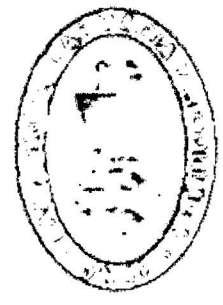


T  
615.907  
C14



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

TESIS

**“EVALUACIÓN GENOTÓXICA DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS LIOFILIZADOS DE *Bixa orellana*, *Annona muricata* Y LÁTEX LIOFILIZADO DE *Croton lechleri* EN LINFOCITOS DE RATAS ALBINAS – INSTITUTO DE MEDICINA TRADICIONAL – ESSALUD – IQUITOS – 2010.**

TESIS

Para Óptar el Título Profesional de:  
**QUÍMICO FARMACEUTICO**



Presentado por:

**Bach. HENRY FRANCISCO CACHIQUE REÁTEGUI**

Asesores:

**Blgo. FELIPE RÍOS ISERN**



00049

Coasesores

**Q.F. ERNESTO ANSELMO NINA CHORA**

**Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ**

**DONADO POR:**  
*Bach. Henry Francisco Cachique Reátegui*  
*Iquitos, 09 de 10 de 2010*

IQUITOS – PERU

2010



### ACTA DE SUSTENTACION

En el caserío de Nina Rumi, Distrito de San Juan Bautista, Departamento de Loreto, a los 10 días del mes de ABRIL del dos mil diez, siendo las 09:10 horas, el Jurado de Tesis designado según Resolución de Coordinación N° 027-FFB-UNAP-2010, integrado por los señores docentes que a continuación se detalla:

- |  |            |
|--|------------|
| ➤ Q.F. Carlos Adolfo Contreras Licetti | Presidente |
| ➤ Q.F. Patricia Utia Torrejón          | Miembro    |
| ➤ Q.F. Henry Vladimir Delgado Wong     | Miembro    |

Se constituyeron en las instalaciones del Laboratorio N° 4 de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulada **"Evaluación genotóxica de los extractos acuosos liofilizados de *Bixa Orellana*, *Annona muricata* y látex liofilizado de *Croton lechleri* en linfocitos de ratas albinas – Instituto de Medicina Tradicional – EsSalud – Iquitos - 2010"** presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Henry Francisco Cachique Reátegui**, para optar el **TITULO PROFESIONAL DE QUIMICO FARMACÉUTICO**, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA, de acuerdo a la Ley Universitaria N° 23733 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

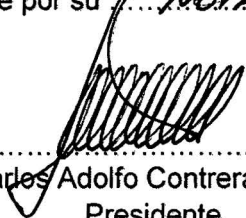
Luego de haber escuchado con atención la exposición del sustentante y habiéndose formulado las preguntas necesarias, las cuales fueron respondidas:

EN FORMA SATISFACTORIA.

El jurado llegó a la siguiente conclusión:

- 1.- La Tesis ha sido APROBADA POR UNANIMIDAD
- 2.- Observaciones NINGUNA

Siendo las 10:00 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándole al sustentante por su NOTABLE EXPOSICIÓN.

  
.....  
Q.F. Carlos Adolfo Contreras Licetti  
Presidente

  
.....  
Q.F. Patricia Utia Torrejón  
Miembro

  
.....  
Q.F. Henry Vladimir Delgado Wong  
Miembro

**COLABORADORES:**     **Q.F Deysi Luz Ríos Torres**

**Ing. Jorge Ysaac Villacrés Vallejo.**

**INTITUCIONES**

**COMPROMETIDAS:**

- **Laboratorio de Farmacología y Toxicología Experimental, Laboratorio de Fitoquímica - Instituto de Medicina Tradicional (IMET) - EsSalud.**
  
- **Laboratorio de Investigación - Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.**

---

**EVALUACIÓN GENOTÓXICA DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS LIOFILIZADOS DE *Bixa orellana*, *Annona muricata* Y LÁTEX LIOFILIZADO DE *Croton lechleri* EN LINFOCITOS DE RATAS ALBINAS – INSTITUTO DE MEDICINA TRADICIONAL – ESSALUD – IQUITOS – 2010**

---

*Bach. Cachique Reátegui Henry*

**RESUMEN**

Se evaluó la genotoxicidad de los extractos acuosos liofilizados de *Bixa orellana*, *Annona muricata* y látex liofilizado de *Croton lechleri* mediante el método visual de unidades arbitrarias del ensayo cometa a dosis de 1000 y 2000 mg/kg P.C. en ratas albinas cepa holtzmann de ambos sexos. Los extractos acuosos liofilizados y el látex liofilizado se administró vía oral durante 5 días, para la cual se establecieron un grupo control negativo de Cloruro de sodio al 0.9%, un grupo control positivo de Ciclofosfamida a dosis de 50 mg y 6 grupos tratados; la extracción de la muestra sanguínea se realizó por el método de punción cardiaca. Durante la evaluación se clasificaron y analizaron los diferentes daños de los linfocitos mediante unidades arbitrarias al inicio y a los 6 días después de iniciado el tratamiento. Al final del estudio se realizó la eutanasia de todos los animales por dislocación cervical. Según los resultados obtenidos los extractos acuosos liofilizados de *Bixa orellana*, *Annona muricata* y látex liofilizado de *Croton lechleri* no son genotóxicos a nivel de células individuales y no presentan actividad biológica, para lo cual se encontró leves variaciones entre los grupos con significancia estadística ( $p < 0.05$ ) en la mayoría de los casos, obteniendo como mayor número de unidades arbitrarias 20 UA en ambos sexos y dosis.

**Palabras claves:** *Bixa orellana*, *Annona muricata*, *Croton lechleri*, Ensayo cometa, ratas albinas, unidades arbitrarias.

---

**EVALUATION GENOTÓXICA OF THE AQUEOUS EXTRACTS LYOPHILIZED OF  
*Bixa orellana*, *Annona muricata* AND LATEX LYOPHILIZED OF *Croton lechleri* IN  
LINFOCITOS OF ALBINO RATS – INSTITUTO OF TRADITIONAL MEDICINA –  
ESSALUD – IQUITOS – 2010**

---

*Bach. Cachique Reátegui Henry Francisco*

**SUMMARY**

It was evaluated her of the aqueous lyophilized extracts of *Bixa orellana*, *Annona muricata* and latex lyophilized of *Croton lechleri* means of the essay comet visual method arbitrary units to 1000 and 2000 mg/kg W.C. dose in white rats ancestry both sexes holtzmann. The aqueous juices lyophilized and the latex lyophilized administer during 5 days oral manner, stop her as established him a group negative to Sodium chloride the 0.9% control and a group Ciclofosfamida positive control to treaties dose of 50 mg and 6 groups accomplish sanguine sign's extraction for the cardiac puncture method. They classified during the evaluation and they examined the different damages of the linfocitos by means of arbitrary units to the start and to give them days after initiate the treatment. I accomplish the euthanasia of all of the animals for cervical dislocation at the end of the study. He found obtained according the aqueous lyophilized extracts of *Bixa orellana*, *Annona muricata* and latex lyophilized of *Croton lechleri* Genotóxicos do not come from level individual cells neither they present biological activity, to the aftermaths lift variations among the groups with statistical significance for the most part, obtaining as bigger arbitrary units number 20 UA in both sexes and dose.

**Key words:** *Bixa orellana*, *Annona muricata*, *Croton lechleri*, Essay comet, white rats, arbitrary units.

## DEDICATORIA

*A mis padres por darme este valioso regalo que es la vida y por enseñarme en todo momento  
y brindarme el apoyo necesario.*

*A mis hermanos por su amistad y su apoyo incondicional.*

*A mis familiares por estar en aquellos momentos difíciles.*

*A todas las personas que hicieron posible este trabajo*

## AGRADECIMIENTO

Primero doy infinitamente gracias a Dios, por haberme dado fuerza y valor para terminar mis estudios.

Agradezco también la confianza y el apoyo de mis padres Gladis y Hugo y hermanos, porque han contribuido positivamente para llevar a cabo esta difícil jornada.

A mis asesores, porque cada uno, con sus valiosas aportaciones, me ayudaron a crecer como persona y como profesional.

Un agradecimiento muy especial, al Instituto de Medicina Tradicional - IMET, por haberme proporcionado sus instalaciones y valiosa información para realizar mi trabajo de tesis.

A mis compañeros, profesores del IMET, por su comprensión y cariño y por la gran calidad humana que me han demostrado con una actitud de respeto.

Finalmente, agradezco a mis compañeros de grupo, porque la constante comunicación con ellos ha contribuido en gran medida a transformar y mejorar mi forma de actuar en mi trabajo, especialmente a aquellos que me brindaron cariño, comprensión y apoyo, dándome con ello, momentos muy gratos.

## INDICE DE CONTENIDO

Pág.

### LISTA DE ABREVIATURAS

#### CAPITULO 1

1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
3. OBJETIVOS.....	4

#### CAPITULO 2

1. MARCO TEORICO.....	6
2. HIPOTESIS.....	38
3. DEFINICIONES OPERACIONALES.....	39

#### CAPITULO 3

1. METODOLOGÍA.....	45
2. POBLACION Y MUESTRA.....	46
3. MATERIALES, EQUIPOS Y DROGAS.....	57

#### CAPITULO 4

1. RESULTADOS.....	65
2. DISCUSIÓN.....	71
3. CONCLUSIONES.....	73
4. RECOMENDACIONES.....	74

#### CAPITULO 5

1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
2. ANEXOS.....	86



## **INDICE DE TABLAS**

Tabla N° 01 Promedios de las Unidades Arbitrarias en ratas albinas machos por grupo de tratamiento (UA)

Tabla N° 02 Promedios de las Unidades Arbitrarias en ratas albinas hembras por grupo de tratamiento (UA)

## **INDICE DE GRAFICOS**

Gráfico N° 01 Variaciones en el peso corporal en ratas albinas machos, por grupo de tratamiento, durante el ensayo.

Gráfico N° 02 Variaciones en el peso corporal en ratas albinas machos, por grupo de tratamiento, durante el ensayo.

Gráfico N° 03 Promedios de las Unidades Arbitrarias en ratas albinas machos por grupo de tratamiento (UA)

Gráfico N° 04 Promedios de las Unidades Arbitrarias en ratas albinas hembras por grupo de tratamiento (UA)

## **INDICE DE CUADROS**

CUADRO N° 01 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

CUADRO N° 02 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES (continuación)

CUADRO N° 03 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES (continuación)

CUADRO N° 04 Distribución de Grupos Experimentales

## **ABREVIATURAS**

♀	Hembra.
♂	Macho.
%	Porcentaje.
°C	Grados Centígrados.
cm	Centímetro
Lt	Litro.
gr	Gramo.
kg	Kilogramo.
mL	Mililitro.
DL <sub>50</sub>	Dosis letal media.
U.I.	Unidades Internacionales.
µg	Microgramos.
p.c.	Peso Corporal.
km	Kilometro.
IMET	Instituto de Medicina Tradicional.
IIAP	Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana.
msnm	Metros sobre el nivel del mar.
NaCl	Cloruro de Sodio
µL	Microlitro
PBS	Buffer Fosfato Salino
r.m.p.	Revoluciones por minuto.

**“EVALUACIÓN GENOTÓXICA DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS  
LIOFILIZADOS DE *Bixa orellana* , *Annona muricata* Y LÁTEX LIOFILIZADO  
DE *Croton lechleri* EN LINFOCITOS DE RATAS ALBINAS – INSTITUTO DE  
MEDICINA TRADICIONAL – ESSALUD – IQUITOS – 2010.**

---

---

**CAPITULO** **1**

---

---

## 1. INTRODUCCIÓN

La actual predisposición a consumir productos naturales y, en muchas regiones, la difícil disponibilidad y accesibilidad a los medicamentos han llevado a las poblaciones del mundo a buscar otras alternativas para aliviar sus dolencias. Una de las más difundidas ha sido el regreso a la medicina ancestral, lo cual ha provocado un aumento en el consumo de fitoterapéuticos. <sup>(1)</sup>

Para muchas personas existe la creencia que el uso de plantas medicinales por ser productos naturales no ocasionan ningún daño, olvidando que si una planta tiene un potencial medicinal, también tiene un potencial tóxico debido a que ejerce un efecto biológico; los efectos tóxicos se relacionan con las dosis, la frecuencia y tiempo de consumo de determinada droga vegetal. <sup>(2)</sup>

Con el auge que en la actualidad tiene la Fitoterapia, la Genética Toxicológica ha comprobado que los medicamentos de origen vegetal con una o más acciones terapéuticas pueden presentar sustancias con actividad mutagénica relacionadas con procesos carcinogénicos y alteraciones en la descendencia. <sup>(2)</sup>

La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos, la Genética toxicológica tiene una amplia aplicación en la actualidad, que se ocupa de evaluar el riesgo genético por exposición a diferentes genotóxicos; descubrir efectos genotóxicos, mutagénicos, carcinógenos, antígenotóxicos, antimutagénicos y anticancerígenos de extractos vegetales medicinales, medicamentos de reciente formulación, cosméticos, saborizantes, etc. De ahí uno de los estudios de gran relevancia, es el ensayo cometa, el cual tiene múltiples aplicaciones y se encuentra en proceso de estandarización en nuestro medio. <sup>(3)</sup> Sin embargo, existen pocos trabajos publicados sobre los efectos genotóxicos de plantas medicinales mediante el ensayo cometa por tal motivo se plantea el siguiente problema.

## 2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

¿Los extractos acuosos liofilizados de *Bixa Orellana*, *Annona muricata* y látex liofilizado de *Croton lechleri*, tendrá efecto genotóxico en linfocitos de ratas albinas mediante el ensayo cometa?

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1.- General

- ✓ Evaluar la genotoxicidad de los extractos acuosos liofilizados de *Bixa Orellana*, *Annona muricata* y látex liofilizado de *Croton lechleri*, en linfocitos de ratas albinas cepa Holtzmann, mediante el ensayo Cometa.

#### 3.2.- Específicos

- ✓ Determinar la actividad genotóxica del látex liofilizado de *Croton lechleri* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg<sup>-1</sup> administradas por vía oral, en ratas albinas cepa holtzmann mediante método visual del Ensayo Cometa.
- ✓ Determinar la actividad genotóxica de los extracto acuosos liofilizados de *Bixa orellana* y *Annona muricata* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg<sup>-1</sup> administradas por vía oral, en ratas albinas cepa holtzmann mediante método visual del Ensayo Cometa.
- ✓ Comparar la actividad genotóxica de los extractos acuosos liofilizados de *Bixa orellana*, *Annona muricata* y látex liofilizado de *Croton lechleri* y ciclofosfamida en linfocitos de ratas albinas cepa holtzmann mediante el método visual del ensayo cometa.

---

---

# CAPITULO

2
---



## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. ANTECEDENTES *Croton Lechleri* Muell arg.

El género *Croton* está conformado por arbustos o árboles pequeños y medianos; monoicos; con savia de color amarillo-rojizo; hojas enteras, dentadas, raramente lobuladas; inflorescencia en racimos o espigas axilares o terminales; fruto esquizocárpico; semillas lisas o con una pequeña carúncula notoria. Es un género cosmopolita; en América Tropical y Subtropical se han identificado unas 400 especies, varias de las cuales son venenosas y otras tienen aplicación médica. <sup>(4)</sup>

El árbol idóneo para la obtención de látex debe medir más de 18 metros de altura y ha de tener un diámetro de 0.5 metros. Se raspa la corteza con una máquina limpia y apropiada, y se hace incisiones cada 5 cm. aproximadamente. A medida que se acercan al ramaje, el látex se hace más denso y brota más rápidamente.

El látex presenta un aspecto similar al de la sangre humana y algunas propiedades físicas son comunes entre sí. Es una sustancia líquida de color rojo, ligeramente densa y de gran viscosidad; al contacto con el aire se endurece rápidamente dejando mancha apreciable en el sitio de aplicación; al ser agitada o friccionada sobre la piel, deja abundante espuma; tiene un gran poder de adhesión, su olor es agradable, no así su sabor que es amargo; no es miscible en agua, pero sí en alcohol a temperatura ambiente, siendo su punto de ebullición 91°C y el de congelación 0°C . No es inflamable. <sup>(5)</sup>

Sangre de grado es uno de los productos más utilizados a nivel popular en las zonas tropicales húmedas de Centro y Sudamérica. Las primeras referencias

escritas datan del siglo XVII, cuando el naturalista y explorador español P. Bernabé Cobo descubrió las propiedades curativas de este látex, ampliamente conocidas por las tribus indígenas de México, Perú y Ecuador. <sup>(6)</sup> Se usa principalmente como cicatrizante. También se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antisépticas y hemostáticas, además de efectos beneficiosos en el tratamiento de las diarreas. <sup>(7)</sup>

### 1.1.1 Estudios Fitoquímicos

Los componentes mayoritarios aislados de *Croton lechleri* son: catequina, epicatequina, galocatequina, pigalocatequina (monómeros de flavan-3-oles) y proantocianidinas de diferentes tamaños. El SP-303 es un oligómero proantocianidínico heterogéneo (2100 Daltons), aislado del látex de *Croton lechleri* (Ubillas *et al.*, 2005). <sup>(8)</sup> cuyos componentes básicos son (+)-catequina, (+)-galocatequina, (-)-epicatequina y (-)-galoepicatequina, siendo predominantes (+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina. Entre los compuestos minoritarios, se encuentran el alcaloide taspina, un lignano denominado dimetilcedrusina (Pieters *et al.*, 2005)<sup>(9)</sup>, y diterpenos como ácido hardwickiico, bicantriol, crolequinol, ácido crolequínico, korberina A y korberina B (Cai *et al.*, 2003)<sup>(10)</sup>. Además están presentes  $\beta$ -sitosterol y  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido, 1,3,5-trimetoxibenceno, 2,4,6-trimetroxifenol, 3,4-dimetoxifenol, alcohol 3,4-dimetoxibenzílico y alcohol 4-hidroxifenílico .

## 1.1.2 Estudios farmacológicos

### 1.1.2.1 Farmacología experimental:

#### Pre-clínica:

Ubillas y col. (1994) aislaron del látex de *Croton lechleri*, una proantocianina oligomérica, compuesto que en sus investigaciones ha demostrado actividad contra una gran variedad de virus DNA y RNA. En pruebas "*in vitro*" ofreció una potente actividad contra cepas de virus respiratorio (RSV) sincitial, Virus A de la influenza (FLU=A) y virus de parainfluenza (PIV).<sup>(11)</sup>

Avalos y Cabanillas (Trujillo 1994) en un estudio experimental *in vitro*, utilizando cultivos de bacterias sembradas en placas con agar BHI enfrentados al látex de *Croton lechleri* a dosis de 5, 10, 20 Y 30ml (estableciéndose que 1 ml corresponde a 125mg de extracto seco del látex), determinaron que el extracto alcohólico del látex tiene efecto antibacteriano sobre *S. aureus* y *S. epidermidis* y no posee efecto sobre *P. aeruginosa*.<sup>(12)</sup>

Málaga, (1991) demostró, en ratas con úlcera gástrica inducida por indometacina, que la taspina a dosis de 37,5mg/kg reduce en un 50% los índices de ulceraciones y el clorhidrato de taspina a la misma dosis, aumenta el espesor y la consistencia de la capa de mucus gástrico. De igual modo, se pudieron evidenciar resultados beneficiosos con la administración por vía oral de 1 ml al 20% en alcohol de la resina de *Croton lechleri* en 30 ratas con úlcera inducido por etanol y estrés, a través de una prueba triple ciego, constatándose su eficacia.<sup>(13)</sup>

## Clinica

Marcelo y Meza, 1999; La sangre de drago mezclada con óxido de zinc puede ser utilizada en el tratamiento de la alveolitis seca dolorosa, ya que induce la formación del tejido de granulación de los alveolos secos, elimina el dolor y el mal olor presente en esta enfermedad en períodos que fluctúan entre 24 horas y 4 días posteriores al tratamiento. <sup>(14)</sup>

Miller et al., 2000; el látex de *Croton lechleri* facilita la curación úlceras gástricas, reduciendo la actividad mieloperoxidasa, el tamaño de la úlcera y la sepsis. <sup>(15)</sup>

Chen et al., 2004. La sangre de drago de *Croton lechleri* es poco activa frente a *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. El 1,3,5-trimetoxibenceno y el 2,4,6-trimetoxifenol son muy activos frente a *B. subtilis*, más potentes que la penicilina y el cloramfenicol. <sup>(16)</sup>

Risco et al., 2000. Sangre de drago estimula o inhibe la fagocitosis en neutrófilos y monocitos humanos dependiendo de la concentración, Se ha comprobado que la taspina no es el único responsable de la acción antiinflamatoria. <sup>(17)</sup>

### 1.1.3 Estudios Toxicológicos

La acción citotóxica hallada a concentraciones de taspina cercanas a las que contiene en forma natural (Sangre de Grado 300 ng/ml) aproximadamente podría ser un factor inflamatorio importante.

Parte de esa misma reacción sería la estimulación la migración de fibroblastos. Milla (1985) encontró que el clorhidrato de taspina muestra efecto letal en células a concentraciones por encima de 3000 ng/ml, tóxico entre 3000-500 mg/ml y tóxico débil a menos de 500 ng/ml. Se observó acción letal a concentraciones mayores de 1000 ng/ml y tóxico incluso a 250 ng/ml, existe un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular hasta 100 ng/ml. <sup>(18)</sup>

#### 1.1.4 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reyno	:	Plantae
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Euphorbiales
Familia	:	Euphorbiaceae
Género	:	<i>Croton</i>
Especie	:	<i>lechleri</i>

#### 1.1.5 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

##### Descripción de la planta

Árbol de hasta 25 m; el látex de color rojo oscuro; hojas con trichomas estrellados, se ponen de color anaranjado antes de caer; fruto capsular en tres partes.

El género *Croton* está conformado por arbustos o árboles pequeños y medianos; monoicos; con savia de color amarillo-rojizo; hojas enteras,

dentadas, raramente lobuladas; inflorescencia en racimos o espigas axilares o terminales; fruto esquizocárpico; semillas lisas o con una pequeña carúncula notoria. Es un género cosmopolita; en América Tropical y Subtropical se han identificado unas 400 especies, varias de las cuales son venenosas y otras tienen aplicación médica.

En la Región Amazónica, especialmente en Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia se conocen con el nombre de "sangre de drago" a unas pocas especies de *Croton* productoras de una resina de color sangre en la que se han identificado varias propiedades medicinales. En Colombia se obtiene la resina especialmente de *C. funckeanus*, que es un árbol pequeño de 3 a 5 m de altura; en el Ecuador de *Croton lechleri*, que es un árbol de hasta 25 m de alto con un tronco de 40 a 50 cm de diámetro conocido entre los Quichuas como "lan huiqui" y entre los Cofanes como "masujin". En el Perú se han reportado cinco especies de *Croton* designadas popularmente como "sangre de drago o de grado", de las cuales dos han recibido especial atención por parte de los investigadores: *C. palanostigma* Klotsch y *Croton lechleri* Muell. Arg. En Bolivia *C. draconoides* Muell. Arg., conocida como "sangre de drago" en Pando y Beni, es un árbol pequeño con savia amarillo-rojiza usada como cicatrizante y para el dolor de estómago e hígado <sup>(19)</sup>.

#### 1.1.6 INFORMACIÓN ETNOMÉDICA Y ETNOBOTANICA

*Croton lechleri* es el sustituto americano de una droga del Viejo Mundo, en donde la llamada "sanguis draconis" se venía utilizando desde la antigüedad clásica. Esta resina de color rojo, se obtenía de varias especies vegetales: en Asia se extraía de *Calamus draco* Will., procedente de Java, Sumatra y Borneo, y también de *Petrocarpus draco* L., especie nativa de la India; junto a ellas se usaba otra procedente de las Islas

Canarias, obtenida del "drago", árbol emblemático de las islas. Después del descubrimiento, en América Tropical se identificaron varios árboles que producían una resina similar a la del Viejo Mundo, que posteriormente se encontró que pertenecían a varias especies del género *Croton*.

Entre los indígenas amazónicos del Ecuador la savia de *Croton* es usada por sus propiedades antiinflamatorias; así por ejemplo, en las cortaduras y heridas, se aplica directamente la savia, observándose una rápida cicatrización. La resina alivia el dolor después de las extracciones dentales y ayuda a la resolución de la herida bucal. En las inflamaciones alérgicas se recomienda tomar una taza de jugo de piña con 20 gotas de sangre de drago. Los Quichuas le llaman "yahuar huiqui" (sangre resina) y lo usan para curar las quemaduras y heridas, aplicando directamente la savia sobre la parte afectada. Para las úlceras del estómago se recomienda tomar cada día un vino medicinal que se obtiene mezclando una media taza de savia en un litro de vino. Para las diarreas se toma la savia mezclada con agua.

Los Huitotos, que viven cerca de Leticia, Colombia, cortan las hojas de *C. glabellus* y preparan un emplasto que se aplica en las cortaduras y llagas infectadas. Los Tikunas machacan las hojas y se aplican en los eczemas varias veces al día; también aprecian mucho los baños preparados con una decocción de la corteza de *C. cuneanus*, que consideran que mantiene la piel joven y rebosante. En Manaos se usa popularmente la savia de *C. palanostigma* para la curación de heridas e infecciones de la piel.

Los Quichuas de la Amazonia ecuatoriana conocen a la especie *Croton lechleri* como "ian iqui" y usan el látex para tratar los "fuegos" de las mucosas bucales o de la lengua y para la limpieza dental. Diluido en agua, se dice que el látex es beneficioso en el tratamiento de la anemia, las enfermedades del riñón y del estómago. Como cicatrizante, se aplica en las heridas o cortaduras utilizando una pluma con la que se impregna la resina por los bordes.<sup>(20)</sup>

## 1.2. ANTECEDENTES *Bixa orellana*. L

El achiote es conocido desde las épocas precolombinas y fue descrito tanto por cronistas europeos como por los propios indígenas. Su nombre genérico *Bixa* deriva de la denominación conferida por los nativos de la Isla Española (Santo Domingo), en tanto el nombre de especie fue conferido en honor al botánico y explorador don Francisco de Orellana. La denominación popular urucum proviene del vocablo tupi uru-ku que significa amarillo, en tanto su otro nombre popular achiote deriva de una voz nahuatl *achiotl* con la cual se conocía a esta especie en México. Las tribus que asentaban en las orillas del Orinoco se untaban desde la cabeza a los pies con una mezcla de aceite y semillas de achiote. Lo mismo acontecía con los indígenas de Honduras. Esta untura no sólo cumplía con ritos ceremoniales o camoufflage, sino que los protegía contra las picaduras de insectos y del intenso sol.<sup>(21)</sup>

Es una planta arbustiva perenne que alcanza entre 3 y 5m. de altura, siendo su copa baja y extendida. Su tallo es oscuro y ramificado a poca altura del suelo. Las hojas simples, grandes, de color verde claro, persistente alternas, de bordes lisos, forma acorazonada y con largos pecíolos. Las flores están dispuestas en ramilletes terminales y son hermafroditas, de colores blanco a rosado según las variedades; su floración es escalonada y comienza por los capullos terminales. El fruto es una cápsula de color rojo, erizada de pelos gruesos, dehiscente, de



color verde oscuro o morado según las variedades, que al madurar se tornan de color pardo-rojo obscuro. En cada valva se encuentra un número variable de semillas, desde 10 hasta 40, en relación con el tamaño de la cápsula; aunque en promedio se puede tomar como 20 semillas por cápsula en los ejemplares espontáneos. Las semillas son parecidas a la de la vid (*Vitis vinífera* L.) pero de mayor tamaño y algo comprimido; su tegumento está recubierto por una sustancia viscosa de color rojo vivo. <sup>(22)</sup>

*Bixa orellana* (achiote) es otra de las plantas a las que se le atribuye efectos antiulcerosos, pero su uso se encuentra limitado a la zona de la selva alta, siendo el efecto antiinflamatorio y refrescante del estómago los más conocidos en dicha región.

El uso terapéutico que se atribuye a la planta es muy variado y depende de la parte que se va a utilizar. La información recogida por entrevista, durante la recolección de la muestra y por diversas publicaciones, menciona que se emplea las semillas para tratar bronquitis, hemorroides, para las quemaduras, antidiarreico, antiemético, antidiabético y expectorante <sup>(23)</sup>. La raíz es considerada antidisentérica, antivenérea e hipoglicemiante y las hojas como desinflamatorio bucal, diurético, antiinflamatorio prostático (que es una de las propiedades más difundida), enfermedades del hígado. En la medicina popular venezolana se emplea las hojas en decocción para curar las enfermedades del hígado y 'limpiar la sangre'. Cuando se las aplica en la frente y sienas actúan como refrescante, en el 'dolor de muela' y de cabeza <sup>(24)</sup>.

### 1.2.1 Estudios Fitoquímicos

Semillas: Son ricas en carotenoides expresados como provitamina A (1000-2000 U.I./g de semilla seca). Entre ellos destacan: bixina (1-5% de

la droga seca), betabixina, metilbixina, norbixina, orellina, zeaxantina, beta-caroteno (6,8-11,3 mg/100 g), luteína y criptoxantina. También contienen pentosanos, pectinas, proteínas, taninos y un aceite esencial (ishwarano es el mayor componente) con un alto tenor de ácidos grasos poliinsaturados y menor proporción de ácido linoleico y oleico.

La bixina (monometiléster de la norbixina) es de color rojo-anaranjado, siendo insoluble en agua y soluble en grasas, ceras y resinas. Es el principal componente (en especial el isómero cis) en las preparaciones liposolubles que se expenden por farmacia. La forma cis es inestable y durante la extracción se convierte en la forma trans (isómero estable). La norbixina es obtenida por hidrólisis alcalina de la bixina. Es de color amarillo y soluble en agua.

Hojas: Contienen flavonoides (apigenina, hipoaetina, cosmosiina, etc), diterpenos :(farnesilacetona, geraniol, geranil formato), alcaloides (vestigios), ácido gálico (benzenoide), aceite esencial (bixaganeno o ishwarano).

Análisis proximal de 100 g de la semilla seca: proteínas (13-17%): triptofano, lisina, metionina, isoleucina, fenilalanina, treonina y caseina; grasa (5%); cenizas (5.4%); altas concentraciones de fósforo, escasas de calcio y 0% de agua. En 100 g de planta fresca tenemos: calorías (54), agua (84,4 g), grasas (0,3 g), carbohidratos (14,3 g), fibra (0,5 g), ceniza (1 g), calcio (7 mg), fósforo (10 mg), hierro (0,8 mg), caroteno (90 ug), riboflavina (0,05 mg), niacina (0,3 mg) y ácido ascórbico (2 mg).<sup>(25)</sup>

### 1.2.2 Estudios farmacológicos

El extracto acuoso y clorofórmico de la semilla introducido por intubación gástrica en perros anestesiados demostró acción hipoglucemiante significativa, no insulino-dependiente (Morrison E., 1985), lo mismo que las raíces en forma de decocción (Saravia Gómez A. et al., 1995; Girón L. & Cáceres A., 1995). Paradójicamente, el extracto alcohólico ha provocado hiperglucemia en perros anestesiados, lo cual se debería a la presencia del metil-éster trans-bixina. El examen de los tejidos reveló daño mitocondrial y en el sistema retículo endotelial de hígado y páncreas <sup>(26,27)</sup>

La concentración de provitamina A o carotenos presentes en las semillas le otorgan actividad antioxidante beneficiosa contra la acción deletérea proporcionada por los radicales libres y los de la luz solar <sup>(28)</sup>. El extracto acuoso de las raíces demostró efecto relajante en íleon aislado de cobayo (en dosis de 1 mg/k) y actividad antisecretora gástrica en ratas (en dosis de 400 mg/kg), mientras que el extracto hidroalcohólico ha demostrado inhibir la enzima prostaglandina sintetasa en concentraciones de 750 ug/ml <sup>(29)</sup>.

Finalmente la administración intradérmica a ratas de un extracto de Bixa orellana evidenció un 100% de capacidad neutralizadora de hemorragias provocadas por mordedura de *Bothrops atrox* venom <sup>(30)</sup>.

### 1.2.3 Estudios Toxicológicos

No observados a dosis usuales, en cambio dosis muy elevadas pueden tener un efecto purgante y hepatotóxico. Sólo ha sido reportado

un caso de anafilaxia debido a la ingesta de leche y cereales que contenían colorantes de *Bixa orellana*, manifestándose el cuadro a través de urticaria, angioedema y severa hipotensión arterial <sup>(31)</sup>. En perros se detectó con la administración de la semilla a dosis muy altas, toxicidad hepática y pancreática, con aumento de la insulina en sangre. Dicha toxicidad disminuyó con la administración de riboflavina <sup>(26)</sup>.

De acuerdo con los trabajos del grupo científico TRAMIL realizados en la flora caribeña, se determinó que la administración de la infusión de las hojas en dosis de 5 g/kg en ratas no ha resultado tóxica. De igual modo ocurre con la ingesta de las semillas <sup>(32)</sup> y el agregado de 250 g/ml de bixina en cultivos de fibroblastos humanos <sup>(33)</sup>.

La determinación de la DL<sub>50</sub> de la combinación (2:1) del extracto acuoso de hojas de *Bixa orellana* y corteza de *Uncaria tomentosa* demostró muy baja toxicidad, del orden de 28.000:14.000 mg/k. La administración subcrónica de dicha combinación no provocó alteraciones en los parámetros de proteínas totales, albúmina, globulinas y transaminasas <sup>(34)</sup>.

En el instituto de Medicina Tradicional de EsSalud de la ciudad de Iquitos – 1998, se realizaron ensayos de toxicología de los extractos acuosos liofilizados de las hojas de *Bixa orellana*, entre estos ensayos están los de toxicidad agua, donde los resultados obtenidos demuestran que la DL<sub>50</sub> del extracto acuoso es mayor de 2000 mg/kg<sup>-1</sup> p.c vía oral y de 849.9 mg/kg<sup>-1</sup> p.c, vía intraperitoneal, según clasificación de Willians es “prácticamente no toxico” vía oral t “ligeramente toxico” vía intraperitoneal.

También se realizaron ensayos de micronúcleos en médula ósea de ratón, donde el extracto acuoso liofilizado a dosis de 2000, 1000 y 500 mg/kg<sup>-1</sup> p.c administrado vía oral, no manifiesta significancia biológica ni estadística en el porcentaje de micronúcleos en los eritrocitos policromaticos en animales tratados con dicho extracto, por lo tanto no presenta componentes con actividad genotóxica. <sup>(35)</sup>

#### 1.2.4 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

*Sistema de clasificación Arthur Cronquist (1988)*

DIVISIÓN	:	Magnoliophyta
CLASE	:	Magnoliopsida
SUB-CLASE	:	Dilleniidae
ORDEN	:	Violales
FAMILIA	:	Bixaceae
GENERO	:	Bixa
ESPECIE	:	<i>Bixa orellana L.</i>

#### 1.2.5 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

##### **Descripción de la planta**

Arbusto o arbolito siempre verde de 2-4 m de altura en cultivo, con las ramas de color castaño, con un indumento de pelos glandulosos. Hojas de cordado-ovadas a triangular-ovadas, con la base redondeada o subtruncada, a veces ligeramente cordada, el margen entero y el ápice

gradualmente acuminado; son de color verde intenso y glabras en el haz, mientras que en el envés son más claras o grisáceas, glabrescentes o lepidotas, con puntos glandulares rojizos. Nerviación palmeada.

Inflorescencias, grandes, vistosas, dispuestas en corimbos terminales, con pelos glandulares; brácteas caducas. Flores, sobre pedicelos, con un anillo de glándulas bajo el cáliz. Cáliz con los sépalos de anchamente ovados a orbiculares, caducos; corola con los pétalos estrechamente obovados, de color rosa o blanco. Estambres numerosos, con las anteras de color violeta. Cápsula subglobosa u ovoide, espinosa, de color marrón púrpura o rojiza en la madurez, conteniendo numerosas semillas (hasta 50) obovoides, angulosas, lisas, de color rojo cuando están frescas. Semilla.<sup>(36)</sup>

#### **1.2.6 INFORMACIÓN ETNOMÉDICA Y ETNOBOTANICA**

El achiote es una de las especies vegetales con mayor acreditación de espectro terapéutico popular, fama que le llega de más de cuatro siglos de uso por las comunidades indígenas sudamericanas. Respecto al uso de la semilla se le atribuyen propiedades astringentes, febrífugas, antidisentéricas, diuréticas y afrodisíacas. En forma de infusión o jarabe son usadas con fines expectorantes en casos de bronquitis (Brasil), mientras que la pulpa aplicada directamente en heridas de piel y quemaduras, evita la formación de ampollas (Cuba y Guatemala).

Según refiere Piso, desde el siglo XVII en casos de envenenamiento por el ácido prúsico contenido en la mandioca o yuca agria (*Manihot sculenta*), los indígenas utilizaban las semillas como antídoto (tener en cuenta que los tubérculos de la yuca para que sean comestibles deben

coccionarse a efectos de eliminar los heterósidos cianogénicos que contiene). Asimismo en la epidemia de viruela acaecida en Guatemala entre 1908 y 1910, algunos autores mencionaron la gran utilidad dispensada por estas semillas para evitar las huellas que dejaba en la piel esta enfermedad. El achiote además, se considera una de las plantas incorporadas a los rituales afro-brasileños característicos del norte de ese país.

Es común en Centroamérica hacer un extracto con las semillas y aplicar el polvo resultante sólo o junto a infusión de manzanilla en procesos inflamatorios locales. Para hacer el extracto se colocan las semillas en un recipiente con agua y se deja reposar toda la noche. Al día siguiente se refriegan las semillas contra el fondo para que se vaya desprendiendo el colorante, dejándolo luego precipitar. A continuación se tira el agua y se extrae la masa rojiza para dejarla secar al sol. En algunas regiones del Caribe se emplean las semillas en una suspensión oleosa para tratar la diabetes.

Las hojas se emplean en forma de cataplasma para aliviar cefaleas. La decocción de las mismas se emplea en forma de gargarismos en afecciones de garganta (Bolivia), contra enfermedades hepáticas (Colombia), diurético, enfermedades cardíacas, afrodisíaco y expectorante (Brasil) y para combatir diarreas, fiebres, sarampión y disenterías (Honduras). El jugo obtenido de las hojas machacadas se utiliza como antiemético y antidiarreico (Guatemala).

La raíz en decocción era usada antiguamente como digestivo. Actualmente como antiasmático (Cuba), diurético y antiinflamatorio (Guatemala). La corteza machacada y macerada en agua es utilizada en

casos de ictericia, disentería y como desintoxicante. La infusión de la misma como antidiarreica y calmante en hemorroides (Argentina). Del tronco se obtiene una sustancia gomosa semejante a la goma arábica utilizada en la elaboración de soluciones emolientes.<sup>(25)</sup>

### 1.3. ANTECEDENTES *Annona muricata*. L

Guanábana, es un tamaño medio de árboles de hoja perenne nativo de América Tropical. En la naturaleza, los árboles tienen un color gris suave corteza de color marrón y llegará a unos 25 pies (7,6 m) de altura. El brillante, hojas verde oscuro son lanceoladas, llegando a 6 pulgadas (15 cm) de largo. El fruto es utilizado en la fabricación de sorbetes y bebidas. Las hojas, semillas, corteza, raíces y frutos se han usado con fines medicinales. Los árboles son bastante fáciles de crecer, y su tamaño es fácilmente controlado por la poda selectiva. Son resistentes en zonas de Estados Unidos.<sup>(37)</sup>

Las propiedades de la guanábana son muy conocidas por sus efectos anticancerígenos. En realidad, lo que se utiliza con dicho fin son las hojas de guanábana, más conocidas como graviola.<sup>(38)</sup>

La *Annona muricata* L (guanábana), de la familia Annonaceae, es un árbol pequeño y ramificado, con hojas gruesas y siempre verdes, brillantes en la parte inferior, de amplia distribución 10, en la cual se han encontrado más de 50 acetogeninas con diferentes actividades biológicas presentes en frutos, corteza y hojas; identificándose 21 acetogeninas citotóxicas en las hojas.<sup>(39)</sup>





Se evidenció que sólo las fracciones 7 a 17 procedentes de la asociación del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana) y el extracto acuoso atomizado de la raíz de *Krameria lappacea* (ratania) tuvieron efecto citotóxico in vitro frente a las líneas celulares de cáncer de glándulas mamarias, pulmón y sistema nervioso, posiblemente por la presencia de terpenoides y saponinas.

La asociación de las dos plantas es importante porque ha permitido disponer de un extracto vegetal rico en compuestos fenólicos y triterpenoides 18 , y por fraccionamiento los terpenoides y saponinas están presentes en las fracciones 7-17, las cuales fueron activas frente a las líneas celulares de cáncer de mama, pulmón y sistema nervioso; asimismo se observa que al usar por separado el extracto de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* eran inactivos, lo cual contrasta con estudios anteriores, en los que se demuestra que los extractos de hoja de guanábana son activos frente a líneas de células cancerígenas <sup>(39, 40)</sup>

Una característica importante demostrada en grupos representativos de esta familia es la presencia de flavonoides en flores <sup>(41)</sup> y hojas <sup>(42)</sup>, cuya composición fenólica e hidroxilada, producirían actividad insecticida <sup>(43)</sup> mediante su unión a sistemas enzimáticos <sup>(41)</sup>, muy similares a los involucrados en la cadena respiratoria, causando potente inhibición..

Según las últimas investigaciones realizadas sobre los alcaloides presentes en la corteza, hojas y semillas de este árbol, las mismas poseerían un efecto citotóxico, que puede aprovecharse para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, sin atacar a su vez a las células sanas.

En consecuencia, los alcaloides de la guanábana serían especialmente útiles contra el cáncer de páncreas, pulmón y próstata, de acuerdo a los análisis efectuados en los Estados Unidos, más específicamente en la Universidad de Purdue, Indiana.

La efectividad de la guanábana se centraría en su alto contenido de acetogenina, una sustancia semejante a la adriomicina, que se usa en quimioterapia. Sin embargo, a diferencia de ésta última, la acetogenina tendría la capacidad de enfocar su acción solamente sobre las células cancerosas, sin afectar los tejidos sanos como sucede en la quimioterapia.

Además de su acción anticancerígena, la guanábana también podría tener propiedades antibacterianas y antiparasitarias. Asimismo, sería útil contra la hipertensión y para combatir estados de ansiedad, depresión y nerviosismo.

En la actualidad, la guanábana se consume en forma de filtrantes para preparar té, cápsulas, hojas y extracto en polvo, entre otras posibles presentaciones.<sup>(44)</sup>

La posible actividad antitumoral de *Annona muricata* se debe a un compuesto activo que posee ésta, probablemente se trate de una acetogenina aunque no se puede descartar la presencia de un nuevo compuesto.

Así también, se recomienda probar la actividad antitumoral de extracto etanólico de *Annona muricata* “in vivo” en animales de experimentación. Se concluye que el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* mostró tener efecto citotóxico sobre las líneas tumorales C678 y H460; las concentraciones de extracto etanólico utilizadas son más citotóxicas que las

concentraciones homólogas de 5FU, y para la línea VERO la actividad citotóxica de extracto etanólico es superior a la actividad del homólogo de 5FU. <sup>(45)</sup>

La importancia de la guanábana frente al cáncer, dada su propiedad desparasitante, cobra día a día mayor importancia. Resultados de estudios efectuados desde 1997 a la actualidad en Estados Unidos, en la Universidad de Purdue, Indiana, en tratamientos de tumores cancerígenos con sustancias presentes en la guanábana, han sido altamente positivos, reconfirmando análisis anteriores realizados entre 1941 y 1962.

Varios estudios han demostrado que los extractos de la hoja, corteza, raíz, vástago y semilla de la guanábana son antibacterianos, mientras que la corteza tiene además características antimicóticas. Las semillas, en tanto, demostraron también propiedades antiparasitarias.

La investigación sobre este mágico árbol sigue en curso, conociéndose nuevos avances fitoquímicos específicos que están demostrando las características anticancerígenas de la guanábana contra casi todos los tipos de este terrible mal.

Un estudio aún no concluido, aportaría indicios acerca de que el uso de la guanábana comenzaría a controlar en 48 horas el crecimiento de un tumor. Ante esto, existe mucho interés en la comunidad científica en lograr sintetizar estos productos químicos naturales para incorporarlos en nuevas drogas. <sup>(46)</sup>

### 1.3.1 Estudios Fitoquímicos

Componentes químicos de la Hoja de *Annona muricata*<sup>(47)</sup>

#### **Lactonas**

- \* Annohexocina
- \* Annomuricina A, B, C y E
- \* Annomutacina
- \* Annopentocinas A, B y C
- \* Muricoreacina
- \* Gigantetronemina
- \* Murihexocina A y C
- \* Javoricina

#### **Isoquinolinas**

- \* Anonaine
- \* Anoniine
- \* Atherospermine
- \* Coreximine

#### **Lípidos**

- \* Acido gentísico
- \* Acido lignocérico
- \* Acido linoleico
- \* Acido esteárico

### 1.3.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino	:	Plantae
Phyllum	:	Spermatophyta
Subphyllum	:	Magnoliophytina
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Magnolidas
Orden	:	Magnoliales
Familia.	:	Annonaceae
Género	:	<i>Annona</i>
Especie	:	<i>muricata</i> L.

### 1.3.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

#### Descripción de la planta

Es un árbol de bajo porte de 3 – 10 m de altura; copa angosta y abierta, fuste recto de 15 cm, corteza externa lisa de color pardo grisáceo y corteza interna rosada. Ramitas lenticeladas; hojas simples, alternas y sin estipulas; lámina subcoriácea, obovada elíptica de 5 – 18 cm de largo y 2 – 7 cm de ancho, márgenes enteros, ápice cortamente acuminados, base subcunadea, aguda u obtusa; haz verde oscuro, brillante y glabro, envés verde amarillento y opaco, pinnatinerve; peciolo hasta 0.8 cm de largo.

Flores bisexuales solitarias o en pares en tallitos cortos que brotan de las ramas viejas, el fruto es una baya colectiva o sincarpo, ampliamente ovoide o elipsoide, verde oscuro de 15 – 40 cm de largo y 10 -20 cm de ancho, a menudo asimétrico en la base debido a la polinización deficiente, está recubierta por espinas suaves carnosas que miden de 0.3 – 0.5 cm de largo y están volteadas hacia el ápice. <sup>(48)</sup>

#### **1.3.4. INFORMACIÓN ETNOMÉDICA Y ETNOBOTANICA**

La infusión de la corteza, raíz y hojas se emplea en la medicina tradicional en casos de diabetes, como sedativa, antiespasmódica y para combatir la indigestión gástrica; el cocimiento de las hojas y la corteza como sedante y cardiotónico; los frutos verdes y las hojas como antidiarreicos, astringentes, para combatir la dispepsia atónica y disentería crónica: los frutos además presentan propiedades antirraquiticas y las semillas se les atribuye propiedades eméticas, antihelmínticas y antiespasmódicas.

Por otro lado las semillas trituradas y colocadas en alcohol se emplean para eliminar los piojos y la tintura para provocar vómitos abundantes y repetidos. Se propaga por semillas y vegetativamente. <sup>(49)</sup>

## **1.4. BASES TEÓRICAS**

### **1.4.1. TOXICOLÓGICA GENÉTICA**

#### **DEFINICION**

La Genética toxicológica es una ciencia que como resultado del descubrimiento de que la interacción entre tóxicos y DNA, traducidos en varios procesos nocivos como: la Mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis entre otros. El reconocimiento de la mutagénesis, como paso previo para la carcinogenicidad y los peligros potenciales de los agentes mutagénicos para la población humana y la biosfera, despertó el interés por desarrollar la Genética Toxicológica como ciencia.

La Genética Toxicológica evalúa los efectos genotóxicos potenciales en las células somáticas y estudia la inducción de mutaciones en células germinales que pueden aumentar las frecuencias de enfermedades genéticas. Para tales cometidos son utilizadas diferentes herramientas y técnicas validadas mejoradas día a día con el empleo de equipos computarizados, técnicas en Biología Molecular, modelos en animales extrapolables a humanos, etc. Así, la Genética toxicológica abre un campo de investigación en el mundo y en nuestro país, permitiendo crear nuevas líneas de observación, proporcionando importantes aportes desde 1990 con la evaluación de la genotoxicidad de extractos vegetales y biomonitorización de poblaciones expuestos a diferentes agentes como metales pesados y plaguicidas.<sup>(50)</sup>

#### 1.4.2. DESARROLLO HISTÓRICO DE LA TOXICOLOGÍA GENÉTICA

Las investigaciones sobre mutaciones se inician en 1927 con los trabajos de Müller acerca de los efectos de los rayos X sobre la mosca de la fruta, la *Drosophila melanogaster*. Con posterioridad, fueron observados los efectos mutagénicos de los rayos X sobre las plantas, así como la mutagenicidad de la luz ultravioleta. No obstante, la primera evidencia inequívoca de un caso de mutagénesis química corresponde al año 1942, cuando Auerbach y Robson demostraron los efectos tóxicos del gas mostaza sobre la *Drosophila*.

El desarrollo ocurrido en la Genética molecular a partir de los trabajos de Watson y Crick, que en 1953 elucidaron la estructura tridimensional del ADN, y los posteriores descubrimientos sobre la replicación del ADN, el código genético y la síntesis de proteínas, permitieron indagar acerca de los mecanismos de la mutagénesis. Entonces se comprendió que un simple cambio de una base podría dar lugar a la aparición de un nuevo fenotipo y, por ello, se comenzó a investigar intensamente sobre los efectos de los productos químicos en el ADN. Hacia finales de la década de los sesenta se tiene ya el convencimiento de que la especie humana está expuesta a un número creciente de compuestos químicos, que pueden tener un efecto mutagénico, con el consiguiente peligro para su salud y la de sus descendientes.

Como resultado, se sugiere la conveniencia de incluir los ensayos sobre la mutagenicidad de las sustancias químicas entre las pruebas necesarias para su evaluación toxicológica. El problema de los posibles efectos mutagénicos de los productos químicos conduce a la creación en el año 1969 de la Environmental Mutagen Society (EMS) en los Estados Unidos, y un año más tarde de la European Environmental Mutagen



Society (EEMS). Por otra parte, también a partir de la década de los setenta se elaboraron guías nacionales sobre protocolos de ensayo de mutagenicidad, y hoy día no es posible registrar un nuevo medicamento, aditivo alimentario, etc., o ni siquiera transportar un compuesto químico de uno industrial a través de los países industrializados, sin disponer de los datos básicos sobre su mutagenicidad.

En un principio, fue considerado como objetivo primario de la Toxicología Genética la estimación del riesgo de mutación para las células reproductoras, luego según los avances tecnológicos se manifestó la relación entre la mutagenicidad de algunas sustancias y sus efectos sobre el desarrollo de tumores. <sup>(51)</sup>

#### **1.4.3. AGENTES GENOTÓXICOS**

Los agentes capaces de ocasionar toxicidad genética son llamados genotóxicos o xenobióticos y se clasifican en tres categorías de acuerdo a su origen: químicos, físicos y biológicos. La primera categoría está constituida por los compuestos químicos, la segunda incluye las radiaciones en todo su espectro y la última algunos parásitos, bacterias, hongos, vegetales o incluso virus (aunque estos últimos no son considerados seres vivos, por lo que muchas veces aparecen clasificados en una categoría aparte). La acción o capacidad de inducir daño de estos xenobióticos está influida por la dosis recibida y el tiempo o vía de exposición, junto a la constitución genética del individuo que puede definir una susceptibilidad propia o particular.

A su vez, los xenobióticos también pueden clasificarse de acuerdo a su modo de acción o efectos en mutágenos, carcinógenos o teratógenos, dando lugar a tres tipos de procesos: mutagénesis, carcinogénesis y

teratogénesis. La mutagénesis abarca los distintos tipos de alteraciones genéticas. Dichas alteraciones (mutaciones) pueden producirse a nivel de una unidad mínima de información (como por ejemplo un gen) o a nivel de unidades mayores como grupos estructurales (cromosomas) correspondiendo a lo que se denomina micromutación o macromutación respectivamente. En el caso de las macromutaciones, se definen como agentes clastógenos a aquellos capaces de inducir rupturas cromosómicas y agentes aneunógenos, a aquellos que producen la pérdida de cromosomas enteros o grupos de cromosomas. Las mutaciones pueden producirse sobre las células somáticas y/o germinales, siendo en este último caso heredable si son transmitidas a la progenie. La carcinogénesis es un proceso que involucra cambios (transformación celular) de tipo irreversible, a través de una serie de estadíos (iniciación, promoción y progresión). Se ha observado que la mayoría de los carcinomas están asociados entre un 90-95% de los casos a agentes químicos, entre un 1-5% a agentes físicos (radiaciones) y entre un 1-2% a agentes de tipo biológico o virus. Por otra parte, la teratogénesis, implica el daño inducido sobre el organismo en desarrollo, es decir, en alguno de los distintos períodos de gestación o a lo largo de la misma como proceso.

Dentro de los genotóxicos de origen químico encontramos una amplia gama de compuestos con efectos múltiples. Es de conocimiento público el incidente de la Talidomida en los años 60, una droga suministrada como sedante e indicada para estados nauseosos. Debido a esta segunda propiedad fue ingerida por mujeres que atravesaban el primer trimestre del embarazo, acarreando consecuencias fatales. Este compuesto, del cual se desconocía su efecto teratogénico, indujo malformaciones fetales, produciendo el nacimiento de niños con ausencia de miembros o que presentaban afecciones neurológicas.

Encontramos también numerosos contaminantes ambientales en esta categoría: metales pesados, hidrocarburos aromáticos y pesticidas representan un breve ejemplo de ello. La exposición ocupacional también constituye un factor determinante en el desarrollo de patologías neoplásicas. Se ha mostrado que la inhalación de partículas de asbestos desencadenan en el desarrollo de cáncer de pulmón., así como otros xenobióticos químicos que son introducidos por lo que se conoce como “estilos de vida”, dentro de los que podemos encontrar el hábito de fumar o el alcoholismo.

En cuanto a los agentes de tipo físico, las altas dosis de radioactividad liberadas en el accidente de la planta nuclear de Chernobyl en 1986 y aquellas devenidas como producto de la explosión de las bombas atómicas arrojadas por EE.UU. en Hiroshima y Nagasaki, dejaron notables evidencias del alcance del daño capaz de ser inducido por las radiaciones en el material genético. Como consecuencia directa de las altas dosis recibidas que provocaron la muerte de cientos de miles de personas, las poblaciones en cuestión desarrollaron distintos tipos de cáncer, además de mutaciones en sus células germinales que dieron lugar a la aparición de multiplicidad de enfermedades genéticas y malformaciones que se manifestaron en las generaciones postreras, por lo que las consecuencias de la exposición a este xenobiótico se prolongaron largamente en el tiempo.

Los rayos UV, encuentran como blanco de daño a las células epiteliales, debido a que la piel constituye la mayor vía de exposición. Numerosas patologías relacionadas a la deficiencia en los mecanismos de reparación del ADN, ejemplifican de manera paradigmática los efectos carcinogénicos en la epidermis producidos por la radiación UV.

Por otra parte, aún existen controversias en cuanto los efectos genotóxicos de otro tipo de radiaciones como las electromagnéticas.

Entre los agentes de tipo biológico, un ejemplo radica en las aflatoxinas, micotoxinas producidas por algunos hongos unicelulares, las que han mostrado ser potentes carcinógenos. Por otra parte, ejemplificando a la subcategoría constituida por los xenobióticos de origen vegetal, algunas hierbas a las que se le adjudican propiedades medicinales también pueden representar un riesgo para la salud, de acuerdo con las dosis ingeridas y debidas a que muchas de ellas no han sido caracterizadas en cuanto a su genotoxicidad. La quercetina y la rutina, por ejemplo, han mostrado ser mutagénicas e incluso carcinogénicas.

Para evaluar el daño causado por los potenciales agentes genotóxicos se hace imprescindible el reconocimiento, caracterización y seguimiento de ese efecto y en distintos niveles de análisis, tarea que le compete a una rama de la ciencia interdisciplinaria, la Genética Toxicológica, que se encarga del monitoreo ambiental y humano en general, por distintos tipos de exposición.<sup>(52)</sup>

#### **1.4.4. SUSTANCIAS GENOTÓXICAS**

Las sustancias genotóxicas pueden unirse directamente al ADN o actuar indirectamente mediante la afectación de las enzimas involucradas en la replicación del ADN y causando, en consecuencia, mutaciones que pueden o no desembocar en un cáncer. Las sustancias genotóxicas no son necesariamente cancerígenas, pero la mayor parte de los cancerígenos son genotóxicos.<sup>(53)</sup>

#### **1.4.5. SUSTANCIAS MUTAGÉNICAS**

Las sustancias mutagénicas poseen la capacidad de producir cambios permanentes en el material genético; si el cambio tiene lugar en el material genético que heredan los descendientes (células germinales), puede afectar a las generaciones posteriores.

Un mutágeno interacciona con el ADN produciendo una lesión que, si no se repara, o si la reparación resulta deficiente, puede dar lugar a una mutación. Esta última puede resultar letal o no para la célula.

No todas las sustancias mutagénicas en células somáticas son también mutagénicas en células germinales. En cambio, todos los mutágenos de células germinales lo son también en células somáticas. Por otra parte, las sustancias mutagénicas deben considerarse probablemente cancerígenas.

(54)

#### **1.4.6. POSIBLES EFECTOS DE LOS MUTÁGENOS**

En la reproducción masculina, el proceso diana para las sustancias mutagénicas es la espermatogénesis, pero no todas las células presentan el mismo riesgo ante la acción de un mutágeno. Tres factores las hacen diferentes:

Nivel que ocupan en la línea: las mutaciones en las células madre serán portadas por el esperma desarrollado a partir de ellas durante toda la vida de la persona.

Desde este punto de vista las células de mayor riesgo son las espermatogonias; en cambio, los espermatocitos o espermatozoides dañados serán reemplazados al cabo de un tiempo.

Actividad replicativa: la síntesis de ADN tiene lugar principalmente en las espermatogonias y los espermatocitos primarios que serán las células más sensibles a la acción de los mutágenos.

Actividad de los sistemas de reparación: las células espermiogénicas son las menos efectivas en la reparación de lesiones y el esperma maduro ya ha perdido esta capacidad reparadora. <sup>(55)</sup>

#### **1.4.7. ENSAYO COMETA**

El ensayo del cometa es una técnica sencilla, rápida y sensible para analizar el daño en el ADN en células individuales. Su nombre deriva de la apariencia que cobran las células tras la realización del ensayo: una cabeza intensamente brillante, y una cola cuya longitud e intensidad están relacionadas con la cantidad de roturas de cadena del ADN que contiene. En contraste, las células no dañadas presentan aspecto de núcleos intactos, sin cola. Esto es debido a la migración de los fragmentos de ADN dañado hacia el ánodo, al ser sometida la célula a una diferencia de potencial durante una electroforesis. Es precisamente en eso en lo que radica el fundamento de la técnica; las células aisladas y expuestas al

agente genotóxico son embebidas en una capa de agarosa y distribuidas sobre un portaobjetos, se lisan sus membranas por acción de un detergente y, tras llevar a cabo el proceso electroforético, se produce la migración del ADN en función del daño ocasionado sobre él por el compuesto químico.<sup>(56)</sup>

#### **1.4.7.1 CLASIFICACIÓN DE DAÑOS EN LA CELULA**

El daño al ADN se expresa como porcentaje de células dañadas, que incluye todas las células con cometa de bajo, moderado, elevado y extremo nivel de daño al ADN.<sup>(57)</sup>(Anexo N° 01)

#### **1.4.7.2 VENTAJAS DEL ENSAYO COMETA**

La ventajas del ensayo cometa incluyen la colección de datos a nivel de células individuales permitiendo un análisis estadístico más robusto, no es necesario un numero grande de células en la muestra (<10000 células), tiene gran sensibilidad para detectar el daño al ADN y se usa en cualquier tipo de célula eucariota, proveniente de cualquier población, *in vitro* e *in vivo*, eso incluye desde células de poblaciones humanas hasta células de organismos acuáticos, se ha empleado para estudios ecogenotoxicológicos y monitoreo ambiental.<sup>(58)</sup>

### 1.4.8 LINFOCITOS

Los linfocitos son un tipo de leucocito (glóbulo blanco) comprendidos dentro de los agranulocitos. Son los leucocitos de menor tamaño (entre 7 y 15  $\mu\text{m}$ ), y representan del 24 a 32% del total en la sangre periférica. Presentan un núcleo esférico que se tiñe de violeta-azul y en su citoplasma frecuentemente se observa como un anillo periférico de color azul. Poseen un borde delgado de citoplasma que contienen algunas mitocondrias, ribosomas libres y un pequeño aparato de Golgi.

Los linfocitos son células de alta jerarquía en el sistema inmune, principalmente encargadas de la inmunidad específica o adquirida.

Estas células se localizan fundamentalmente en los órganos linfoides. Tienen receptores para antígenos específicos y, por tanto, pueden reconocer y responder al que se les presente. Por último, los linfocitos se encargan de la producción de anticuerpos y de la destrucción de células anormales. Estas respuestas ocurren en el interior de los órganos linfoides, los cuales, para tal propósito, deben suministrar un entorno que permita la interacción eficiente entre linfocitos, macrófagos y antígeno extraño. La principal causa de su aumento es el estrés. <sup>(59)</sup>



## **2. HIPOTESIS**

Los extractos acuosos liofilizados de *Bixa Orellana*, *Anona muricata* y látex liofilizado de *Croton lechleri*, a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg p.c., no presentan actividad Genotóxica mediante el ensayo cometa.

### **3. DEFINICIONES OPERACIONALES**

#### **3.1.VARIABLES**

##### **3.1.1. Variables Independientes.**

- Extractos acuosos liofilizados de *Bixa orellana* y *Anona muricata* y látex liofilizado de *Croton lechleri*.

##### **3.1.2. Variables Dependientes.**

- Efecto Genotóxico de las diferentes sustancias evaluadas, según dosis ensayadas.

##### **3.1.3. Variables Intervinientes**

- Sexo

#### **3.2.INDICADORES**

##### **3.2.1. Indicador Variable Independiente:**

- Dosis de 1000 y 2000 mg/kg de peso corporal

##### **3.2.2. Indicador Variables Dependientes.**

- Unidades Arbitrarias – Método visual – Ensayo Cometa
- \* Grado 0: Células, Sin daño, sin cola
- \* Grado 1: Células, Cabeza mayor que la cola
- \* Grado 2: Células, Cabeza igual a la cola
- \* Grado 3: Células, Cabeza menor que la Cola
- \* Grado 4: Células en apoptosis

### **3.2.3. Indicador Variables Intervenientes**

- Macho
- Hembra

**CUADRO N° 01**

**3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>	<b>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</b>	<b>DEFINICIÓN OPERACIONAL</b>	<b>INDICADOR</b>	<b>ESCALA</b>
Látex Liofilizado de <i>Croton lechleri Muell Arg.</i>	Producto congelado y conservado por liofilización y administrado a los animales según peso corporal.	Filtrado, congelado (1 día a -22°C) para finalmente liofilizar por 72 horas (-40°C, presión de $1.33 \times 10^{-3}$ Mbarr).	Dosis: 1000 y 2000 mg/Kg	Ordinal  - Tipo: Cuantitativo
Extracto acuoso liofilizado de hojas de <i>Bixa orellana</i> y <i>Annona muricata</i> .	Producto de la extracción de metabolitos secundarios obtenidos por cocción, congelado y conservado por liofilización y administrado a los animales según peso corporal.	Extracción por cocción de la parte vegetal con agua a 60-70°C durante 30 min. Posterior filtrado, concentrado a 60-70°C, congelado (1 día a -22°C) para finalmente liofilizar por 72 horas (-40°C, presión de $1.33 \times 10^{-3}$ Mbarr).	Dosis: 1000 y 2000 mg/Kg	Ordinal  - Tipo: Cuantitativo

**CUADRO N° 02**

**3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES (continuación)**

<b>VARIABLE DEPENDIENTE</b>	<b>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</b>	<b>DEFINICIÓN OPERACIONAL</b>	<b>INDICADOR</b>	<b>ESCALA</b>
Efecto genotóxico de las diferentes sustancias evaluadas.	Acción de ocasionar daño al ADN, tras la administración de sustancias con dicha capacidad.	Administrar previamente las sustancias a evaluar, pasando a determinar el grado de genotoxicidad que dicha sustancia posiblemente provoca.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Daño clasificado en niveles o grados.</li> <li>• Unidades arbitrarias</li> </ul> <p>*Grado 0: Células, Sin daño, sin cola</p> <p>* Grado 1: Células, Cabeza mayor que la cola</p> <p>* Grado 2: Células, Cabeza igual a la cola</p> <p>* Grado 3: Células, Cabeza menor que la Cola</p> <p>* Grado 4: Células en apoptosis</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Racional</li> <li>-</li> </ul> <p>Cuantitativo y/o Cualitativa</p> <p align="right">Tipo:</p>

**CUADRO N° 03**

**3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES (continuación)**

<b>VARIABLE INTERVINIENTE</b>	<b>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</b>	<b>DEFINICIÓN OPERACIONAL</b>	<b>INDICADOR</b>	<b>ESCALA</b>
Sexo	Clasificación en machos o hembras basadas en numerosos criterios, entre ellos las características anatómicas y cromosómicas.	Comparación según el sexo del animal, grados de los cometas, en ambas dosis de ensayo	Sexo Macho  Sexo Hembras	Nominal  Cuantitativa y/o cualitativa

---

---

**CAPITULO** **3**

---

---

## 1.1.METODOLOGÍA

### 1.2.Tipo de Estudio

Se empleó un *Diseño experimental prospectivo longitudinal*.

**Experimental-Analítico:** se realizó comparaciones de la variable dependiente entre los grupos experimentales y de control.

**Prospectivo:** en el registro de la información se tomaron en cuenta los hechos a partir de la fecha de estudio.

**Longitudinal:** se estudiaron las variables a lo largo del tiempo durante el periodo de investigación.

### 1.3.Diseño de Investigación

Ensayo preclinico, con grupos seleccionados aleatoriamente, bajo condiciones experimentales controladas.

Los animales fueron sometidos a un periodo de acondicionamiento y aclimatación por 7 días según las condiciones experimentales.

Cada extracto evaluado estaba formado por 8 ratas albinas (4 machos y 4 hembras), teniendo en consideración las normas estipuladas por la International Association for the Study of Pain (IASP), <sup>(61)</sup> que establece trabajar con grupos pequeños de animales, lo suficientemente necesario para demostrar o rechazar la hipótesis de trabajo.

La distribución de los grupos se realizó de acuerdo al **CUADRO N° 04**



## CUADRO N° 04

### Distribución de Grupos Experimentales

ACTIVIDAD	METODO	SUSTANCIA	GRUPO	DOSIS			
G E N O T O X I C A	E N S A Y O	NaCl 0.9% (control -)	I ♂ 4 ratas	20 ml/kg p.c.			
			II ♀ 4 ratas	20 ml/kg p.c.			
	C O M E T A	S	Ciclofosfamida sp. (control +)	I ♂ 4 ratas	50 mg/Kg p.c.		
				II ♀ 4 ratas	50 mg/Kg p.c.		
				O	<i>Bixa Orellana</i> - Hojas	I ♂ 4 ratas	1000 mg/kg p.c.
						II ♀ 4 ratas	1000 mg/kg p.c.
		III ♂ 4 ratas	2000 mg/kg p.c.				
		IV ♀ 4 ratas	2000 mg/kg p.c.				
		C O M E T A	C	<i>Annona muricata</i> - Hojas	I ♂ 4 ratas	1000 mg/kg p.c.	
					II ♀ 4 ratas	1000 mg/kg p.c.	
	III ♂ 4 ratas				2000 mg/kg p.c.		
	IV ♀ 4 ratas				2000 mg/kg p.c.		
	C O M E T A	E T A	<i>Croton lechleri</i> - Látex	I ♂ 4 ratas	1000 mg/kg p.c.		
				II ♀ 4 ratas	1000 mg/kg p.c.		
				III ♂ 4 ratas	2000 mg/kg p.c.		
				IV ♀ 4 ratas	2000 mg/kg p.c.		

## 1.4 POBLACIÓN Y MUESTRA

### 1.4.1 Población Vegetal

Especies vegetales de *Croton lechleri*, *Bixa orellana*, de la zona reservada Allpahuayo Mishana – IIAP, Km. 26 de la carretera Iquitos – Nauta (ANEXO N° 09 – Foto N° 01 y 02), y la especie *Annona muricata* del Jardín Botánico del IMET-EsSALUD, sito en Pasaje San Lorenzo # 205, Iquitos, respectivamente. (ANEXO N° 10 – Foto N° 01 y 02)

### 1.4.2 Muestra Vegetal

Se empleo 500 ml de látex de *Croton lechleri*, dos kilos de hojas de *Bixa orellana* y *Annona muricata* que fueron recolectadas de los sitios mencionados

anteriormente y liofilizados en el Laboratorio de Fitoquímica del IMET - EsSALUD, con sede en la ciudad de Iquitos.

**Criterios de inclusión para las hojas y látex**

- Látex fresco en buen estado y libre de residuos
- Hojas frescas en buen estado.

**Criterios de exclusión para las hojas y látex**

- Látex contaminado con residuos y otros.
- Hojas secas y parasitadas

**1.4.3 Población Animal**

Para el estudio experimental se utilizó ratas albinas de ambos sexos de la especie *Rattus norvegicus* cepa Holtzmann, con un peso promedio de 140 – 200 g de 6 – 8 semanas de edad, provenientes del Centro Nacional de Producción de Biológicos del Instituto Nacional de Salud, con sede en la ciudad de Lima. (ANEXO N° 11 – Foto N° 01)

**1.4.4 Muestra Animal**

Se utilizó un promedio de 65 ratas albinas, seleccionados al azar y teniendo en cuenta los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

**Criterios de inclusión**

- Ratas albinas de sexo machos y con peso corporal de de 150 – 200 g, sanos.
- Ratas albinas de sexo hembras y con peso corporal de de 140 – 180 g. sanas.

**Criterios de exclusión**

- Ratas albinas que no tengan el peso corporal establecido.
- Ratas albinas que muestren signos evidentes de enfermedad.
- Ratas que hayan sido utilizados en evaluaciones anteriores.

## 1.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 1.5.1.- Selección y Recolección de las muestras vegetales

Se recolecto de la zona reservada Allpahuayo Mishana – IIAP, Km. 26 de la carretera Iquitos – Nauta, Jardín Botánico del IMET-EsSalud, sito en Pasaje San Lorenzo # 205, que está ubicado en la ciudad de Iquitos, capital del Departamento de Loreto, a una altura de 116 msnm, latitud sur de 03° 45' 18'' y longitud oeste de 73° 14' 00'' aproximadamente, en una zona de vida considerada Bosque Húmedo Tropical, con terreno de tipo franco arenoso, ligeramente ácido y buen contenido de materia orgánica. Presenta una temperatura media anual de 26° C y una precipitación pluvial de 2,727 mm al año.

Para la selección de las muestras vegetales se consideró los siguientes factores:

- Edad de la planta.
- Estado vegetativo.
- Temporada de recolección.

Para la identificación se utilizará como patrones de comparación las plantas herborizadas del Herbarium Amazonense (AMAZ) de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. (ANEXO N° 12)

### 1.5.2.- Obtención de los Extractos Acuosa Liofilizados y el Látex liofilizado

- **Selección de materia prima**
  - ✓ Serán seleccionadas las partes vegetales y látex (hojas y resina) en buen estado de conservación.
- **Lavado y filtrado de materia prima**
  - ✓ Las partes vegetales se sometieron a la acción de un chorro continuo de agua para despojarlos de contaminantes.
  - ✓ El látex se filtró para desechar contaminantes o residuos.

- **Obtención del extracto acuoso:**

*Hojas:* Realizar la cocción de las hojas con agua, en proporción 1:20, a temperatura entre 60° a 70°C, durante 2 a 3 horas; luego dejar enfriar al medio ambiente, posteriormente filtrar con algodón, dejar 72 horas en reposo bajo refrigeración, con la finalidad de que las partículas pesadas y extrañas se sedimenten. Luego de transcurrido este tiempo para ambos preparados, se procederá a filtrar con papel de filtro, para luego concentrar por cocción a 60-70 °C, hasta obtener un volumen aproximadamente a 1 litro y finalmente congelarlo.

- **Obtención del látex Liofilizado:**

*Látex Liofilizado:* se filtró el látex obtenidos de los cortés en el arbusto de *Croton lechleri*, luego se congelo, liofilizo y almacenó.

- **Congelación del extracto acuoso:** se congeló a -20°C, por más de 24 ó 48 horas, para obtener el extracto al estado sólido.

- **Liofilización del extracto acuoso:** Se utilizó un liofilizador de 4.5 Lt., el proceso consistirá en deshidratar el extracto acuoso congelado a una temperatura y presión de vapor bajo (-40°C y  $1.33 \times 10^{-3}$  MBARR) mediante sublimación, durante 72 horas.

- **Pesado, envasado y rotulado del extracto liofilizado:** Se llevó a cabo en una balanza analítica y rotular la fecha de almacenamiento.

- **Almacenado:** Se almacenó en un ambiente seco a temperatura menor de 25°C, en frasco con cierre hermético y alejado de la luz.

### **1.5.3.- Preparación de los Extractos Liofilizados a Administrar**

La preparación de los extractos acuosos liofilizados de *Bixa orellana* y *Anona muricata* y el látex liofilizado de *Croton lechleri*, se empleó como solvente solución salina al 0.9% se determinó el factor de volumen y la concentración según las dosis a ensayar, haciendo uso de una tabla de dosificación (ANEXO N° 02). Luego se determinó el peso corporal promedio de los animales según los grupos experimentales y proceder a realizar el cálculo para cada dosis (ANEXO N° 03)

### **1.5.4.- Etapa de acondicionamiento, aclimatación y Sistema de Identificación de los Animales**

- **Etapa de acondicionamiento y aclimatación:** Los animales se sometieron a condiciones de aclimatación y acondicionamiento por 7 días, con la finalidad que las ratas albinas se adapten a su entorno ambiental; además durante este periodo estarán bajo observación permanente. Los animales que presenten alguna alteración funcional serán rechazados.
- **Sistema de identificación (Marcaje/Pesaje):** Las ratas serán marcadas con picrato de sodio, sobre determinadas áreas del cuerpo, posteriormente proceder al pesado de los animales en una balanza digital, dicha marca y peso serán anotados en las fichas de recolección de datos.

### **1.5.5.- Evaluación de la Actividad Genotóxica**

#### **1.5.5.1 Tratamientos de los Grupos experimentales**

Los animales empleados en el ensayo fueron adultos jóvenes y sanos, que se mantuvieron 7 días en las condiciones de laboratorio. Los

mismos que se repartieron al azar entre los lotes tratados y los de control según el criterio de inclusión, luego se asignaron a cada animal un número y una marca para su identificación.

### Tratamientos de los Grupos experimentales

SUSTANCIA	GRUPO	DOSIS	Días Admin.
NaCl 0.9% (control -)	I ♂	20 ml/kg p.c.	5 V.O
	II ♀	20 ml/kg p.c.	5 V.O
Ciclofosfamida sp. (control +)	I ♂	50 mg/Kg p.c.	5 I.P
	II ♀	50 mg/Kg p.c.	5 I.P
<i>Bixa Orellana</i> - Hojas	I ♂	1000 mg/kg p.c.	5 V.O
	II ♀	1000 mg/kg p.c.	5 V.O
	III ♂	2000 mg/kg p.c.	5 V.O
	IV ♀	2000 mg/kg p.c.	5 V.O
<i>Annona muricata</i> - Hojas	I ♂	1000 mg/kg p.c.	5 V.O
	II ♀	1000 mg/kg p.c.	5 V.O
	III ♂	2000 mg/kg p.c.	5 V.O
	IV ♀	2000 mg/kg p.c.	5 V.O
<i>Croton lechleri</i> - Látex	I ♂	1000 mg/kg p.c.	5 V.O
	II ♀	1000 mg/kg p.c.	5 V.O
	III ♂	2000 mg/kg p.c.	5 V.O
	IV ♀	2000 mg/kg p.c.	5 V.O

La vía de administración que se utilizó fue la vía oral, por ser la propuesta para el uso humano, esta se realizará por intubación gástrica mediante una cánula curva metálica, previo ayuno nocturno de 12 horas.

#### ✓ Grupo control negativo – NaCl 0.9%

Se realizó el control basal de los animales con previo ayuno de 12 horas, 24 horas después se administró la solución salina durante 5 días por vía oral con cánula intragástrica curva metálica; 24 horas después de la última administración se realizó la toma de muestra sanguínea y posterior evaluación mediante el ensayo cometa.

### ✓ **Grupo control positivo – Ciclofosfamida 50mg/Kg**

Se realizó el control basal de los animales con previo ayuno de 12 horas, 24 horas después se administró Ciclofosfamida a dosis de 50 mg/Kg. durante 5 días por vía intraperitoneal con jeringa de 1ml. Y aguja N°25 x 5/8"; 24 horas después de la última administración se realizó la toma de muestra y posterior evaluación mediante el ensayo cometa.

### ✓ **Administración de los extractos**

La administración de los extractos se realizó en las primeras horas de la mañana, con un previo ayuno de 12 horas para todos los animales. Dicha administración fue durante 5 días por vía oral empleando una cánula intragástrica curva metálica. Luego se procedió a dar alimento y agua los animales ya administrados. 24 horas después de la última administración se realizó la toma de muestra para la posterior evaluación mediante el ensayo cometa.

### ✓ **Toma de Muestra**

Se realizó la toma de muestra sanguínea por punción cardíaca con una jeringa de 1ml y aguja N° 23x1"; se procedió de la siguiente manera:

- Se sujetó al animal sobre una base firme, quedando en posición de cúbito dorsal en la palma de la mano del manipulador.
- Luego se desinfectó con alcohol de 70° la zona del tórax y se determinó el punto máximo de latido del corazón; y realizó la punción cardíaca. Se obtendrá 600µL. aproximadamente.
- La muestra de sangre obtenida se colocó en un microtubo conteniendo anticoagulante (proporción 1:10(v/v)).

**1.5.5.2 Prueba de genotoxicidad - Electroforesis de células individuales o Ensayo Cometa (Singh *et al.* 1988).(ANEXO N° 04).**

✓ **Soluciones de Trabajo**

Las soluciones de trabajo se prepararon en el momento de realizar la evaluación; con la finalidad de obtener resultados óptimos, y son los siguientes:

- Solución Salina de Kenny pH 7.62
- Solución de Lisis pH 10
- Solución alcalina pH 13.7
- Buffer de neutralización pH 7.53
- Solución de fijación
- Soluciones de tinción: A y B
- Solución Stop
- Buffer PBS 10X
- Agarosa de bajo punto de fusión 1%
- Agarosa de punto de fusión normal 3%

✓ **Recolección de la muestra:**

- Se recolecto 500ul de sangre mediante el método de punción cardiaca antes mencionada.

✓ **Procesamiento de la muestra:**

- Método de centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll: Añadir Ficoll en un vial estéril el mismo volumen de la muestra



sanguínea obtenida. Posteriormente agregue la muestra sanguínea en la superficie de la solución de Ficoll. Para este procedimiento se debe evitar lisis celular. Centrifugar a 2000rpm por 10 minutos a 28°C.

- Se Recuperó con una micropipeta el halo que contiene los linfocitos que queda entre la solución de Ficoll y lo restante de la sangre.
- Añada los linfocitos a un microtubo y agregar Buffer Fosfato salino (PBS1X), agitar suavemente y centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos, luego desechar el sobrenadante. Repetir este paso 2 veces
- Resuspender las células centrifugadas en PBS 1X y realizar la prueba de viabilidad. El resuspendido será la muestra final.

✓ **Prueba de viabilidad**

- Colocar 20ul de azul de Tripan 0.4% en 20 ul de la solución recuperada. Observar en el microscopio, en una camara de New Bawer a 40X.

✓ **Preparación de las láminas y gel de agarosa:**

- En un microtubo añadir 378 µl de agarosa LMP a 37°C y 42 µl de células (linfocitos), mezcle rápidamente con micropipeta. Ponga tres gotas de 70 µl en un portaobjeto con gel de agarosa de punto de fusión normal previamente codificado, cubra cada una con un cubreobjeto.

✓ **Lisis:**

- Retire los cubreobjetos y ponga las láminas en un recipiente horizontal.
- Posteriormente se sumergirán las láminas en la solución de lisis a 4°C durante 12 horas; al término de la lisis, se lavará las láminas con abundante agua desionizada fría para luego dejarlas secar por 30 minutos.

✓ **Electroforesis:**

- Añada buffer de electroforesis a la cubeta hasta el borde del recipiente y déjelo enfriar en el refrigerador a 4°C
- Ponga las láminas suavemente en la cubeta y cúbralas con buffer hasta justo la superficie
- Incube 20 min
- Aplique 30mV, 240 mili Amperes durante 20 min
- Detenga la electroforesis, retire las láminas y póngalas en un envase limpio
- Lavar las láminas durante 5 min.

✓ **Neutralización:**

- Las láminas se sumergieron en la solución de neutralización durante 10 minutos, dicho procedimiento se realizó en un agitador horizontal a 60 r.p.m., con la finalidad de homogenizar la neutralización en todo el campo de los geles de agarosa. Transcurrido el tiempo, las láminas se lavarán con agua desionizada fría en las mismas condiciones que fueron neutralizadas.

✓ **Fijación:**

- Fije 10 min con solución de fijación
- Enjuague 2-3 veces con agua destilada
- Deje secando al aire.

✓ **Tinción:**

- Se rehidrató con PBS las láminas durante 10 min
- Añada la solución A a la B rápido, agite vigorosamente y vierta sobre las láminas. Las soluciones A y B tienen que ser preparadas en el momento del ensayo.
- La tinción debe ser realizada en oscuridad durante 40 minutos aproximadamente, agitando suavemente.
- Lave 2-3 veces con agua destilada
- Detenga la reacción con solución STOP durante 10 min
- Lave 2-3 veces con agua destilada
- Seque al aire
- Guarde las láminas
- Recuento del daño inducido
- Observe las láminas en el microscopio con un aumento de 40x y clasifique 100 células por gel de acuerdo al **Anexo N° 05**

✓ **Sacrificio de los animales**

Al finalizar el periodo de evaluación se sacrificarán los animales por el método de dislocación cervical, teniendo en cuenta los principios éticos de experimentación en animales <sup>(63, 64)</sup>

## **1.6 MATERIALES, EQUIPOS Y DROGAS**

### **1.6.1 Materiales**

#### **1.6.1.1 Material Vegetal**

Extractos acuosos liofilizados de *Bixa Orellana*, *Anona muricata* y látex liofilizado de *Croton lechleri*

#### **1.6.1.2 Material Biológico**

Ratas albinas *Rattus norvegicus*, cepa Holtzmann, sexo macho y hembra.

#### **1.6.1.3 Material de Laboratorio**

Cánula intragástrica.

Matraz de Erlen Meyer de 25 ml, 50 ml y 100 ml, 500 ml.

Agujas descartables N° 23

Jeringas descartables 1 ml.

Vasos de precipitado 25 ml, 50 ml y 100 ml

Probetas de 25 ml, 50 ml y 100 ml, 500 ml.

Placas petri

Termómetro.

Guantes quirúrgicos N° 6 ½

Pinzas quirúrgicas de punta roma y curva.

Algodón hidrófilo.

Espátula mediana.

Marcador de vidrio.

Mascarillas descartables.

Pipeta Pasteur

Frascos ambar

Beakers

Cubreobjetos

Marcador de cristalería

Micropipetas de 1-10, 10-100, 100-1000  $\mu$ L.  
Puntas para micropipetas de 1-10, 10-100, 100-1000  $\mu$ L.  
Laminas portaobjeto  
Laminas cubreobjetos  
Cámara de New Bawer  
Gradilla para tubos  
Portalaminas  
Picetas  
Viales 500  $\mu$ l  
Papel toalla.  
Embudos.  
Papel filtro  
Mortero y pilón  
Soporte Universal  
Cernidor  
Recipientes de plásticos  
Ollas medianas  
Bandejas plásticas con tapa de malla metálica.  
Viruta.  
Biberones  
Papel aluminio

### **1.6.2 Equipos**

Liofilizador: Freezer Dry sistem/ Freezone 4,5 L LABCONCO  
Congeladora.  
Baño maría. Selecta Precistern.  
Estufa – Memmert UE 400  
Potenciometro o pH-metro Orion 250 A+  
Agitador magnetico – Thermolyne, Nouva II, Stir Plate  
Desionizador de agua – H.W. Kessel  
Cocina eléctrica. – Teba Toes  
Balanza analítica. Mettler Toledo AG 204

Balanza digital - Ohaus® Compact Portable Balance  
Cámara fotográfica (Digital). Sonny 6mgp  
Equipo de electroforesis horizontal  
Autoclave – Linux Intermedical Trade  
Fuente de electroforesis – consort E143  
Agitador horizontal – Heidolph Unimax 1010  
Microscopio con cámara incorporada – Nikon Eclipse E 200  
Microcentrifuga – Jovan A14  
Refrigeradora Friolux

### **1.6.3 Drogas e Insumos**

Anticoagulante Wintrobe  
Fosfato de sodio  
Cloruro de sodio 0.9%  
Fosfato de potasio 0.7 mM  
Bicarbonato de sodio 2 mM  
Cloruro de potasio 9 mM  
Alcohol al 90%  
Peroxido de hidrogeno 1% - Erza  
Cloruro de sodio 0.4 y 2.5 M  
Ácido tricloroacetico 15% - Riedel-De Haën, USP XXI  
Agarosa de Bajo punto de Fusión 1%  
Agarosa punto de Fusión normal 3%  
Glicerol 5%  
Nitrato de plata 0.2%  
Dimetil sulfóxido 10%  
Carbonato de sodio 5%  
Ácido tungstosilicico 0.5%  
Azul de tripam - Sigma  
TRIS 10 y 0.4 mM  
Sulfato de Zinc 5%

Ficoll Histopaque – Plus  
Buffer fosfato salino PBS  
Nitrato de amonio 0.2%  
Ácido acético 1% - Panreac  
Formaldehído 0.15%  
Hidróxido de sodio 300 mM  
Triton X-100 1%  
EDTA 1 y 100 mM  
Picrato de sodio.  
Solución salina 0.9%.

## 1.7 TECNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se empleó la observación directa, medición y registro de las células observadas en cada animal integrante de la muestra. Los datos obtenidos serán registrados en fichas de recolección de datos (**Anexo 05, 06 y 07**), teniendo en cuenta el método, sustancia, nivel de dosis ensayada y grado de daño ocasionado.

## 1.8 PROCEDIMIENTO DE RECOLECCION DE DATOS

### Control de peso corporal

Los animales que fueron marcados y pesados se anotaron en las fichas marca y peso de los animales, para la identificación de cada uno de ellos por cada grupo experimental. El peso corporal se registró al inicio del y al final del ensayo.

### Obtención de las unidades arbitrarias

La clasificación de daño por medio de unidades arbitrarias se encuentra en un intervalo de 0 a 400, siendo 0 el menor daño y 400 el mayor daño. Si se obtuvieran 100 células en el nivel 0, la multiplicación consiste en  $100 \text{ células} \times 0$ , dando un total de 0 UA, lo cual corresponde a células intactas, sin daño. Mientras que un valor de 400 UA, corresponde a células completamente dañadas, proviniendo de la multiplicación de  $100 \text{ células} \times \text{nivel } 4$ .<sup>(62)</sup>

- \* Grado 0: Células, Sin daño, sin cola
- \* Grado 1: Células, Cola menor que la cabeza
- \* Grado 2: Células, Cola igual a la cabeza
- \* Grado 3: Células, cola mayor a la cabeza
- \* Grado 4: Células en apoptosis



## 1.9 ANALISIS DE DATOS

- Los resultados obtenidos en el ensayo, serán expresados en términos de valores resultantes, según grupo de estudio.
- Se calculará la media y desviación estándar, que serán presentados mediante tablas y gráficos.
- Los datos serán procesados mediante un análisis de varianza de una vía con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .
- Todo el procedimiento estadístico se realizará mediante el programa MICROSTAT

## 1.10 PROTECCIÓN DE LOS DERECHOS DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Las investigaciones biomédicas tienen una responsabilidad ética de salvaguardar la salud y el bienestar de los animales de experimentación, preservándolos de cualquier daño, dolor y sufrimiento innecesario antes, durante y después del periodo de estudio sin contar que además para el científico, el término de “buen uso”, indica la necesidad de poder contar con animales homogéneos en cuanto a genética, salud, edad, alimentación, peso, etc. para que los resultados puedan ser confiables.<sup>(63)</sup>

Para este estudio se seguirán las líneas que marca el Comité para la Investigación y la Ética de la IASP 86 en lo concerniente a los aspectos éticos de los experimentos que implican dolor o sufrimiento a los animales.<sup>(64)</sup>

Las consideraciones éticas que se tendrá en cuenta serán:

- Los animales de experimentación serán expuestos al mínimo dolor necesario para alcanzar los objetivos de la investigación.
- La duración del experimento será la más corta posible.
- Se utilizarán pequeños grupos de animales, lo necesario para demostrar o rechazar la hipótesis de trabajo.

---

---

# CAPITULO

4
---

## 1. RESULTADOS

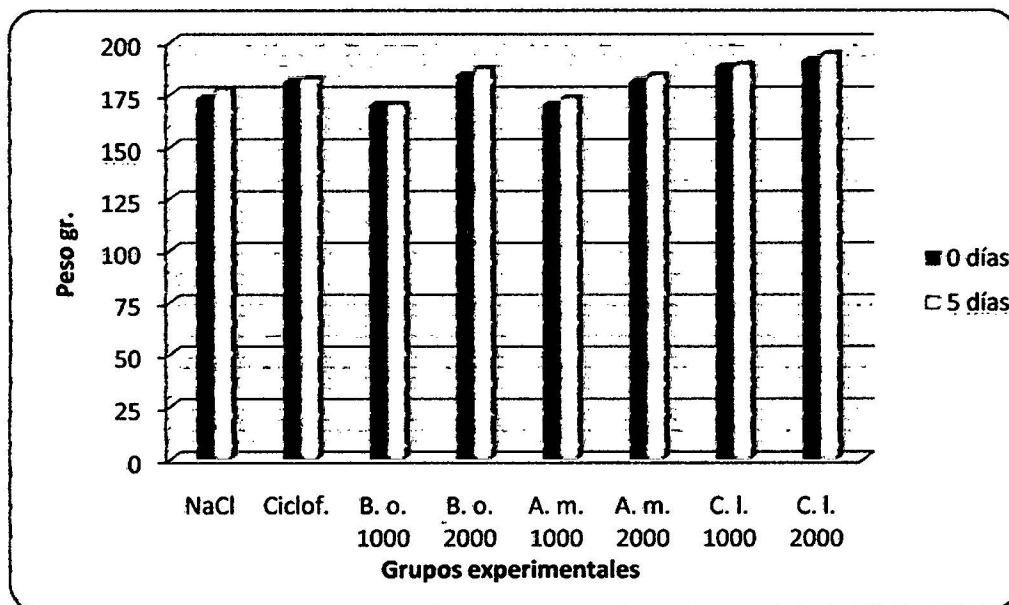
### ➤ Peso Corporal

Los Gráficos N° 01 y 02 muestran el comportamiento del peso corporal en ratas albinas machos y hembras respectivamente, se observa que la tendencia al aumento de peso fue una constante durante el estudio en todos los grupos de tratamiento y en ambos sexos.

Al realizar el análisis de las medias no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en ambos sexos y en los grupos tratados cuando se compararon con los datos basales. Los resultados de la media aritmética y la desviación estándar en ratas albinas machos y hembras se presentan en el ANEXO N° 13 respectivamente.

Gráfico N° 01

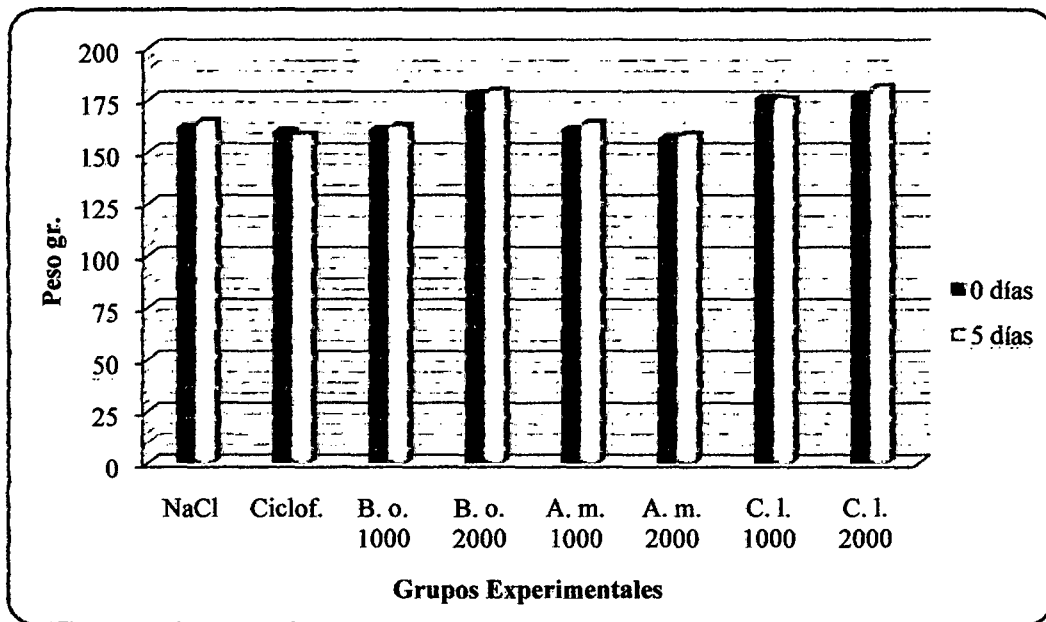
Variaciones en el peso corporal en ratas albinas machos, por grupo de tratamiento, durante el ensayo.



NaCl : Cloruro de Sodio 0.9% (Control Negativo)  
Ciclof. : Ciclofosfamida 50 mg/kg (Control Positivo)  
B. o. : *Bixa orellana* 1000 y 2000 mg/kg  
A. m. : *Annona muricata* 1000 y 2000 mg/kg  
C. l. : *Croton lechleri* 1000 y 2000 mg/kg

Gráfico N° 02

Variaciones en el peso corporal en ratas albinas hembras, por grupo de tratamiento, durante el ensayo.



- NaCl : Cloruro de Sodio 0.9% (Control Negativo)
- Ciclof. : Ciclofosfamida 50 mg/kg (Control Positivo)
- B. o. : *Bixa orellana* 1000 y 2000 mg/kg
- A. m. : *Annona muricata* 1000 y 2000 mg/kg
- C. l. : *Croton lechleri* 1000 y 2000 mg/kg

➤ **UNIDADES ARBITRARIAS**

Los resultados obtenidos en el ensayo cometa mediante el método visual se muestran en la **Tabla N° 01**, la media aritmética y la desviación estándar de las unidades arbitrarias para el sexo macho a las dosis ensayadas. En el análisis estadístico de las medias se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los grupos tratados con Ciclofosfamida, los extractos acuosos liofilizado de *Bixa Orellana*, *Annona muricata* y látex liofilizado de *Croton lechleri* respecto a los resultados basales.

**Tabla N° 01**

**Promedio de Unidades Arbitrarias (UA) en ratas albinas machos por grupo de tratamiento**

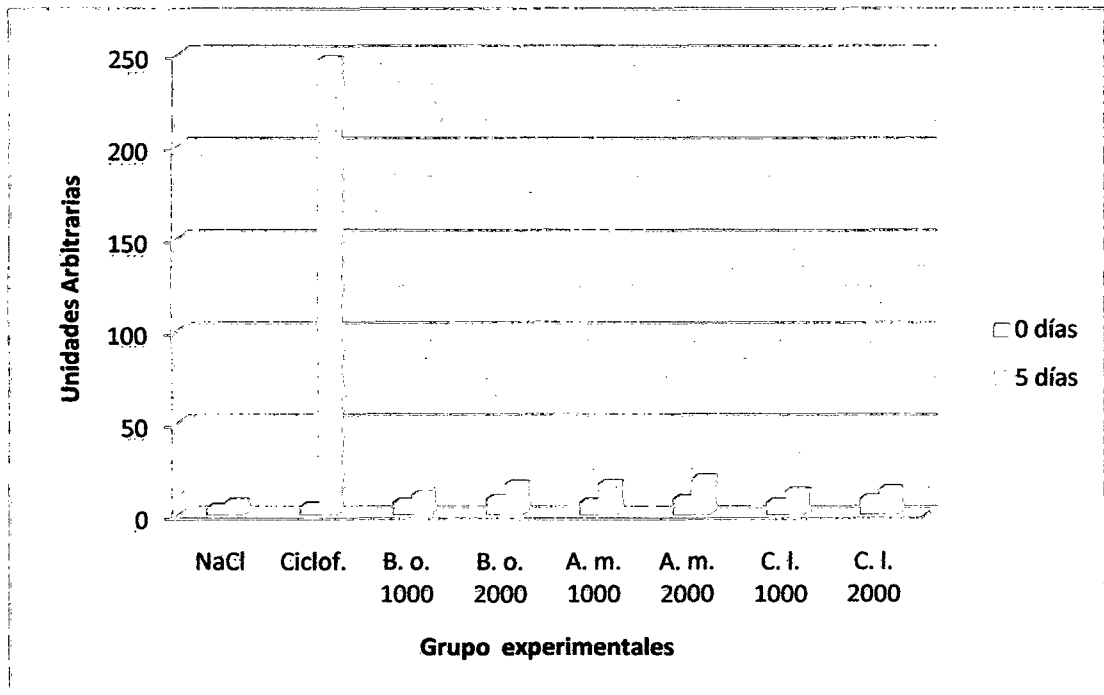
<b>GRUPOS EXPERIMENTALES</b>	<b>BASAL X ± SD</b>	<b>TRATADO X ± SD</b>
NaCl 0,9%	4 ± 2,36	7 ± 4,24
<b>Ciclofosfamida 50 mg</b>	5 ± 3,46	*247 ± 26,72
<b><i>Bixa orellana</i> 1000 mg</b>	7 ± 2,22	*11 ± 4,35
<b><i>Bixa orellana</i> 2000 mg</b>	9 ± 0,96	*17 ± 3,86
<b><i>Annona muricata</i> 1000 mg</b>	7 ± 2,22	*17 ± 1,26
<b><i>Annona muricata</i> 2000 mg</b>	9 ± 0,96	*20 ± 1,41
<b><i>Croton lechleri</i> 1000 mg</b>	7 ± 2,22	*13 ± 2,63
<b><i>Croton lechleri</i> 2000 mg</b>	9 ± 0,96	*14 ± 3,86

\* $p < 0.05$ : Valores expresados en promedios ± desviación estándar (X ± SD)

Las unidades arbitrarias para el sexo macho, se representan en el **Gráfico N° 03**, los valores basales de los grupos, fueron comparados con los valores medios de los grupos en tratamiento, como se aprecia en el gráfico.

**Gráfico N° 03**

**Promedio de Unidades Arbitrarias (UA) en ratas albinas machos por grupo de tratamiento**



- NaCl : Cloruro de Sodio 0.9% (Control Negativo)
- Ciclof. : Ciclofosfamida 50 mg/kg (Control Positivo)
- B. o. : *Bixa orellana* 1000 y 2000 mg/kg
- A. m. : *Annona muricata* 1000 y 2000 mg/kg
- C. l. : *Croton lechleri* 1000 y 2000 mg/kg

En la **Tabla N° 02**, se muestran la media aritmética y la desviación estándar de los valores de las unidades arbitrarias para cada grupo en las ratas albinas hembras. En el análisis estadístico de este sexo se muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los grupos tratados con Ciclofosfamida, los extractos acuosos liofilizado de *Bixa Orellana*, *Annona muricata* y látex liofilizado de *Croton lechleri* la dosis de 2000 mg/kg respecto a los resultados basales.

**Tabla N° 02**

**Promedio de Unidades Arbitrarias (UA) en ratas albinas hembras por grupo de tratamiento**

<b>GRUPOS EXPERIMENTALES</b>	<b>BASAL X ± SD</b>	<b>TRATADO X ± SD</b>
<b>NaCl 0,9%</b>	5 ± 4,03	8 ± 1,83
<b>Ciclofosfamida 50 mg</b>	6 ± 2,99	* 289 ± 18,22
<b><i>Bixa orellana</i> 1000 mg</b>	8 ± 1,83	* 17 ± 1,63
<b><i>Bixa orellana</i> 2000 mg</b>	7 ± 3,30	* 16 ± 4,35
<b><i>Annona muricata</i> 1000 mg</b>	8 ± 1,83	* 20 ± 3,56
<b><i>Annona muricata</i> 2000 mg</b>	7 ± 3,30	* 20 ± 3,10
<b><i>Croton lechleri</i> 1000 mg</b>	8 ± 1,83	11 ± 3,70
<b><i>Croton lechleri</i> 2000 mg</b>	7 ± 3,30	* 16 ± 1,26

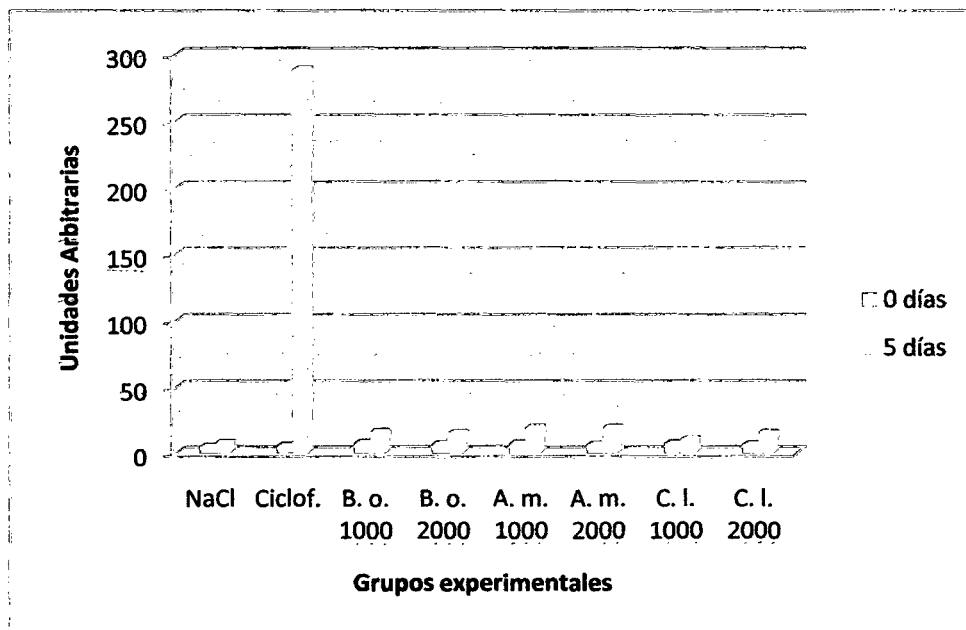
\* $p < 0.05$ : Valores expresados en promedios ± desviación estándar (X ± SD)



Las unidades arbitrarias para el sexo hembra, se representan en el **Grafico N° 04**, los valores basales de los grupos, fueron comparados con los valores medios de los grupos en tratamiento, como se aprecia en el gráfico, se observa que el látex liofilizado de *Croton lechleri* a dosis de 1000 mg/kg no es estadísticamente significativa y el valor más elevado en el grupo de ratas albinas hembras es 20 unidades arbitrarias para los grupos de *Annona muricata* a dosis de 1000 y 2000 mg/kg.

**Gráfico N° 04**

**Promedio de Unidades Arbitrarias (UA) en ratas albinas hembras por grupo de tratamiento**



- NaCl : Cloruro de Sodio 0.9% (Control Negativo)
- Ciclof. : Ciclofosfamida 50 mg/kg (Control Positivo)
- B. o. : *Bixa orellana* 1000 y 2000 mg/kg
- A. m. : *Annona muricata* 1000 y 2000 mg/kg
- C. l. : *Croton lechleri* 1000 y 2000 mg/kg

## 2. DISCUSIÓN

El presente estudio muestra los resultados de la evaluación genotóxica en ratas albinas cepa holtzmann, realizada a tres especies vegetales de gran uso tradicional en nuestro país como son: *Bixa orellana* “Achiote”, *Annona muricata* “Guanábana” y *Croton lechleri* “Sangre de grado”

En el presente estudio la variación del peso corporal, no se vio afectada por la administración de las sustancias en ensayo, siendo su incremento una constante en los diferentes grupos experimentales y en ambos sexos según se muestra en los Gráficos N° 01 y 02, lo cual no se encontró diferencias estadísticamente significativas.

Según; *Mosberg AT, Hayes WA (1989)*. Los resultados obtenidos referentes al peso corporal, poseen una gran sensibilidad para detectar alteraciones, debidas a productos químicos de baja toxicidad<sup>(66)</sup>, pues está involucrado en una serie de cambios orgánicos en diferentes etapas de la vida, es por ello que una variación significativa en su comportamiento sugiere que algo no funciona correctamente.

Según los resultados obtenidos bajo nuestras condiciones experimentales, se muestran en la **Tabla N° 01**, que en todos los casos se encontró diferencias estadísticamente significativas, presentando como máximo valor de unidades arbitrarias la dosis de 2000 mg/Kg., con el extracto acuoso liofilizado de *Annona muricata* con  $20 \pm 1,41$ , seguido de *Bixa orellana* dosis de 2000 mg con  $17 \pm 3,86$  y nuevamente *Annona muricata* dosis de 1000 con  $17 \pm 1,26$ . Sin embargo, al ser comparados con los controles positivos no reflejaron valores de Unidades Arbitrarias que hagan atribuir una elevada genotoxicidad.

**Gómez R. & Collins et al. (2004)** indican que 400 Unidades Arbitrarias representan células completamente dañadas. En cuanto a la Ciclofosfamida tales resultados se asemejan con los obtenidos con el uso de este mutágeno en ensayos realizados con ratas *SD* y ratones *OF-1*.<sup>(69, 70, 71)</sup> dados por resultados inducidos por sustancias altamente mutagénicas como la Ciclofosfamida, ya que sus metabolitos logran interactuar con las células de Sertoli y directamente con las células germinales y células somáticas, disminuyendo la producción y maduración de estas.<sup>(72, 70)</sup>

Los resultados obtenidos en grupo experimental de ratas albinas hembras se asemeja a los resultados del grupo de las ratas machos con ligeras variaciones como se muestra en el **Grafico N° 04**. Lo cual muestra que en ambos grupos hubo leve daño en las células.

**Dixon et al., (2002)**. Menciona, estas macro y microlesiones en células de mamíferos, pueden variar de acuerdo a los cambios estacionales y a las características fisiológicas de los organismos. Factores como la edad, crecimiento y estado hormonal.<sup>(73)</sup>

En el presente ensayo la ciclofosfamida fue usada como control positivo obteniendo valores de unidades arbitrarias entre 245 y 280 lo cual demuestra que es un compuesto mutagénico ideal para ensayos pre-clínicos experimentales.

**Daniel F. Arencibia et al. (2003)** Obtuvieron valores similares en sus grupos controles y destacan la sensibilidad de este biomodelo experimental al daño inducido por la Ciclofosfamida, las unidades arbitrarias se encuentran en el rango de 159 - 232, destacando de forma veraz la actividad citotóxica y genotóxica de este clastógeno químico<sup>(67, 68)</sup>

### 3. CONCLUSIONES

- ✓ Los extractos acuosos liofilizados de *Bixa orellana*, *Annona muricata* y látex liofilizado de *Croton lechleri*, no son genotóxicos en linfocitos de ratas albinas cepa Holtzmann, mediante el método visual del Ensayo Cometa.
- ✓ El látex liofilizado de *Croton lechleri* dosis de 1000 y 2000 mg/Kg<sup>-1</sup> administradas por vía oral, en ratas albinas cepa holtzmann de ambos sexos mediante método visual del Ensayo Cometa, no evidencio genotoxicidad.
- ✓ Los extracto acuosos liofilizados de *Bixa orellana* y *Annona muricata* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg<sup>-1</sup> administradas por vía oral, en ratas albinas cepa holtzmann de ambos sexos mediante método visual del Ensayo Cometa no presenta actividad genotóxica.
- ✓ Al Comparar los extractos acuosos liofilizados de *Bixa orellana*, *Annona muricata* y látex liofilizado de *Croton lechleri* con ciclofosfamida mediante el método visual del ensayo cometa en linfocitos de ratas albinas cepa holtzmann, se observo que no poseen actividad genotóxica.

#### **4. RECOMENDACIONES**

- Realizar estudios más exhaustivos de genotoxicidad como PCR para determinar los pares de bases donde ocurre la reacción o daños de las sustancias estudiadas para afirmar su total inocuidad.
- Complementar el método visual del ensayo cometa con programas computarizados de un alto nivel de confianza como el Comet Assay y otros.
- Evitar el consumo indiscriminado de productos naturales que no dispongan de mayor información farmacológica y toxicológica.

---

---

# CAPITULO

**5**

## 1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Brugés, Keile, Reguero Reza, María Teresa. Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. Revista Colombiana de Biotecnología. [Artículo en internet]. [Citado 01 Julio 2007]. Disponible en: <http://www.articlearchives.com/pharmaceuticals-biotechnology/pharmaceuticals/1529734-1.html>
- 2.- Angel Vizoso Parra; Arilia García López; Alberto Ramos Ruiz; Ausencia de Potencial Genotóxico in vitro e in vivo de un Extracto Fluido de *Piper Auritum* H.K.B.; Rev Cubana Plant Med [artículo en internet] 2006. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4\\_2\\_99/pla03299.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4_2_99/pla03299.pdf)
- 3- Bowden R., Buckwalter M., McBride J., Johnson D., Murray B., O'Neill K. Tail profile: a more accurate system for analysing DNA damage. Mutation Research 2003; 537: 1-9.
- 4.- SIAMAZONIA. Sistema de Información de la Diversidad Biológica y Ambiental de la Amazonía Peruana. [Sede Web]\* Iquitos. 2006. *Corton lechleri* Muell Arg. [Acceso 12 de Agosto 2009] Disponible en: <http://www.siamazonia.org.pe/Archivos/Publicaciones/Amazonia/libros/28/28000008.htm#I51>
- 5.- Pieters L. 2004. The biologically active compounds of sangre de drago. Tradicional South American drug. Universiteit Antwerpen. Departament Farmaceutische Wetenschappen. Germany.
- 6.- Joyce C. 2007. Earthly Goods: Medicine-Hunting in the Rainforest. Little, Brown, & Company; New York, NY.
- 7.- Maxwell N. 2005. Witch Doctor's Apprentice, Hunting for Medicinal Plants in the Amazon, 3rd Edition, Citadel Press: New York, NY.

- 8.- Ubillas, R, Jolad RC, Kermnan MR, King SR, Sesin DF, Barret M, Stoddart CA, Flaster T, Kco J, Ayala F, Meza E, Castañel M, McJeekin D, Rozhov E, Tempesta MS, Barnard D, HuffmanJ, Smee D, Sidwell R, Joike K, Brazier A, Safrin S, Orlando R, Kenny PTM, Berova N, Nekanishi K.2004. SP-303, an antiviral oligomeric proantocyanidin form de latex of *Croton lechleri* (Sangre de Drago). *Phytomedicine*, 1: 77-106
- 9.- Pieters L, de Bruyne T, Claeys M, Vlietinck J. 2005. Isolation of the dihydrobenzofuran lignan form South American dragon's blood (*Croton* sp.) as an inhibitor of cell proliferation. *J. Nat. Prod.*, 56 (6): 899-906.
- 10.- Cai Y, Evans F, Roberts M, Phillipson JD, Zenk M, Gleba Y. 2003. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. *Phytochemistry*, 20: 2033- 2040.
- 11.- Sangre de grado [Sede Web]\* Lima: amazon-nutrition; 2007 [Acceso 03 de Setiembre del 2009]. Sangre de grado (*Croton lechleri*). Disponible en: <http://es.amazon-nutrition.com/sangre-de-grado.html>
- 12.- AVALOS DM. CABANILLAS ML. (1994). Estudio fitoquímico del látex de *Croton lechleri* "sangre de grado..y ensayo del efecto antibacteriano in vitro de su extracto hidroalcohólico. Tesis Bach. Farmacia Universidad Nacional de Trujillo - Perú.
- 13.- MÁLAGA GE. (1991). Efecto del Clorhidrato de Taspina Sobre la Curación de Úlcera Gástrica Inducida en Ratas. Tesis Bach. Biología. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima. Perú.
- 14.- Marcelo AJ, Meza EN. 1999. Propiedades biológicas de metabolitos secundarios de "SANGRE DE GRADO". En Marcelo AJ, Calderón C, Medina D, Valencia M, Pariona M & Meza EN. Desarrollando nuestra diversidad biocultural: "SANGRE DE GRADO" y el reto de su producción sustentable en el Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Fondo Editorial. Elsa N. Meza Editora. Lima (Perú). Pág.: 165-196



- 15.- Miller M, MacNaughton W, Zhang X, Thompson J, Charbonnet R, Bobrowski P, Lao J, Trentacosti AM, Sandoval M. 2000. Treatment of gastric ulcers and diarrhea with the Amazonian herbal medicine sangre de grado. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 279: G192-G200.
- 16.- Chen Z., Cai Y, Phillipson J. 2004. Studies on the anti-tumour, anti-bacterial and wound-healing properties of dragon's blood. *Planta Med.*, 60: 541-545.
- 17.- Risco E. 2000. Sangre de drago. Estudio sobre la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora. Tesis Doctoral. Unidad de Farmacología y Farmacognosia. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. España.
- 18.- HERSIL S.A. Peruanos Trabajando por la Salud. Laboratorios Industriales Farmacéuticos. [Sede Web]\* Lima. 2006. Sangre de Grado/*Corton lechleri Muell Arg.* [Acceso 17 de Agosto 2009] Disponible en: <http://www.hersil.com.pe/Cont3/pdf/sangre.pdf>
- 19.- García Barriga, 1992,II: 91-93; Neill, 1988; Pérez *et al.*, 1988; Killeen *et al.*, 1993: 297-299; Información Etnomédica y Etnobotánica de sangre de grado. Etnobotánica de la Amazonia Peruana. 1ra edición. Lima – Perú; Mario Vega Orcacitas. Pág. 81-82.
- 20.- Miguel Tang Tuesta. Producción de Plantas Amazónicas con propiedades cosméticas y/o medicinales y sus productos derivados en el ámbito de la Cordillera Escalera, con fines de consumo interno y exportación. Perú. Comisión Europea. 2007. Disponible en: <http://www.itdg.org.pe/bosques/documentos/chinchipe000002.pdf>
- 21.- Foods & Beverages [Sede web]\*. ccbolgroup 2008. [Acceso 04 de Setiembre 2009]. *Bixa orellana* L (Achiote): Disponible en: <http://ccbolgroup.com/achiote.html>
- 22.- Herbotecnia [Sede web]\*. Herbotecnia.com.ar 2004. [Acceso 04 de Setiembre 2009]. *Bixa orellana* L.: Disponible en: <http://www.herbotecnia.com.ar/aut-bixa.html>

- 23.- Li FE. Actividad biológica del extracto acuoso atomizado de hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) en animales de experimentación. Tesis para optar el grado Académico de Magíster. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina. Lima, Perú. 1999.
- 24.- Bernal HY, Correa QJE. Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello. Bogotá: PREVECAB; 1989.
- 25.- Biokosma [Sede web]\*. BOKOSMA. Un Compromiso con la Salud [Acceso 04 de Setiembre 2009]. *Bixa orellana*: Disponible en: [www.productosbiokosma.com.ar/monografias/urucum.doc](http://www.productosbiokosma.com.ar/monografias/urucum.doc)
- 26.- Morrison EYS, Smith-Richardson SS, West M, Brooks SEH, Pascoe MDK, Fletcher FRCS. Toxicity of the hyperlycaemic inducing extract of the Annatto (*Bixa Orellana*) in the dog. *W. J. Med.* 1987; 36: 99-102.
- 27.- Morrison, E.; Thompson, H.; Pascoe, K.; West, M.; Fletcher, C. Extraction of an hyperglycaemic principle from the annatto (*Bixa orellana*), a medicinal plant in the West Indies. *Trop Geogr Med*, v.43, n. 1-2, p. 184-188, 1991
- 28.- Rizzini, CT; WB Mors; RA Defilipps; N Alvares Pereira. 2000. Medicinal Plants of Brazil. Ed. Reference Publs. 501 pp. ISBN 0-917256-42-5
- 29.- Tseng C, Iwakami S, Mikajiri A, Shibuya M, Hanaoka F, Ebizuka Y, et al. Inhibition of in vitro prostaglandin and leucotriene biosyntheses by cinnamoyl-b-phenethylamine and n-acyldopamine derivates. *Chem Pharm Bul* 1992; 40:396-400.
- 30.- Otero, R.; Nuñez, V.; Barona, J.; Fonnegra, R.; Jimenez, S.L.; Osorio, R.G.; Saldarriaga, M.; Diaz, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest regioes of Colombia. Part III: Neutralization of the hemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *Journal Ethnopharmacol.*; v.73, n. 1-2, p. 233-241, 2000.

- 31.- Nish, W.A.; Whisman, B.A.; Goetz, D.W.; Ramirez, D.A.. Anaphylaxis to annatto dye: a case report. *Ann. Allergy*, v.66, n. 2.; 129-131, 1991
- 32.- Serrano G, Sandberg F. Actividad antiinflamatoria de *Bixa orellana*: Informe TRAMIL. Universidad de Uppsala, Uppsala, Suecia. TRAMIL III, La Habana, Cuba, MINSAP/enda-caribe.1988.
- 33.- Weniger, B.; Jiang, Y.; Oulad-Ali, A.; Italiano, L.; Beck, J.P. & Anton, R. Biological effects of bixin and *Bixa orellana* extracts on lymphoid cells in culture. *Planta Medica*, Stuttgart, v.59, n.7, p.680, 1993.
- 34.- Arroyo AJ, Li PV. Estudio farmacológico y toxicológico de la asociación de extractos atomizados de *Uncaria tomentosa* y *Bixa orellana* en animales de experimentación. Congreso de Plantas Medicinal de Chile 1999.
- 35.- Ríos Isern, F.; Nina Chora, E.; Villacrés Vallejo, J.; Nonato Ramírez, L.; 2007. Estudio Pre-Clínico de *Bixa orillan*. P. 46-48. Iquitos-Perú
- 36.- Arboretum-UNA [Sede web]\*. Arboretum – Alain Meyrat 2006. [Acceso 05 de Setiembre 2009]. Taxonomia: *Bixa orellana* L.: Genotóxico. Disponible en: <http://redbio.una.edu.ni/arboretum/fichas.php?cod=133>
- 37.- *Annona muricata* [Sede web]\*. *Annona muricata* (Guanabana) 2007. [Acceso 10 de Setiembre 2009]. *Annona muricata* (Guanabana): Annonaceae.: Disponible en: <http://www.plantoftheweek.org/week429.shtml>
- 38.- Innatia [Sede web]\*.Propiedades de la *Annona muricata* 2005. [Acceso 10 de Setiembre 2009]. Propiedades de la *Annona muricata*.: Disponible en: <http://www.innatia.com/s/c-plantas-medicinales-para/a-annona-muricata-guanabana.html>

- 39.- Kim GS, Zeng L, Alali L, Wu F, Sastrodihardjo S, McLaughlin J. Muricoreacin and murihexocin C. monotetrahydrofuran acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry* 1998; 49(2): 565-71.
- 40.- Chang FR, Liaw CC, Lin CY, Chou CJ, Chiu HF, Wu YC. New adjacent Bis-tetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Planta Med* 2003; 69(3): 241-46.
- 41.- Valencia C. 1995. *Fundamentos de fitoquímica*. Edit. Trillas. México DF. México.
- 42.- Santos D. & M. Salatino. 2000. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry*.55:567-573.
- 43.- Kotkar H., P. Mendki, S. Sadan, S. Jha, S. Upasani & V. Maheshwari. 2002. Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. *Pest Manag Sci*. 58(1): 33-37.
- 44.- Innatia [Sede web]\*.Propiedades de la *Annona muricata* 2005. [Acceso 10 de Setiembre 2009]. Propiedades de la *Annona muricata*.: Disponible en: <http://www.innatia.com/s/c-remedios-naturales-salud/a-graviola-guanabana.html>
- 45.- Angel Quispe, David Zavala, Margarita Posso, José Rojas, Abraham Vaisberg.; Efecto citotóxico de *Annona muricata* (guanabana) en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar. [Artículo en internet] 2007. Lima [Acceso 10 de setiembre 2009]. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1680-83982007000100005&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1680-83982007000100005&lng=es&nrm=iso)
- 46.- Innatia [Sede web]\*.Propiedades de la *Annona muricata* 2005. [Acceso 10 de Setiembre 2009]. Propiedades de la *Annona muricata*.: Disponible en: <http://www.innatia.com/s/c-remedios-naturales-salud/a-graviola-cancer-plantas.html>

- 47.- Emagister.com [Sede web]\*.Foro de Medicina Natural 2009. [Acceso 10 de Setiembre 2009]. La graviola (annona muricata) y su estudio contra el cancer.: Disponible en: [http://foros.emagister.com/tema-la\\_graviola\\_annona\\_muricata\\_y\\_su\\_estudio\\_contra\\_el\\_cance-13484-871787-1.htm](http://foros.emagister.com/tema-la_graviola_annona_muricata_y_su_estudio_contra_el_cance-13484-871787-1.htm)
- 48.- Cultivo de Frutales Nativos Amazónicos: Manual para el Extencionista – Tratado de Cooperación Amazónica. Lima – Perú. 1997. pág. 21 – 25
- 49.- Jose Mostacero Leon; Freddy Mejia Cico; Oscar Gamarra Torres. Taxonomia de las Fanerogamas utiles del Perú. Vol. 1. CONCYTEC. Editora Normas Legales S.A.C.; Trujillo – Perú. 2002
- 50- Guachalla L.; Ascarrunz Me.; La Genética Toxicología: Una ciencia en constante desarrollo. [Artículo en internet] 2006. [Acceso 7 de Agosto 2009]. Disponible en: <http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa20031114.pdf>
- 51.- Bello G., J. y López de Cerain S., A.; Fundamentos de Ciencia Toxicológica. 1ra ed. Edit. Diaz de Santos 2001; p. 128.
- 52.- Ximena Abrevaya; ¿Qué es la Genotoxicidad? [Articulo de Internet]\* 2008 Agosto. [Acceso 8 de Agosto 2009] Disponible en: [http://www.intramed.net/actualidad/art\\_1.asp?contenidoID=47111&uid=412290](http://www.intramed.net/actualidad/art_1.asp?contenidoID=47111&uid=412290)
- 53.- GreenFacts Glossary [Sede web]\*. GreenFacts ASBL/VZW 2001. [Acceso 12 de Agosto 2009]. Glosario: Genotóxico.Disponible en: <http://www.greenfacts.org/es/glosario/ghi/genotoxico-genotoxicidad.htm>
- 54.- GreenFacts Glossary [Sede web]\*. GreenFacts ASBL/VZW 2001. [Acceso 12 de Agosto 2009]. Glosario: Mutágeno. Disponible en: <http://www.greenfacts.org/es/glosario/mno/mutagen-mutagenico.htm>

55.- SIAFA: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. [Sede web]\*. España; 2006. [Acceso 15 de Agosto 2009]. Toxicos para la Reproducción Masculina; Disponible en: <http://www.siafa.com.ar/notas/nota195/toxicos.htm>

56.- Laffon B. et al. Influencia de determinados polimorfismos de enzimas metabólicas en la genotoxicidad del estireno. An. R. Acad. Nac. Farm., 2004, 70: 95-123

57.- Ferreiro G, Cancino Badías L., Lopez Nigro M., Palermo A, Mudry M, Prieto Gonzalez E, Carballo A. 2002, DNA single strand breaks in peripheral blood lymphocytes induced by three mitroimidazole derivatives. Toxicology Letters. 132: 109-115

58.- José Pérez P.; Alma Pérez S.; Viridiana Pérez T.; Ensayo Cometa. México. Universidad Nacional Autónoma de México. Laboratorio de Genética Básica y Clínica L-122. 2009. [Acceso 12 de Agosto 2009] Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/15275891/Ensayo-cometa-electroforesis-alcalina-Genetica-Clinica?autodown=pdf>

59.- MediaWiki. Linfocitos. Wikipedia; La Enciclopedia Libre. [Artículo de Internet] 2009. Marzo. [Acceso 12 de Agosto 2009] Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Linfocito>

60.- MediaWiki. Electroforesis en Gel. Wikipedia; La Enciclopedia Libre. [Artículo de Internet] 2007. Marzo. [Acceso 12 de Agosto 2009] Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Electroforesis\\_en\\_gel](http://es.wikipedia.org/wiki/Electroforesis_en_gel)

61.-International Association for the Study of Pain. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain 1983; 16: 109-110.

62.-Horváthová, E., D. Slameňová, L. Hlinčíková, T. Kumar, A. Gábelová y A. R. Collins.1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. Mutation Research 409: 163-171.

- 63.- Schumenam de Aluja Alnín. Derechos de los animales. Gaceta Médica de Méjico N° 131 (1) paag. 49-63. Jan-Feb. 1995.
- 64.- Ortega A., Micó J.I Symposium de Dolor en Reumatología: Modelos animales de dolor. Reumatol. Clin. [Internet] 2006 [acceso 06 de Setiembre del 2009] 2 Supl 1: S2-4 Disponible en: <http://www.doyma.es>.
- 65.- Wilson, J.T., P.L. Pascoe, J.M. Parry & D.R. Dixon. 1998. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). Mutation Research, 399: 87- 95.
- 66.- Mosberg AT, Hayes WA (1989). SubChronic Toxicity Testing. En: Principles and Methods of Toxicology. Segunda edición, editado por A Wallace Hayes. Raven Press, Ltd., New York.
- 67.- Wyrobek AJ, Bruce WR. Chemical Mutagens. In: United Kingdom edition published. Principles and Methods for their detection. 2nd ed (vol 2).England; 1978.p.135-136.
- 68.- Daniel F. Arencibia A., Luis A. Rosario F., Yanet Hernández R. Dayisell L. Curveco S.; Evaluación de la línea de ratón C57BL/6/cenp como biomodelo experimental en tres ensayos de genotoxicidad potencial. La Habana – Cuba. 2003
69. Betancourt J, Ramos A, Bizoso A, Decalo M, Martínez MJ, Edreira A. Evaluación Genotóxica del extracto fluido de *Indigofera suffruticosa* Mill (añil cimarrón) mediante el ensayo de anomalías en la cabeza de los espermatozoides en ratón. Revista Cubana de Plantas Medicinales 1998; 3:58-61.
- 70., Gámez R, Arencibia DF, Gutiérrez A, Pardo B, Curveco D, García H, Goicochea E. Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de *Roystonea regia*, en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en ratas *Sprague Dawley*. Revista Española de Toxicología 2009; 26(3), en prensa.

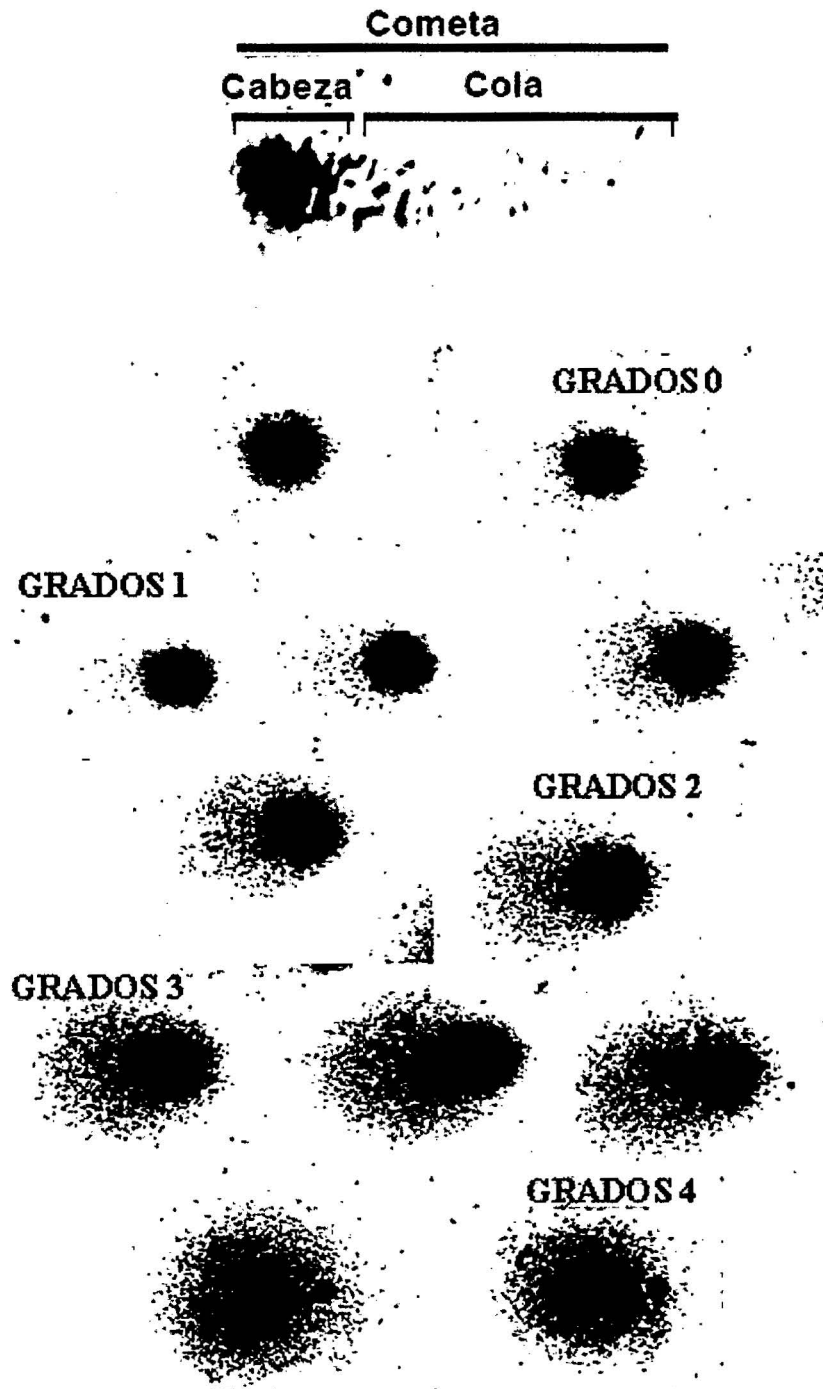
71. Arencibia DF, Rosario LA, Rodríguez Y, Martín Y, Díaz D. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide y micronúcleos en médula ósea de ratones Balb-C y OF-1. *retel (revista de toxicología en línea)* 2009; 24(2):7-29.
72. Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Noa M, Mas R, Curveco D, García H, Goicochea E. Evaluación Genotóxica del D-004 en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en ratones OF-1. *Rev. CENIC* 2009; 40(1):29-32.
- 73.- Dixon, D., A. Pruski, L. Dixon & A.N. Jha. 2002. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis*, 17 (6): 495-507.



# ANEXOS

ANEXO N° 01

GRADOS DE DAÑO AL DNA EN EL ENSAYO COMETA



ANEXO N° 02

C/F (%)	Factor de Volumen (ml x 10 <sup>-3</sup> )/p.c														
	1.4	1.6	1.8	2.0	2.2	2.4	2.6	2.8	3.0	3.2	3.4	3.6	3.8	4.0	
0.05	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Altamente Tóxico
0.1	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	
0.2	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	Moderadamente Tóxico
0.3	42	48	54	60	66	72	78	84	90	96	102	108	114	120	
0.4	56	64	72	80	88	96	104	112	120	128	136	144	152	160	
0.5	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
1.0	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	340	360	380	400	
1.5	210	240	270	300	330	360	390	420	450	480	510	540	570	0	
2.0	280	320	360	400	440	480	520	560	600	640	680	720	760	800	Ligeramente Tóxico
2.5	350	400	450	500	550	600	650	700	750	800	850	900	950	1000	
3.0	420	480	540	600	660	720	780	840	900	960	1020	1080	1140	1200	
3.5	490	560	630	700	770	840	910	980	1050	1120	1190	1260	1330	1400	
4.0	560	640	720	800	880	960	1040	1120	1200	1280	1360	1440	1520	1600	
5.0	700	800	900	1000	1100	1200	1300	1400	1500	1600	1700	1800	1900	2000	
10	1400	1600	1800	2000	2200	2400	2600	2800	3000	3200	3400	3600	3800	4000	
15	2100	2400	2700	3000	3300	3600	3900	4200	4500	4800	5100	5400	5700	6000	
20	2800	3200	3600	4000	4400	4800	5200	5600	6000	6400	6800	7200	7600	8000	
25	3500	4000	4500	5000	5500	6000	6500	7000	7500	8000	8500	9000	9500	10000	
30	4200	4800	5400	6000	6600	7200	7800	8400	9000	9600	10200	10800	11400	12000	Prácticamente No Tóxico
35	4900	5600	6300	7000	7700	8400	9100	9800	10500	11200	11900	12600	13300	14000	
40	5600	6400	7200	8000	8800	9600	10400	11200	12000	12800	13600	14400	15200	16000	Inocuo
45	6300	7200	8100	9000	9900	10800	11700	12600	13500	14400	15300	16200	17100	18000	
55	7700	8800	9900	11000	12100	13200	14300	15400	16500	17600	18700	19800	20900	22000	
65	9100	10400	11700	13000	14300	15600	16900	18200	19500	20800	22100	23400	24700	26000	
75	10500	12000	13500	15000	16500	18000	19500	21000	22500	24000	25500	27000	28500	30000	
85	11900	13600	15300	17000	18700	20400	22100	23800	25500	27200	28900	30600	32300	34000	
95	13300	15200	17100	19000	20900	22800	24700	26600	28500	30400	32300	34200	36100	38000	

## ANEXO N° 03

### Fórmulas para calcular la cantidad de soluto y solvente para la preparación de los extractos acuosos liofilizados

- **Volumen requerido del solvente (solución salina 0.9%):**

$$VS (ml) = PP (g) \times FV \times NI$$

VS : volumen del solvente  
PP : peso promedio de los animales  
FV : factor de volumen  
NI : número de individuos

- **Cantidad requerida del extracto liofilizado:**

$$ExL (g) = \frac{[ ] g \times VS (ml)}{100 ml}$$

ExL : extracto liofilizado  
VS : volumen del solvente  
[ ] g : concentración

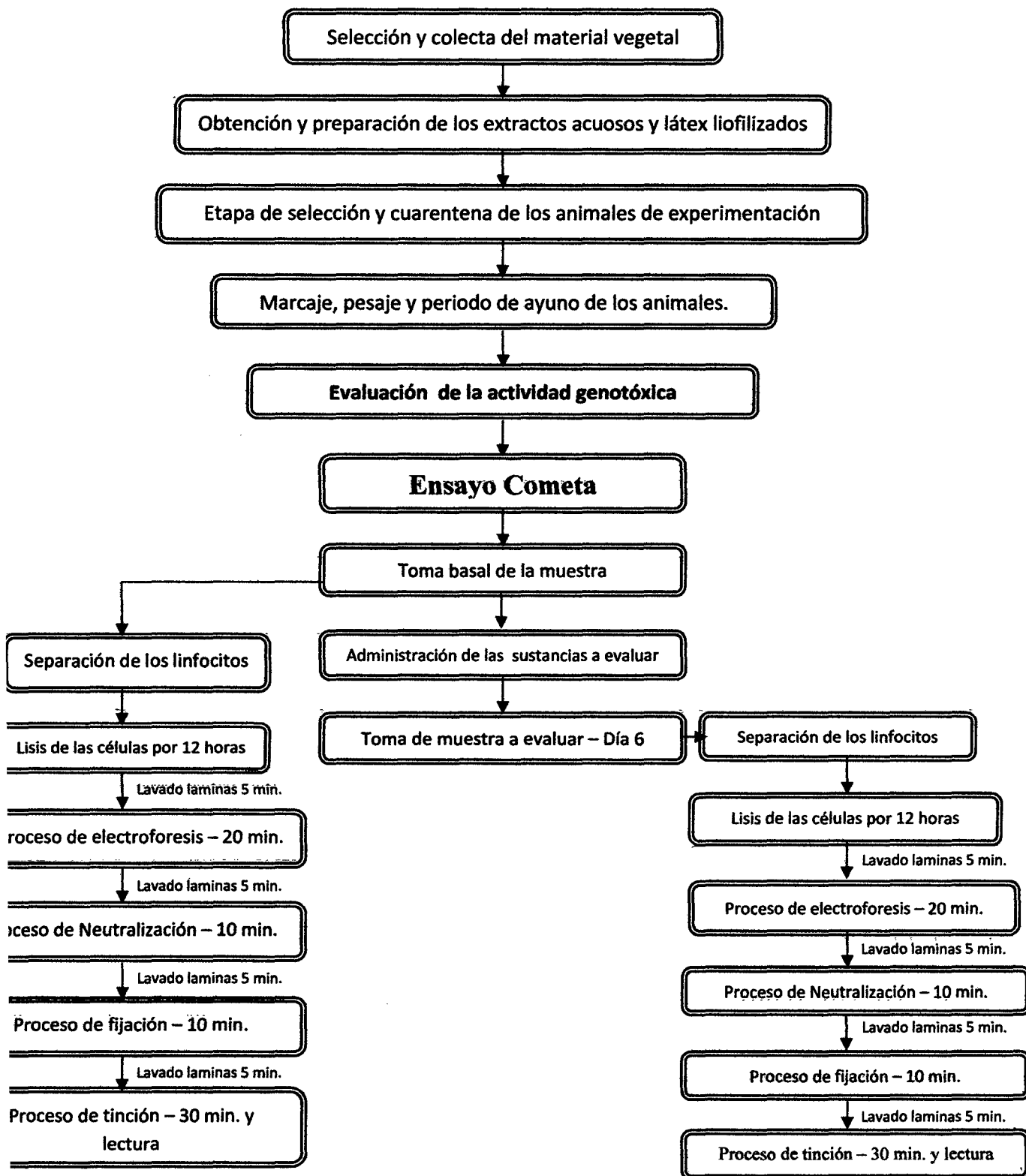
- **Volumen de la solución preparada del extracto liofilizado a administrar a cada animal:**

$$VI (ml) = P (g) \times FV$$

VI : volumen administrado  
P : peso del animal  
FV : factor de volumen

## ANEXO N° 04

### Flujograma del proceso de recolección y análisis de datos de la evaluación de la actividad genotóxica.



**ANEXO N° 05**

**REGISTRO DE DATOS PRIMARIOS (UNIDADES ARBITRARIAS DE DAÑO AL DNA) EN EL ENSAYO COMETA**

EVALUADOR :  
 FECHA :  
 MICROSCOPIO :  
 OBJETIVO :

CÓDIGO	GEL	NIVELES DE DAÑO				
		0	1	2	3	4
	1a					
	2a					
	3a					
	4a					
	5a					
	6a					
	7a					
	8a					
	9a					
	10a					

Gel a = Codificación de la lámina

**ANEXO N° 06**

**REGISTRO DE DATOS (UNIDADES ARBITRARIAS DE DAÑO AL DNA) EN EL ENSAYO COMETA POR ANIMAL Y DOSIS**

<b>DOSIS 1000 mg/Kg p.c</b>		<b>DOSIS 2000 mg/Kg p.c</b>	
<b>DAÑO</b>	<b>CONTEO</b>	<b>DAÑO</b>	<b>CONTEO</b>
0		0	
1		1	
2		2	
3		3	
4		4	
$\Sigma$		$\Sigma$	

*Croton lechleri*

<b>DOSIS 1000 mg/Kg p.c</b>		<b>DOSIS 2000 mg/Kg p.c</b>	
<b>DAÑO</b>	<b>CONTEO</b>	<b>DAÑO</b>	<b>CONTEO</b>
0		0	
1		1	
2		2	
3		3	
4		4	
$\Sigma$		$\Sigma$	

*Bixa orellana*

<b>DOSIS 1000 mg/Kg p.c</b>		<b>DOSIS 2000 mg/Kg p.c</b>	
<b>DAÑO</b>	<b>CONTEO</b>	<b>DAÑO</b>	<b>CONTEO</b>
0		0	
1		1	
2		2	
3		3	
4		4	
$\Sigma$		$\Sigma$	

*Annona muricata*

**ANEXO N° 07**

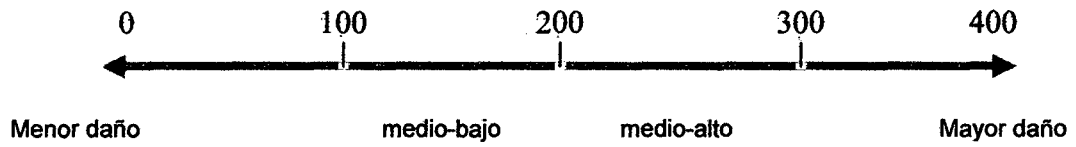
**REGISTRO DE DATOS (UNIDADES ARBITRARIAS DE DAÑO AL DNA) EN  
EL ENSAYO COMETA POR SUMATORIA DE UNIDADES ARBITRARIAS Y  
DOSIS**

<i>Croton lechleri</i>				<i>Bixa orellana</i>				<i>Annona muricata</i>			
1000 mg/Kg p.c		2000 mg/Kg p.c		1000 mg/Kg p.c		2000 mg/Kg p.c		1000 mg/Kg p.c		2000 mg/Kg p.c	



**ANEXO N° 08**

**ESCALA DE LOS NIVELES DE DAÑO EN EL ADN EN EL ENSAYO  
COMETA**



ANEXO N° 09

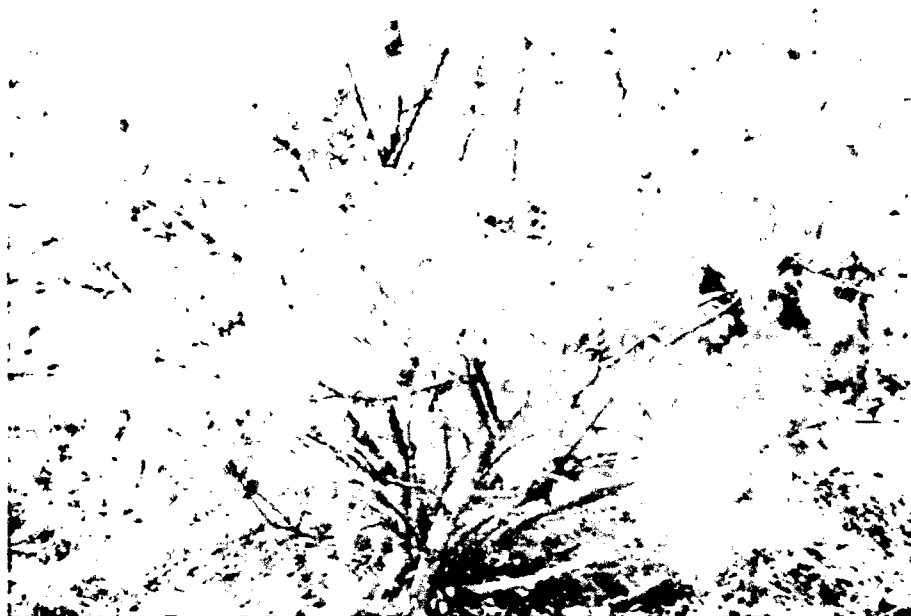


Foto N° 01 – Arbusto de *Bixa orellana*



Foto N° 02 – Árbol de *Croton lechleri*  
Cortes para la extracción del látex

ANEXO N° 10



Foto N° 01 – Arbusto de *Annona muricata*  
Instituto de Medicina Tradicional – EsSalud

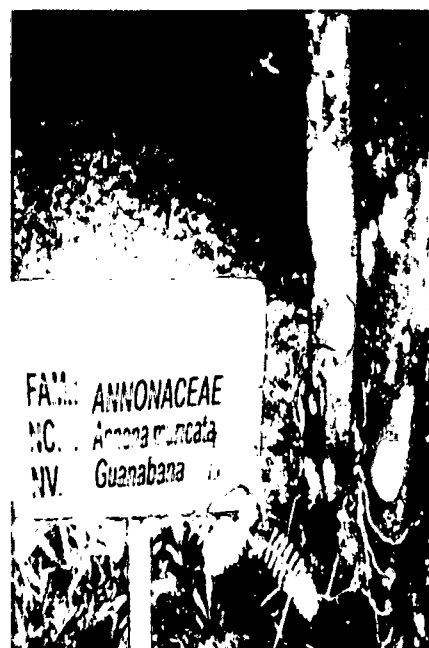
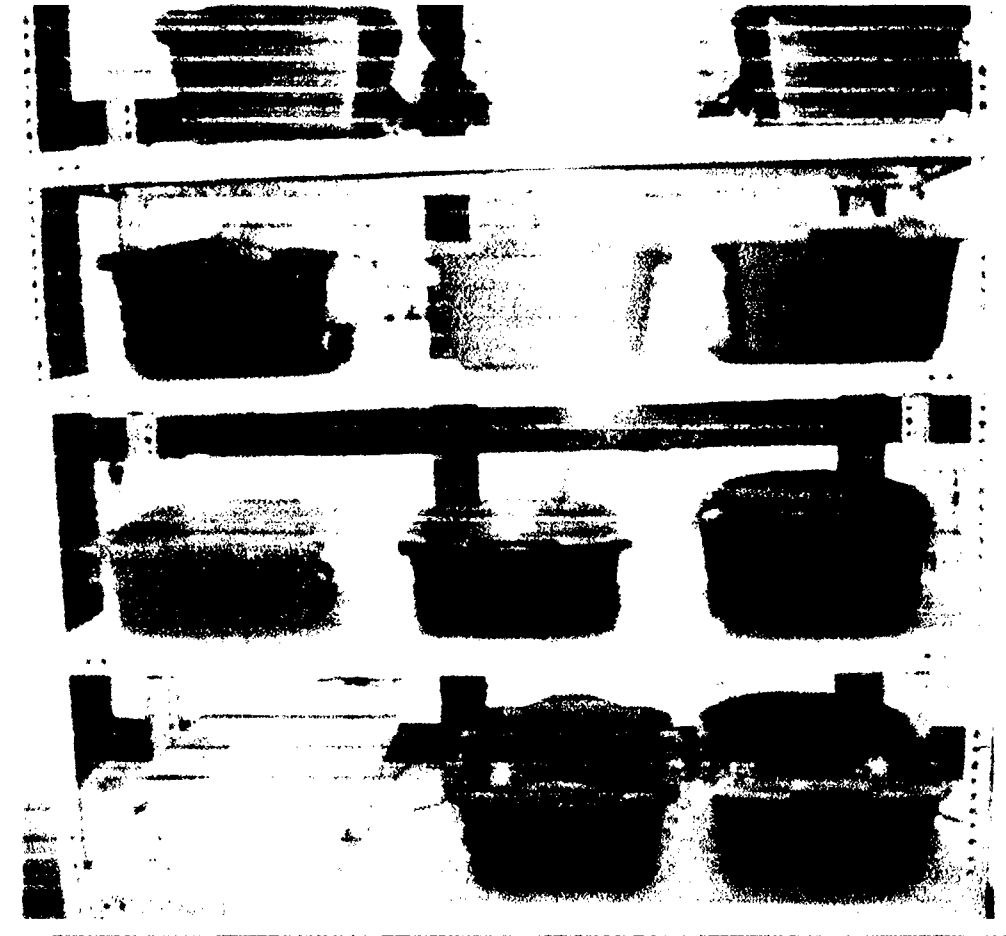


Foto N° 02 – Hojas de *Annona muricata*  
Identificación taxonómica

**ANEXO N° 11**



**Foto N°01 – Acondicionamiento de los animales**

## ANEXO N° 12



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Esquina Pevos/Nanay - Teléfono 23 5121 - Apartado Postal 328  
E-mail: herbarium@unamaz.com.pe  
Iquitos-Perú

*CENTRO DE ESTUDIO, INVESTIGACION Y ENSEÑANZA*

### CERTIFICADO

**EL DIRECTOR DEL HERBARIUM AMAZONENSE DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA**

Que, la muestra botánica colectada por el Bachiller F. BQ. Henry Francisco Cachique Reátegui pertenece a su tesis de grado titulada “Evaluación genotóxica de los extractos acuosos liofilizados de *Bixa Orellana*, *Annona muricata* y látex liofilizado de *Croton lechleri* en linfocitos de ratas albinas”, fue verificada e identificada en este Centro de Estudio, Investigación y Enseñanza como a continuación se indica:

<u>Familia</u>	<u>Nombre Científico</u>	<u>Nombre vulgar</u>
EUPHORBIACEAE	<i>Croton lechleri</i> (Muell Arg.)	“Sangre de grado”
BIXACEAE	<i>Bixa Orellana</i> L.	“Achiote”
ANNONACEAE	<i>Annona muricata</i> L.	“Guanábana”

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para fines que estime conveniente:

Iquitos, 18 de Diciembre del 2009

Blgo. Dr. Manuel Flores Anco  
Director (a) del AMAZ.



**ANEXO N° 13**

**Peso corporal (gr) en ratas albinas machos, tratados durante 5 días con los extractos acuosos liofilizados de *Bixa orellana*, *Annona muricata* y látex liofilizado de *Croton lechleri*.**

**Machos. n= 4**

<b>GRUPOS EXPERIMENTALES</b>	<b>0 días basal</b>	<b>5 días</b>
NaCl 0,9%	173 ± 5,97	177 ± 5,56
Ciclofosfamida 50 mg	181 ± 3,77	182 ± 17,72
<i>Bixa orellana</i> - Machos 1000 mg	170 ± 2,87	170 ± 3,46
<i>Bixa orellana</i> - Machos 2000 mg	184 ± 11,75	187 ± 11,99
<i>Annona muricata</i> - Machos 1000 mg	170 ± 9,07	173 ± 8,54
<i>Annona muricata</i> - Machos 2000 mg	181 ± 11,84	184 ± 11,06
<i>Croton lechleri</i> - Machos 1000 mg	188 ± 18,17	189 ± 15,43
<i>Croton lechleri</i> - Machos 2000 mg	191 ± 11,56	194 ± 16,54

Valores expresados en promedios ± desviación estándar (X ± SD)

**Peso corporal (gr) en ratas albinas hembras, tratados durante 5 días con los extractos acuosos liofilizados de *Bixa orellana*, *Annona muricata* y látex liofilizado de *Croton lechleri*.**

**Hembras. n= 4**

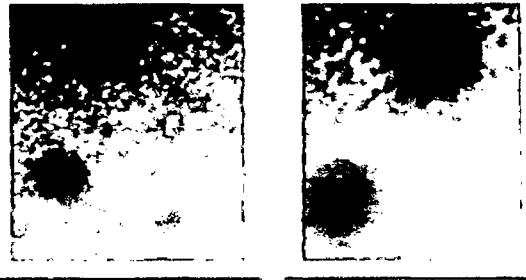
<b>GRUPOS EXPERIMENTALES</b>	<b>0 días basal</b>	<b>5 días</b>
NaCl 0,9%	162 ± 6,13	165 ± 6,60
Ciclofosfamida 50 mg	160 ± 6,08	158 ± 8,98
<i>Bixa orellana</i> - Hembras 1000 mg	161 ± 5,91	162 ± 8,79
<i>Bixa orellana</i> - Hembras 2000 mg	178 ± 10,97	179 ± 6,85
<i>Annona muricata</i> - Hembras 1000 mg	161 ± 3,20	164 ± 4,79
<i>Annona muricata</i> - Hembras 2000 mg	157 ± 8,81	158 ± 9,83
<i>Croton lechleri</i> - Hembras 1000 mg	176 ± 10,24	175 ± 12,82
<i>Croton lechleri</i> - Hembras 2000 mg	177 ± 16,91	181 ± 13,44

Valores expresados en promedios ± desviación estándar (X ± SD)

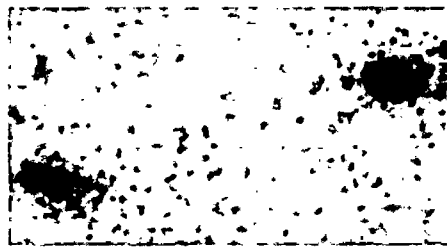


**ANEXO N° 14**

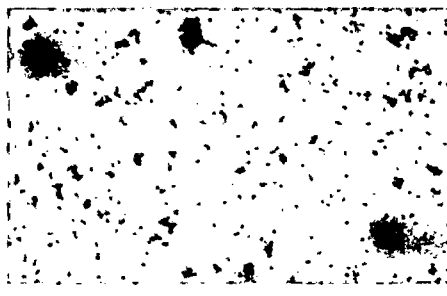
**Células obtenidas durante el ensayo cometa**



**Foto N° 01 – Células intactas - Grado 0**



**Foto N° 02 – Células ligeramente dañadas - Grado 1**



**Foto N° 03 – Células dañadas - Grado 2**



**Foto N° 04 – Células dañadas - Grado 3**