero. El carril 8 corresponde a una corrida de electroforesis de ADN genómico humano (1,500 ng/μL) tratado con jugo de muña 100% más enzima proteinasa K, lo que indica que la fragmentación del ADN es completa, como en los carriles 1 a 5, compárelos con el "control" ; Reiterar que la degradación del ADN se debe a la acción de los metabolitos secundarios presentes en el jugo y no a las nucleasas en las muestras de muña.

Los resultados presentados en las Figuras 5 y 6, también con un grado de clasificación visual de degradación del ADN in vitro como referencia, se toman como un número asignado como grado de fragmentación según su nivel de fragmentación de la Ficha Técnica 9. El ADN de genes humanos, como resultado de pruebas de degradación in vitro, según la cantidad de extracto hidroalcohólico de hojas de muña, se observa en la Tabla 13. Especifica 5 y 10 mg/mL, con menor fragmentación al 5% de ADN (valor = 0); 25 a 50 mg/mL, entre 5 y 20% (valor = 1); 100 mg/mL mL, entre 20 y 40% (valor = 2); use 200, 300 y 400 mg/mL, entre 40 y 95% (valor = 3) y use 500 mg/mL, fragmento mayor al 95% ADN de genes humanos procesados (valor = 4). Asimismo, los resultados de las Figuras 7 y 8 para el tratamiento con extracto hidroalcohólico de tallo de muña se dan valores numéricos en la Tabla 14, nótese que con 5, 10, 25 y 50 mg/mL la fragmentación fue menor al 5% del ADN (valor = 0); 100 mg/mL, entre 5% y 20% (valor = 1); 200 mg/mL, entre 20 y 40% (valor = 2); usando 300 y 400 mg/mL, 40 a 95 % (valor = 3) y usando 500 mg/mL, fragmentó más del 95% del ADN del gen humano tratado (valor = 4). Nuevamente, los resultados del ensayo de degradación in vitro, visualizados en la Figura 9, fueron tomados como valores numéricos de los valores de fragmentación del ADN para genes humanos debido a la acción del jugo de la hoja y el tallo de la muña. diferente densidad. , consulte la Tabla 15; indica que la fragmentación del ADN

del gen humano tratado fue superior al 95 % (valor = 4) en todos los jugos al 5, 10, 25, 50 y 100 %.

Tomar los valores encargados en la Tabla 13 y realizar un estudio estadístico mediante la prueba de Kruskal-Wallis para comparar el grado de fragmentación del ADN de genes humanos en los tratamientos, expresado en (%) con la cantidad de extracto hidroalcohólico de hoja *Minthostachys mollis* Griseb "muña" en (mg/mL), como se muestra en la Figura 10. El porcentaje de fragmentación del ADN genómico humano, que revela el grado de degradación, se formuló con la hipótesis nula (H_0) de que las medianas son iguales y la hipótesis alternativa (H_1) de que al menos una mediana difiere. Los resultados muestran que para $H = 32.86$ y $GL = 8$, P -valor = 0.000, por lo tanto, se rechazó H_0 y se aceptó H_1 porque P fue menor a 0.05. Así, el grado de fragmentación del ADN del gen humano tratado se debe a la cantidad de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Minthostachys mollis* Griseb "muña". Asimismo, los valores de la Tabla 14 para el tratamiento con el extracto hidroalcohólico de tallos de muña se muestran en la Figura 11, y la prueba de Kruskal-Wallis reportó un valor de $P = 0,000$ para $H = 31,42$ y $GL = 8$, por lo tanto, Se rechazó H_0 y se aceptó H_1 porque P era inferior a 0,05. Así, el grado de fragmentación del ADN genómico humano procesado depende de la cantidad de extracto hidroalcohólico del tallo de *Minthostachys mollis* Griseb "muña".

Nuevamente, teniendo en cuenta los valores de la Tabla 15, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para comparar el grado de fragmentación del ADN genómico humano entre tratamientos, expresado en (%) con la cantidad extraída de hojas y tallos de menta. "muña" se expresa en porcentaje (%), como se muestra en la Figura 12. Los resultados mostraron que para $H=2.29$ y $GL=4$, $P=0.683$, por lo que se aceptó H_0 y se rechazó H_1 por ser P mayor a 0.05. Así, el grado de fragmentación del ADN humano procesado no depende de la cantidad de savia, hojas y tallos de *Minthostachys mollis* Griseb "muña", es decir, toda la savia de "muña" en concentraciones que van del 5% al 100% tienen efecto en el ADN genómico humano. Todos tienen degradación in vitro.

Sin embargo, los resultados que se han obtenido fortalecen la base para ensayos de degradación de ADN genómico in vitro, con el enfoque aplicado en este trabajo. En este sentido, nuestros resultados son consistentes con los obtenidos por Marca et al.¹⁷ quienes evaluaron la genotoxicidad in vitro del extracto etanólico y jugo de *Allium sativum* L. "ajo". De manera correspondiente,

los extractos etanólicos de bulbos de "ajo" a 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL no mostraron efecto genotóxico sobre el ADN genómico estafilocócico; por otro lado, 5%, 10%, 50% y los extractos de bulbo 100% "ajo" sí mostraron un fuerte efecto genotóxico, fragmentando el 100% del ADN, con la prueba de Kruskal-Wallis reportando $H=0.53$; $GL=3$ y $p=0.912$. Llegaron a la conclusión de que la savia del bulbo de "ajo" *Allium sativum* L. mostró un fuerte efecto genotóxico en el ADN del gen *Staphylococcus*.

Asimismo, Ayala (2013). Los efectos genotóxicos in vitro de plantas medicinales antibacterianas se determinaron utilizando como muestras las vainas de *Spartium junceum* L. "retama", *Caesalpinia spinosa* Kuntze "tara" y las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto", las cuales fueron expuestas al ADN de genes con *Staphylococcus aureus* dorado, se establecieron estimaciones de daño genotóxico in vitro mediante el "método de Tomasevich". Los extractos hidroalcohólicos mostraron actividad genotóxica significativa contra el ADN genómico de *Staphylococcus aureus* y fueron extractos de "tara" y "eucalipto" a 50 mg/mL y 100 mg/mL con respecto a "retama". Finalmente, el daño genotóxico fue escuetamente dependiente de la cantidad de extracto hidroalcohólico; pero no del tiempo de incubación, excepto para el extracto de "retama" que se apegó a este tiempo.

Un estudio diferente como el de Marca et al., (2018) se realizó en plantas terapéuticas de otras familias y especies, afirmando que tanto los efectos antibacterianos como los efectos genotóxicos se deben principalmente a la presencia de metabolitos secundarios flavonoides, alcaloides y taninos.

VI. CONCLUSIONES

1. El DNA genómico humano muestra efecto de degradado *in vitro* frente al extracto hidroalcohólico y el zumo de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”.
2. Los metabolitos secundarios presentes en los extractos hidroalcohólicos de *Minthostachys mollis* Griseb “muña” fueron: compuestos fenólicos (hojas y tallos), flavonoides y catequinas (hojas) en concentraciones abundantes (++++); cumarinas y/o lactonas y triterpenos y/o esteroides (hojas y tallos) en poca concentración (++); alcaloides poca concentración (++) en hojas y trazas (+) en tallos. Mientras que, en el zumo se identificaron compuestos fenólicos en concentraciones abundantes (++++); alcaloides, flavonoide y triterpenos y/o esteroides en regular concentración (+++); catequinas y saponinas en poca concentración (++) y cardenólidos en trazas (+).
3. El efecto degradativo *in vitro* del DNA del gen humano por efecto del zumo hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* Griseb “muña” a concentraciones de 25 y 50 mg/mL el efecto fue bajo; con 100 mg/mL moderado; con 200, 300 y 400 mg/mL alto y con 500 mg/mL fue muy alto; mientras que, con el extracto hidroalcohólico de tallos, con 100 mg/mL fue bajo; con 200 moderado; con 300 y 400 mg/mL alto y con 500 mg/mL fue muy alto. Respecto al zumo de “muña” todas las concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 % manifestaron muy alto efecto degradativo del DNA genómico humano.

VII. RECOMENDACIONES

- Impulsar trabajos de investigación en plantas medicinales, impulsando nuevos ensayos para confirmar el efecto degradativo sobre el DNA.
- Evaluar los efectos degradativos de DNA comparando con compuestos químicos de conocida actividad genotóxica.
- Aumentar las investigaciones de interacciones entre DNA procariota, eucariota o plásmido y metabolitos secundarios de plantas para evaluar los efectos genotóxicos a través de ensayos in vitro e in vivo en la literatura.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adrián, Y. (2017). *Zumo*. Concepto de definición de zumo.
<https://conceptodefinicion.de/zumo/>
- Ananthi, R., Chandra, N., Santhiya, S. T., & Ramesh, A. (2010). Genotoxic and antigenotoxic effects of *Hemidesmus indicus* R. Br. root extract in cultured lymphocytes. *Journal of ethnopharmacology*, 127(2), 558–560.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.10.034>.
- Arcila-Lozano, Cynthia Cristina, Loarca-Piña, Guadalupe, Lecona-Urbe, Salvador, & González de Mejía, Elvira. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 100-111.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000100015&lng=es&tlng=es.
- Aucasime L. (2013). Herbario Huamangensis. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
- Ayala, E., Miranda, T. y Aguilar, E. (2013). *Efecto genotóxico in vitro de plantas medicinales antibacterianas Spartium junceum L. “retama”, Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze “tara” y Eucaliptus globulus Labill “eucalipto”*. [Tesis pregrado, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga]. Archivo digital.
<http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/1153>
- Azaña, I. (2010). *Efectividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de Minthostachys mollis griseb (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico*. [Tesis pregrado, Universidad Nacional Mayor De San Marcos]. Archivo digital.
<https://hdl.handle.net/20.500.12672/2183>
- Benites, J., Guerrero-Castilla, A., Salas, F., Martínez, J. L., Jara-Aguilar, R., Venegas-Casanova, E. A., Suarez-Rebaza, L., Guerrero-Hurtado, J., & Calderón, P. B. (2018). Composición química, actividades citotóxicas y antioxidantes *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb peruano. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 17(6), 566-574. Archivo digital. <https://blacpma.ms-editions.cl/index.php/blacpma/article/view/146>
- Berg, J., Tymoczko, J., & Lubert, S. (2007). *Bioquímica*. 6ta Edición . REVERTÉ.

- Bravo, O., Hernández, E., Tereschuck, L., Romero, A. y Abdala, R.(2004). *Minthostachys mollis* “muña” y *Lepechiniameyenni* Epling. Actividad antimicrobiana de sus extractos, determinaciones preliminares de sus flavonoides mayoritarios. *Revista del CIZAS*.
- Cano, C., Conilla, P., Roque, M. y Ruiz, J. (2008). Actividad antimicótica *in vitro* y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (MUÑA). *Rev Peru Exp Salud Publica*, 25(3), 298-301.
- Carhuapoma, M., López, S., y Roque, M.(2009). *ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE Minthostachys mollis* Griseb “RUYAQ MUÑA [Tesis de posgrado, Universidad Nacional Mayor De San Marcos]. Archivo digital. <https://doi.org/10.15381/ci.v12i2.3404>
- Carvajal, G., y Thilly, W. (1988). Actividad mutagénica de la “muña” *Minthostachys mollis*. *Boletín de Lima* N° 58.
- Castaño, J. B. (1996). Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría Purificación de ácidos nucleicos. *Asociación de pediatría española*, 541-546.
- Castaño, L. (1996). Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría Purificación de ácidos nucleicos. *Revista de la Asociación de pediatría española*, 541-546.
- Christopher P. Austin, M. (Agosto de 2015). *National Institutes of Health (NIH)* .
- Fairbairn, D., & O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res Genet Toxicol*. 1995;339(1):37-59.
- Gallou, A., Suaste, A., Serna, M y Andrade, G.(2015). *Manual de Practicas del Laboratorio de Biología Molecular*. Senasica.
- García, V., Miranda, T., Moreno, M., Condor, R. y Arenas, J. (2018). *IN VITRO* Genotoxicity of the flower juice and hydroalcoholic extract of leaves of *Brugmansia arborea* (L) Lager “floripondio” In front the human genomic DNA [Congreso]. *5to Congreso Internacional sobre Farmacología de Productos Naturales*. Cuba.
- Gibaja, S. (1960). *Investigaciones químicas de la muña Minthostachys mollis*. [Tesis pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
- Inga, A. y Guerra, B.(2000). *Efecto del aceite esencial de Minthostachys mollis (muña) contra algunas bacterias y hongos de interés en la salud* [tesis pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]

- Kaul, S., Gupta, S., Ahmed, M., y Dhar, MK. (2012). Endophytic fungi From medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochem Rev*, 11(1), 487-505.
- Larrea, M., Tirado, N., y Ascarrunz, M. (2010). Daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores. *Revista del Municipio de Luribay*, 18(2), 31-43.
- Lázaro, D., López, Y., Vázquez, A., González, J., y Sánchez, L. (2010). Genotoxic assessment of aqueous extract of *rhizophora mangle* L. (mangle rojo) by spermatozoa head assay. *Rev Cuba Plantas Med*; 15(1), 18-26.
- Lock, O.(1994) *Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales* (2nd ed.). Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Maquera, D., Tello, M., Romero, M., y Cotacallapa, D. (2009). Componentes químicos de los aceites esenciales de muña *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb en Huánuco. *Revista de Investigación Valdizana*, 3(2), 100-106. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=586061880008>
- Marca, P., Miranda, T., Moreno, M., Córdor, R. y Arenas, J. (2018). Preliminary evaluation of the *in vitro* genotoxicity of the ethanolic extract and *allium sativum* l. "garlic" juice against the dna of *staphylococcus* sp. DNA [Congreso]. *5to Congreso Internacional sobre Farmacología de Productos Naturales*. Cuba.
- Martinez, A. (2007). *El laboratorio de biología molecular*. Editorial Universitaria de la Univ. Nacional de Misiones.
- McPherson. (2001). *A physical map of the human genome*. Nature
- Miranda, T. (2017). "Método Tomasevich": para determinar el Efecto Genotóxico *in vitro* de plantas medicinales y/o productos fitoterapéuticos. 2^{do} Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. Clave: TXG808. Durango: México.
- Monroy, E., Fernández, C., y Díaz, R., (2014). Evaluación de cuatro métodos de extracción del DNA de *Histoplasma capsulatum* y su uso en reacciones de PCR. *Revista VacciMonitor*, 23(2):49-56.
- Montes, E. (2013). *Actividad antimicótica del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico de Satureja brevicalyx Epl. "wayra muña" sobre una*

- cepa de Candida albicans*. [Tesis pregrado Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga]. Archivo digital.
<http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/2483>
- Mora, F. (2009). Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of the essential oil *Minthostachys mollis* from Venezuela Andes. *Natural Product Communications*,4(7), 997-1000.
- Muhammad, H., Gomes, M., Poa, K., Sulaiman, S.(2011). Evaluation of the genotoxicity of Orthosiphon stamineus aqueous extract. *J Ethnopharmacol*, 133(2), 647-53.
- Munari, C., Alves, J., Bastos, J., y Tavaresa, D. (2010). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of Baccharis dracunculifolia extract on V79 cells by the comet assay. *Revista J Appl Toxicol.*, 30(1):22-8.
- Regner, G., Giancesini, J., Von, R., Silveira, F., Semedo, J., y Ferraz, A. (2011) Toxicological evaluation of Pterocaulon polystachyum extract: A medicinal plant with antifungal activity. *Environ Toxicol Pharmacol* . 31(1):242-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2010.11.003>
- Salazar, A., Sandoval, A., & Armendáris, J. (2013). *Biología Molecular Fundamentos y aplicaciones en las Ciencias de la Salud*.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C. V.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia 2000.
- Speit, G., Vásquez, M., Hartmann, A.(2009). The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. *Mutat Res - Rev Mutat Res*, 681(1):3-12.
- Sponchiado, G., Dadalt, C., Silva, B.(2016). Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *J Ethnopharmacol*, 178(1),289-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.026>
- Tercer Encuentro de la Agroindustria: Rural Tarapoto Marzo De 1997*. (s/f). Intermediate Technology Development Group.
- Viveros, P. (1923). *EXTRACTOS MEDICINALES DE PLANTAS*. BELLAVISTA.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de clasificación taxonómica de *Minthostachys mollis* Griseb "muña".



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

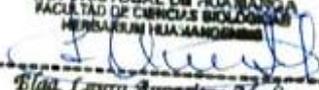
C E R T I F I C A

Que, la Bach. en Biología, **Srta. Emavel, MARTÍNEZ VEGA**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.
Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	LAMIALES
FAMILIA	:	LAMIACEAE
GENERO	:	Minthostachys
ESPECIE	:	<i>Minthostachys mollis</i> Griseb
N.V.	:	"muña"

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

Ayacucho, 2 de Enero del 2017

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

Elga Laura Aucante Medina
JEFE

Anexo 2. Recolección de muestra y secado a temperatura ambiente de las hojas y tallos de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”.



Recolección de la muestra



Secado de la muestra

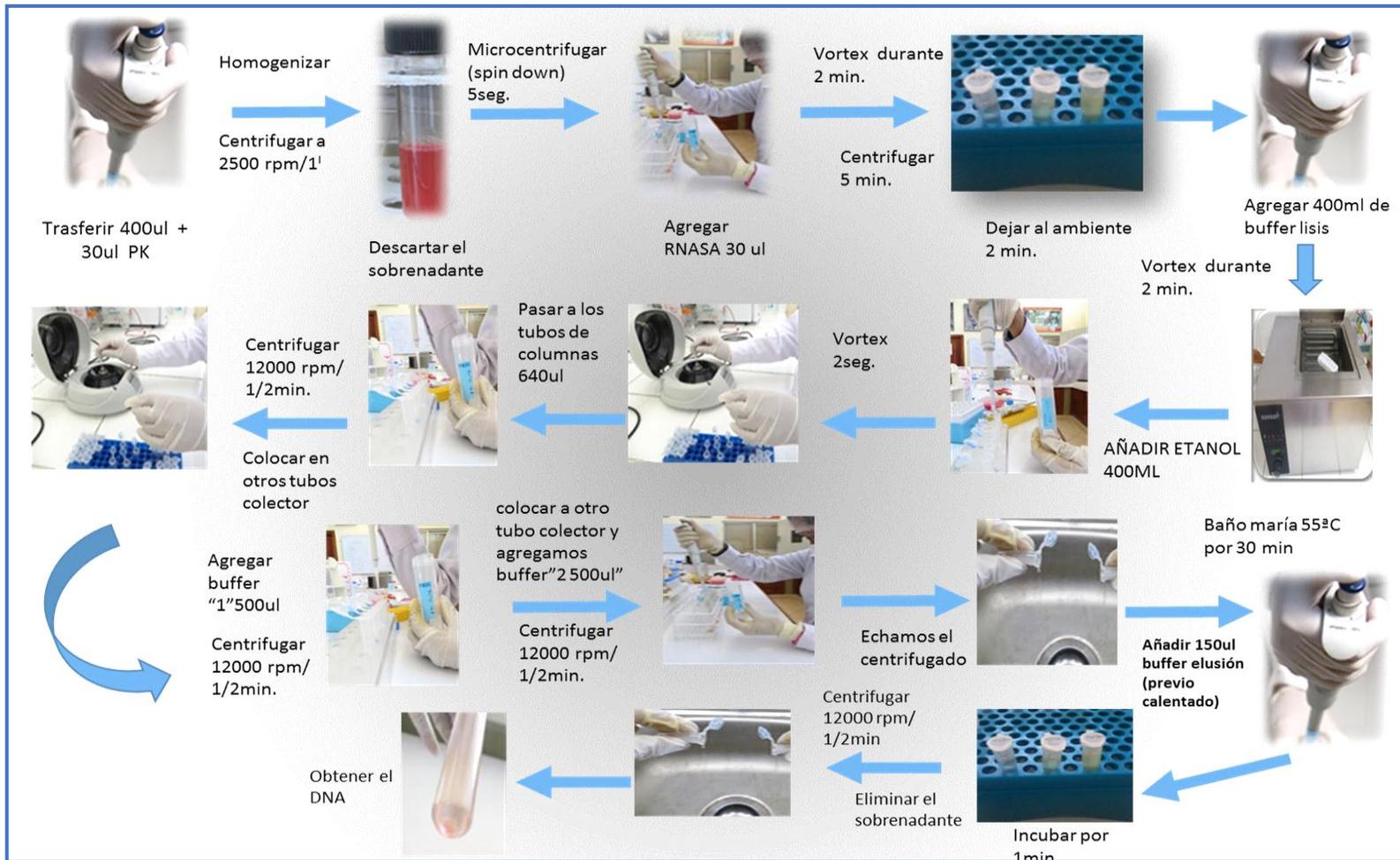
Anexo 3. Obtención de extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”.



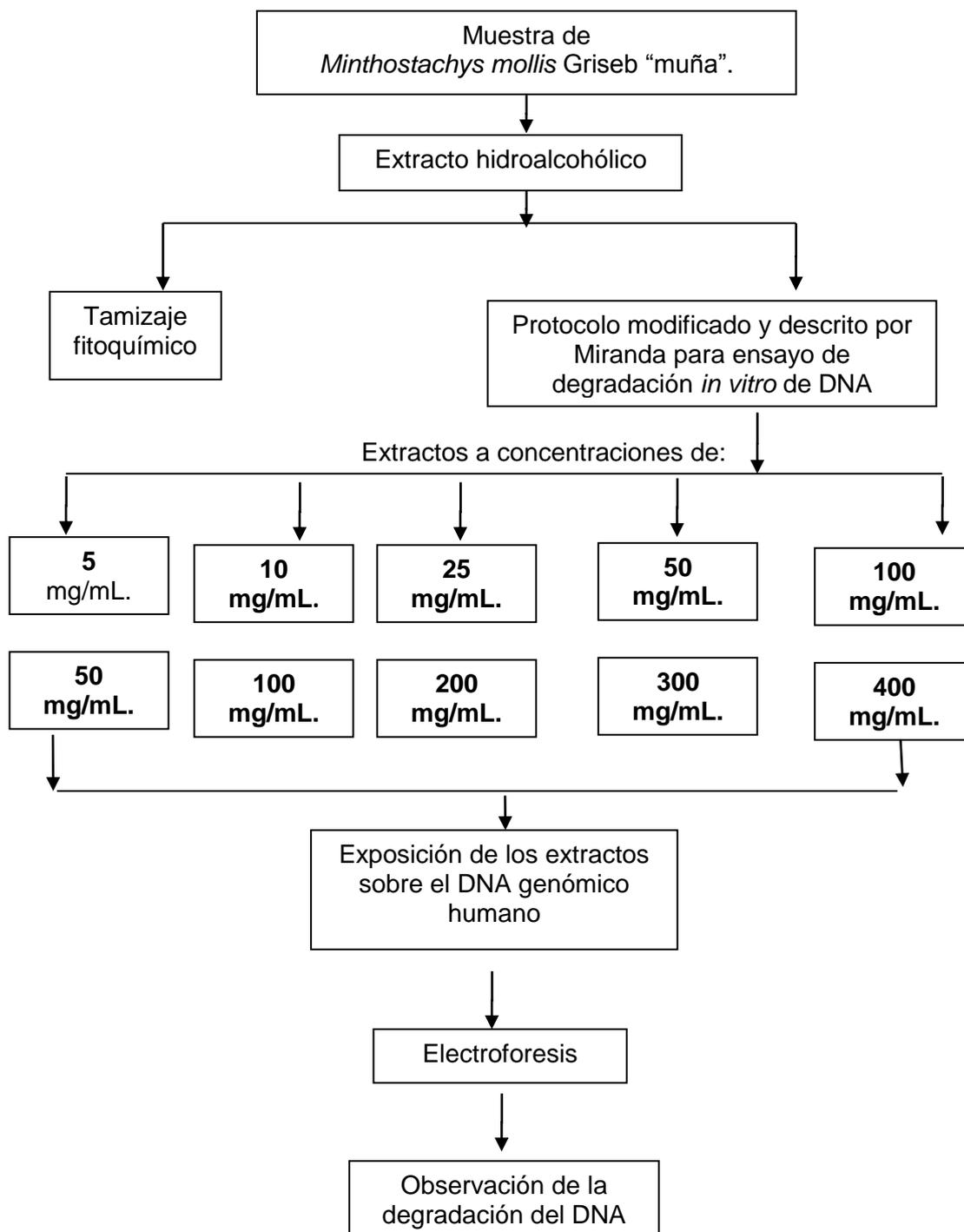
Anexo 4. Obtención del zumo de *Minthostachys mollis* G. "muña". Ayacucho 2018.



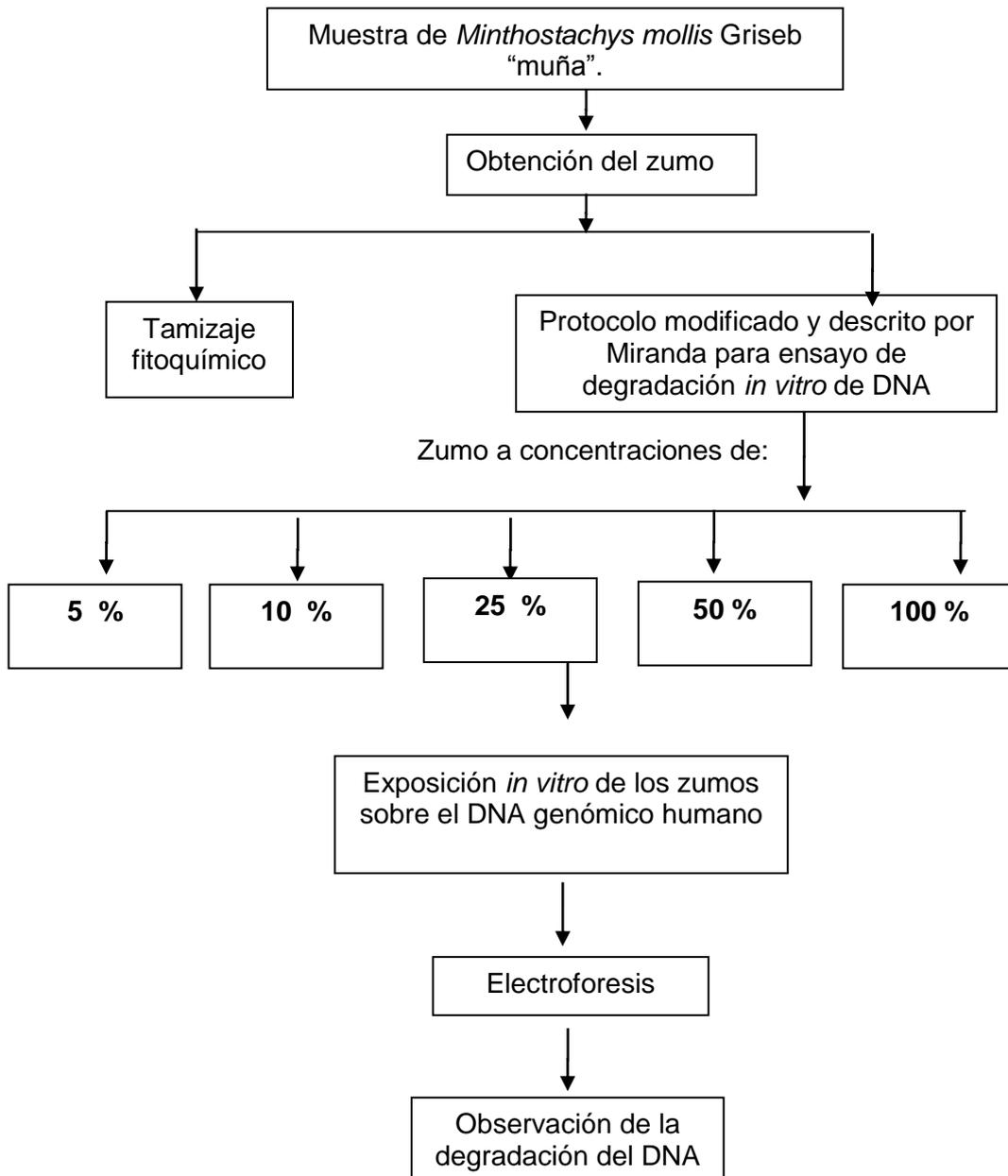
Anexo 5. Protocolo de extracción de DNA genómico de glóbulos blancos humano.



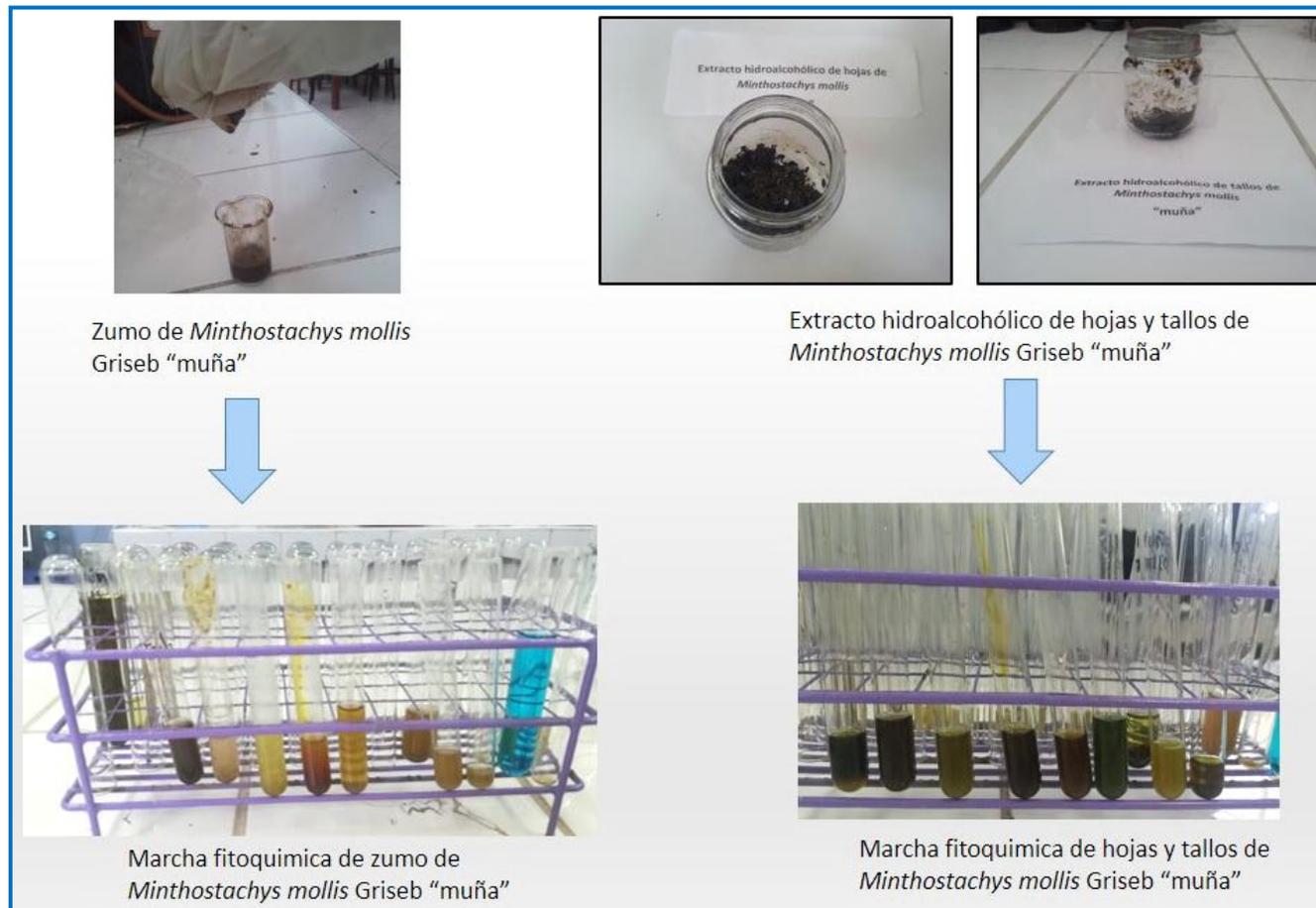
Anexo 6. Diagrama para la obtención del extracto hidroalcohólico del *Minthostachys mollis* Griseb “muña” y ensayo de degradación in vitro de DNA. Ayacucho 2018.



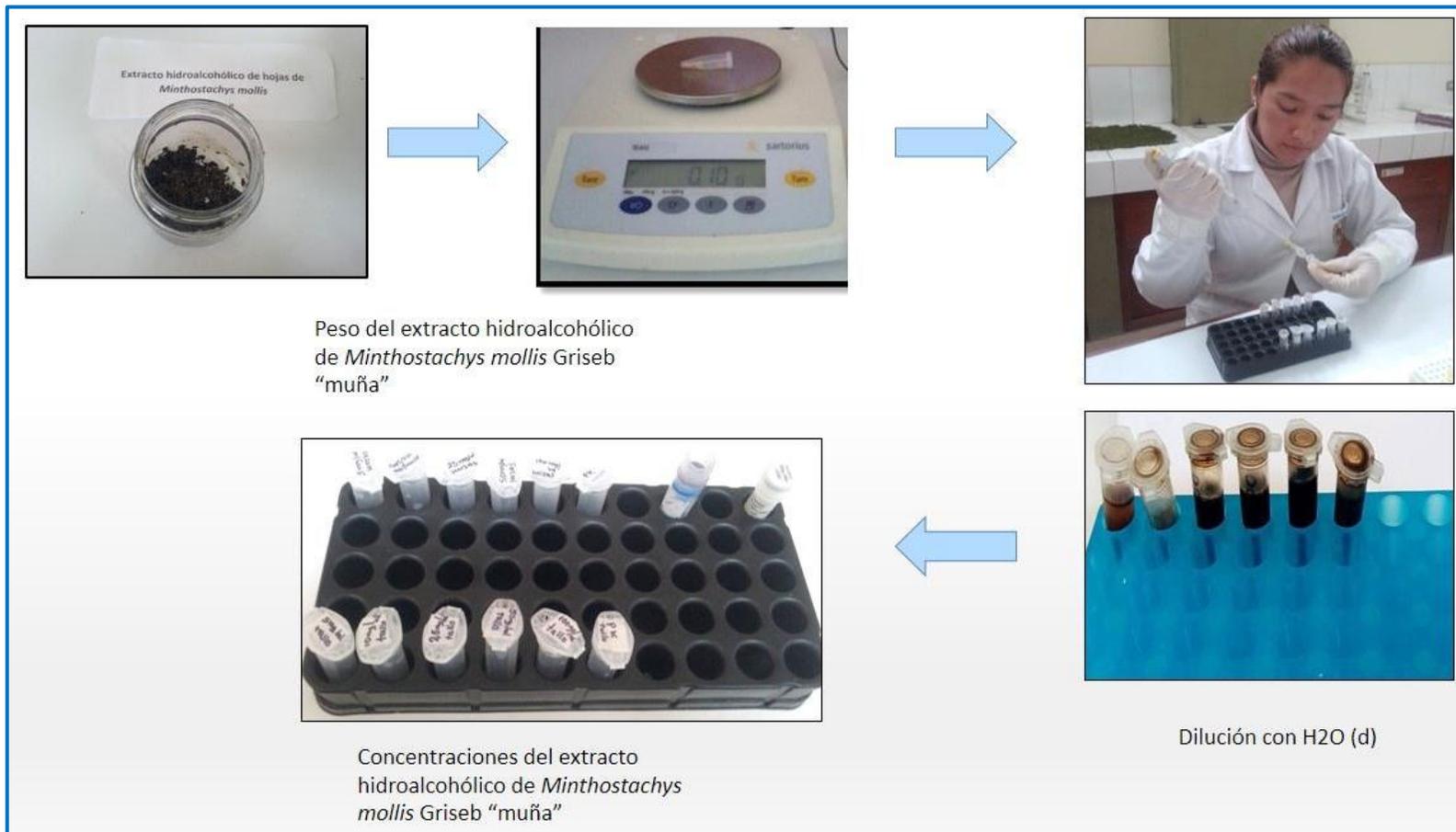
Anexo 7. Diagrama para la obtención del zumo de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”. y ensayo de degradación *in vitro* de DNA. Ayacucho 2018.



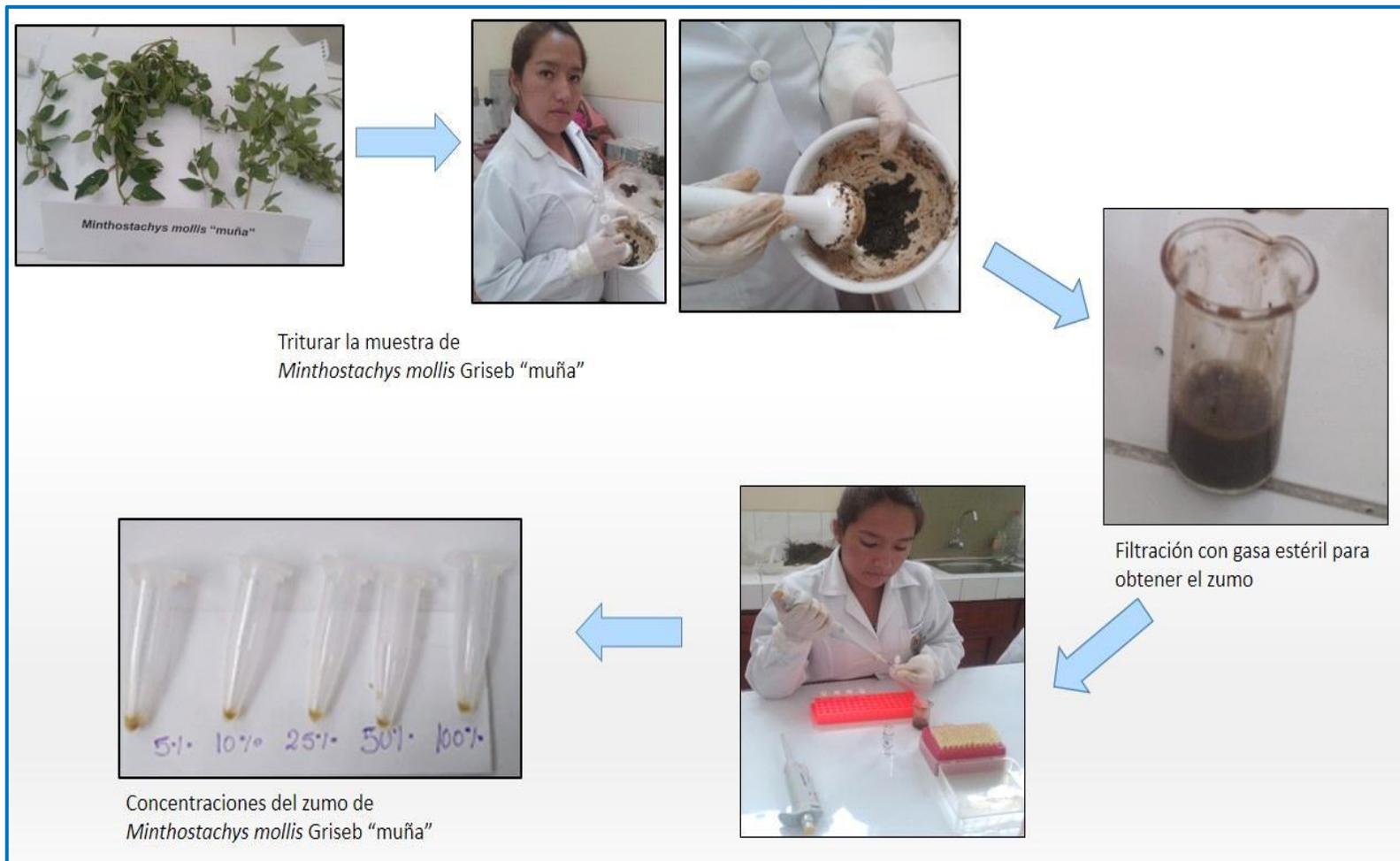
Anexo 8. Diagrama para la identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico y del zumo de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”. Ayacucho 2017.



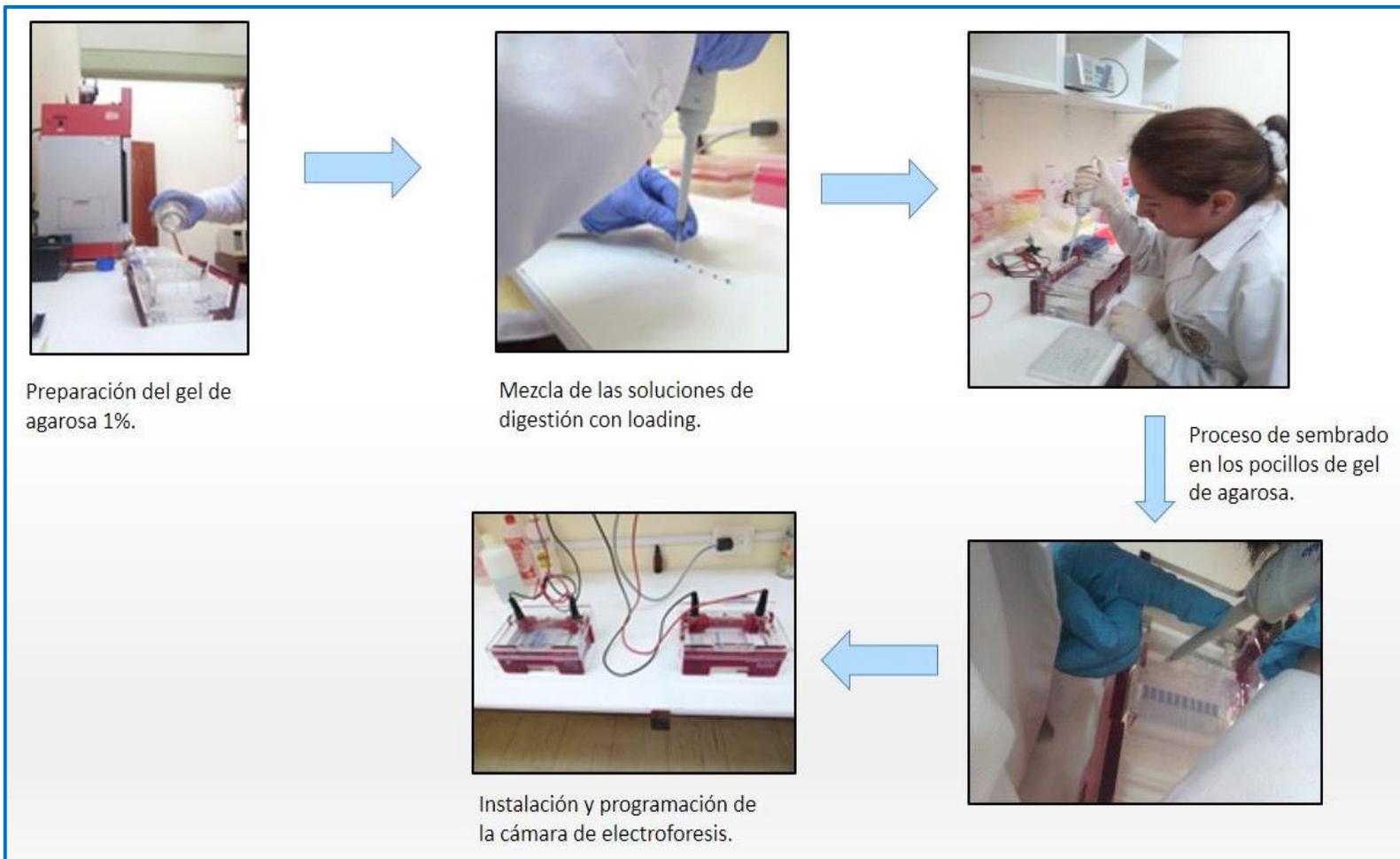
Anexo 9. Proceso de preparación de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Minthostachys mollis* Griseb “muña”. Ayacucho 2018.



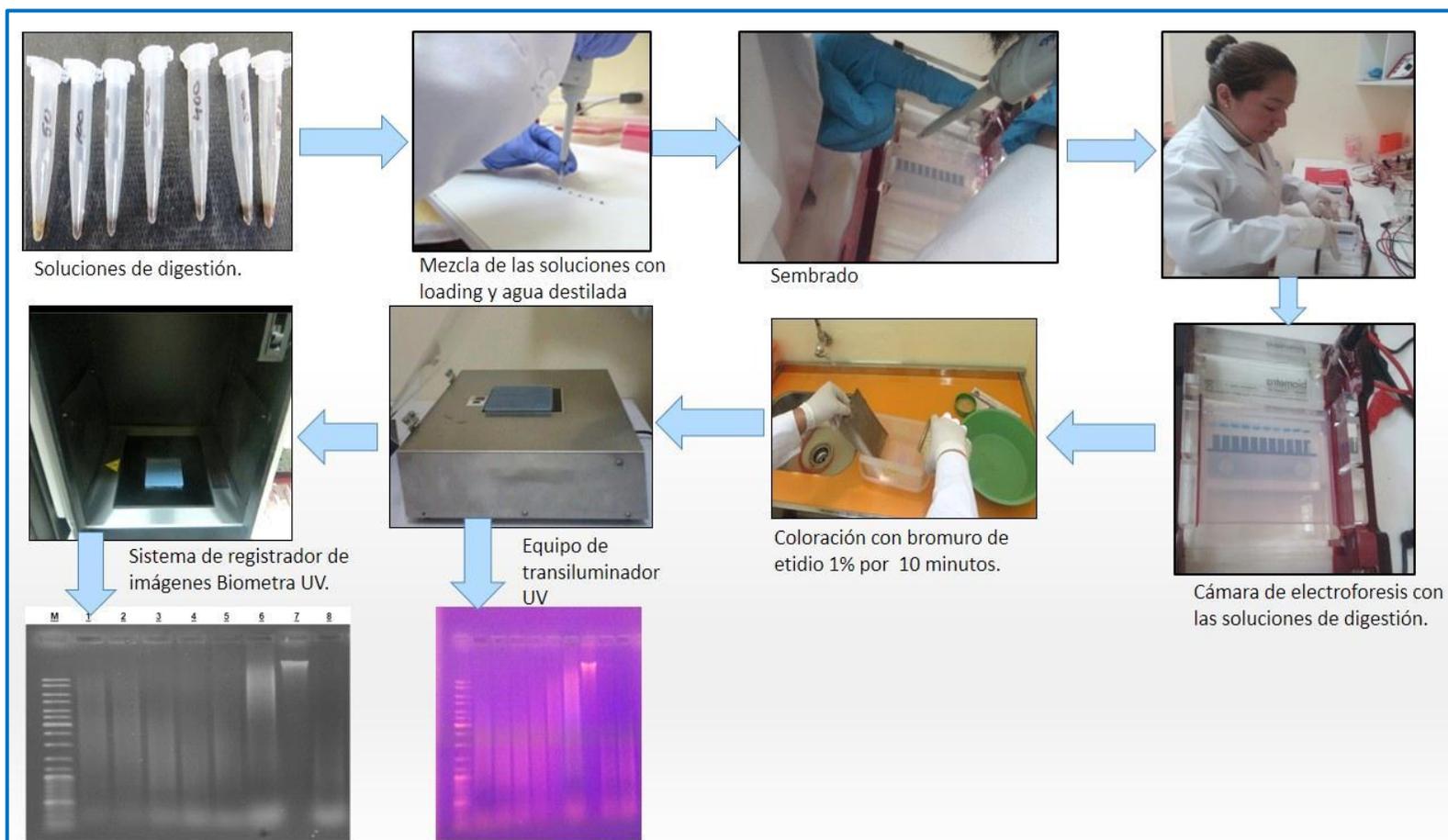
Anexo 10. Proceso de preparación a diferentes concentraciones del zumo de *Minthostachys mollis* Griseb "muña". Ayacucho 2018.



Anexo 11. Fase de electroforesis en gel de agarosa. Ayacucho 2018.



Anexo 12. Proceso para la determinación del efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico y zumo de *Minthostachys mollis* Griseb “muña” frente a DNA genómico humano. Ayacucho 2018.



Anexo 13. Matriz de consistencia

Título: Ensayos de degradación *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas, tallos y zumo de *Minthostachys mollis* Griseb “muña” frente a DNA genómico humano. Ayacucho, 2017.

Bach. Emavel MARTINEZ VEGA

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	MARCO TEÓRICO	VARIABLES	METODOLOGÍA
¿Habr� degradación <i>in vitro</i> DNA genómico humano frente al extracto hidroalcohólico y zumo de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”?	<p>General: Demostrar la degradación <i>in vitro</i> del DNA genómico humano frente al extracto hidroalcohólico y zumo de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”.</p> <p>Específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> Identificar la presencia de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas, tallos y zumo de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”. Comprobar el daño degradativo <i>in vitro</i> del DNA genómico humano frente al extracto hidroalcohólico de hojas, tallos y zumo de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”. 	En ensayo <i>in vitro</i> , el DNA genómico humano experimentará degradación frente al extracto hidroalcohólico y zumo de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”.	<p>Aspectos Botánicos <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”.</p> <p>Genotoxicidad Las pruebas de genotoxicidad pueden definir como pruebas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>, diseñadas para detectar compuestos que induzcan daño genético, directa o indirectamente, por diversos mecanismos.</p>	<p>Variable Independiente: Extracto hidroalcohólico de hojas, tallos y zumo de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”.</p> <p>Indicador: Metabolitos secundarios Concentración del extracto hidroalcohólico en miligramos por mililitro (mg/ ml). Concentración del zumo en porcentaje (%).</p> <p>Variables Dependientes: Degradación <i>in vitro</i> del DNA genómico humano</p> <p>Indicador: Grado de fragmentación del ácido desoxirribonucleico (DNA) genómico humano.</p>	<p>Tipo de investigación: Básica – experimental.</p> <p>Diseño Experimental: El experimento se realizará bajo la guía del ensayo <i>in vitro</i> para estudiar la degradación del DNA, por efecto de extractos de plantas medicinales.</p> <p>Población: <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”. que crece en el distrito de Huamanguilla la provincia de Huanta.</p> <p>Muestra: Hojas y tallos de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb “muña”, en cantidad de dos Kg, obtenidos en Huamanguilla.</p> <p>Unidad experimental: DNA genómico humano. A concentración de 1500 ng/ �L por cada ensayo.</p> <p>Análisis estadístico: Paquete estadístico SPSS, Pruebas de Kruskal-Wallis.</p>