

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Dirección de Postgrado**  
**Maestría en Elaboración, Gestión y Evaluación**  
**de Proyectos de Investigación Científica**

**EFEECTO ANTIMUTAGÉNICO DEL EXTRACTO  
ETANÓLICO DE *Bauhinia forficata* EVALUADA EN  
*Drosophila melanogaster* MEDIANTE EL ENSAYO  
DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICA  
(SMART)**

**LUIS FRANCISCO MARÍN INSFRÁN**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la  
obtención  
del Grado de Magíster en Elaboración, Gestión y Evaluación de  
Proyectos de Investigación Científica

**SAN LORENZO – PARAGUAY**  
**Marzo – 2019**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Dirección de Postgrado**  
**Maestría en Elaboración, Gestión y Evaluación**  
**de Proyectos de Investigación Científica**

**EFEECTO ANTIMUTAGÉNICO DEL EXTRACTO  
ETANÓLICO DE *Bauhinia forficata* EVALUADA EN  
*Drosophila melanogaster* MEDIANTE EL ENSAYO  
DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICA  
(SMART)**

**LUIS FRANCISCO MARÍN INSFRÁN**

Orientador: **Prof. Dr. Enrique Zamorano Ponce**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la  
obtención  
del Grado de Magíster en Elaboración, Gestión y Evaluación de  
Proyectos de Investigación Científica

**SAN LORENZO – PARAGUAY**  
**Marzo – 2019**

Datos Internacionales de Catalogación en la Publicación (CIP)  
DE LA BIBLIOTECA DE LA FACEN – UNA

**Marín Insfrán, Luis Francisco**

Efecto antimutagénico del extracto Etanólico de *Bauhinia forficata* evaluada en *Drosophila melanogaster* mediante el ensayo de mutación y recombinación somática (SMART) / Luis Francisco Marín Insfrán. -- San Lorenzo: Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Dirección de Postgrado, 2019.

i-xiii, 56h.; 30 cm.

Incluye bibliografías y anexos

Tesis (Magíster en Elaboración, Gestión y Evaluación de Proyectos de Investigación Científica). – Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Dirección de Postgrado, 2019.

1. *Drosophila melanogaster* 2. Test SMART 3. *Bauhinia forficata* (Pata de Buey) 4. Antigenotoxicidad 5. Mutaciones 6. Fitoterapia 7. Tesis y disertaciones académicas I. Título

633.88/M338e

EFFECTO ANTIMUTAGÉNICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE  
*Bauhinia forficata* EVALUADA EN *Drosophila melanogaster*  
MEDIANTE EL ENSAYO DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN  
SOMÁTICA (SMART)

LUIS FRANCISCO MARÍN INSFRÁN

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Elaboración, Gestión y Evaluación de Proyectos de Investigación Científica.

Fecha de aprobación: 28 de marzo de 2019

**MESA EXAMINADORA**

**MIEMBROS:**

**Prof. Dr. Enrique Zamorano Ponce**

*Universidad del Bío-Bío, Chile*

**Prof. Dr. Hugo Eduardo Cerecetto Meyer**

*Universidad de la República, Uruguay*

**Prof. Dr. Fernando José Méndez Gaona**

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Asunción, Paraguay*

**Prof. Dr. Javier Alcides Galeano Sánchez**

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Asunción, Paraguay*

**Prof. Mg. Carlos Aníbal Peris Castiglioni**

*Director de Postgrado del Rectorado. Universidad Nacional de Asunción, Paraguay*

**Prof. MSc. Viviana Isabel Díaz Escobar**

*Directora de Postgrado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Asunción, Paraguay*

Aprobado y catalogado por la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, en fecha 8 de julio de 2019.

**Prof. MSc. Andrea Weiler de Albertini**  
Directora de Postgrado, FACEN – UNA

## **DEDICATORIA**

A mi esposa, hijas, madre, hermanos, familiares y colegas que con sus oraciones y consejos ayudaron a sobrellevar las dificultades que fueron apareciendo en el transcurso de la Maestría.

## AGRADECIMIENTOS

A la Santísima Trinidad por su constante bendición.

A las autoridades de la CONACYT y de la FACEN por permitirme desarrollar esta Maestría.

A MSc. Elvio Gayozo del Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis de la FACEN por la ayuda incansable en la lectura de láminas y por su apoyo técnico en la elaboración del presente trabajo.

A MSc. Claudia Pereira y a Dr. Christian Vogt del Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales de la FACEN, por sus colaboraciones en la identificación botánica de los ejemplares vegetales.

A MSc. Francisco Ferreira del laboratorio Instrumental de la FACEN por la ayuda prestada en la elaboración de las distintas concentraciones del extracto etanólico y también, las del Peróxido de Hidrógeno.

A Lic. Cynthia Rivarola por la ayuda prestada en la lectura de lámina.

A los alumnos pasantes del laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental de la FACEN por la ayuda en el mantenimiento de las cepas de *Drosophila melanogaster* y parte de la metodología desarrollada en esta tesis.

# EFEECTO ANTIMUTAGÉNICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Bauhinia forficata* EVALUADA EN *Drosophila melanogaster* MEDIANTE EL ENSAYO DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICA (SMART)

**Autor:** LUIS FRANCISCO MARÍN INSFRÁN  
**Orientador:** PROF. DR. ENRIQUE ZAMORANO PONCE

## RESUMEN

En zonas rurales y urbanas de Paraguay, la cultura de la fitoterapia se encuentra muy arraigada para el tratamiento de numerosas afecciones. *Bauhinia forficata* (Pata de buey) es consumida en decocción o infusiones para el tratamiento de afecciones de piel, garganta, pecho, estómago, hígado, riñón y especialmente por sus efectos como hipoglucemiante e hipocolesterolemiante. El objetivo de este trabajo fue la de evaluar la acción antimutagénica del extracto etanólico de *B. forficata* empleando el test SMART en *Drosophila melanogaster*, mediante el tratamiento de larvas trans heterocigotas *mwh+/*flr*<sup>3</sup>*. Para ello, se realizó el extracto etanólico de hojas de *B. forficata* obteniéndose un rendimiento de 5,05% en extracto crudo. La evaluación genotóxica del extracto se analizó de cinco concentraciones 10,01; 25,50; 52,01; 75,41 y 101,76 mg.mL<sup>-1</sup> respectivamente, de la cual la dosis subtóxica fue a la concentración de 52,01 mg.mL<sup>-1</sup>. La evaluación antimutagénica se llevó a cabo mediante cuatro procedimientos, el tratamiento simple comprobó que el extracto etanólico de hojas de *B. forficata* a 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> no posee efecto genotóxico sobre larvas de *D. melanogaster*, en comparación con el Peróxido de Hidrógeno al 0,96 M, que si posee dicho efecto, en el tratamiento combinado (Peróxido de Hidrógeno al 0,96 M junto con el extracto a 52,01 mg.mL<sup>-1</sup>) evidenció una reducción del 57,89% de clones mutantes. En el postratamiento (previo tratamiento con el Peróxido de Hidrógeno al 0,96 M por una hora seguida con el extracto a 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> por 48 horas) presentó una reducción del 57,89%. En el pretratamiento (previo tratamiento con el extracto a 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> por 72 horas y posterior tratamiento con el Peróxido de Hidrógeno al 0,96 M por 48 horas) demostró una disminución del 78,94% de clones mutantes inducidos. Dichos resultados fueron analizados mediante el test de Kastenbaum-Bowman  $\alpha=\beta = 0,05$ , lo cual evidenció resultados positivos para el potencial antimutagénico del extracto de *B. forficata* a 52,01 mg.mL<sup>-1</sup>, demostrando también su acción protectora en la reducción del daño genético ocasionado por eventos mutagénicos inducidos de origen químico.

**Palabras Claves:** *Drosophila melanogaster*, SMART, *Bauhinia forficata*, antigenotoxicidad, mutaciones

# ANTIMUTAGENIC EFFECT OF *Bauhinia forficata* EVALUATED IN *Drosophila melanogaster* BY SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION TEST (SMART)

**Author:** LUIS FRANCISCO MARÍN INSFRÁN  
**Advisor:** PROF. DR. ENRIQUE ZAMORANO PONCE

## SUMMARY

In rural and urban areas of Paraguay, the phytotherapy culture is deeply rooted in people to treat of several affections. *Bauhinia forficata* (Pata de buey) is consumed in decoction or infusions for the treatment of skin, throat, chest, stomach, liver, kidney, especially for its hypoglycaemic and hypocholesterolemic effects. The objective of this investigation was to evaluate the antimutagenic action of the ethanol extract of *B. forficata* using the SMART test in *Drosophila melanogaster*, by the treatment of trans heterozygous larvae *mwh+/*flr*<sup>3</sup>*. For this, the ethanolic extract of *B. forficata* leaves was obtained with a efficiency of 5.05% in crude extract. The genotoxic evaluation of the extract was analyzed in five concentrations 10.01; 25.50; 52.01; 75.41 and 101.76 mg.mL<sup>-1</sup> respectively, of which the subtoxic dose was at the concentration of 52.01 mg.mL<sup>-1</sup>. The antimutagenic evaluation was carried out by means of four procedures, the simple treatment proved that the ethanolic extract of *B. forficata* at 52.01 mg.mL<sup>-1</sup> does not have a genotoxic effect on larvae of *D. melanogaster*, in comparison with Peroxide of Hydrogen 0.96 M, which does have this effect, in the combined treatment (Hydrogen Peroxide together with the extract at 52.01 mg.mL<sup>-1</sup>) showed a reduction of 57.89% of mutant clones. In the after-treatment (previous treatment with the Hydrogen Peroxide 0.96 M for one hour followed with the extract at 52.01 mg.mL<sup>-1</sup> for 48 hours) it showed a reduction of 57.89%. In the pretreatment (previous treatment with the extract at 52.01 mg.mL<sup>-1</sup> for 72 hours and subsequent treatment with Hydrogen Peroxide 0.96 M for 48 hours) showed a decrease of 78.94% of induced mutant clones. These results were analyzed by Kastenbaum-Bowman Test  $\alpha = \beta = 0.05$ , which showed positive results for the antimutagenic potential of the extract of *B. forficata* at 52.01 mg.mL<sup>-1</sup>, also demonstrating its protective action in the reduction of genetic damage caused by mutagenic events induced by chemical origin.

**Keywords:** *Drosophila melanogaster*, SMART, *Bauhinia forficata*, antigenotoxicity, mutations

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Objetivos .....	3
1.1.1. Objetivo General .....	3
1.1.2. Objetivos Específicos .....	3
1.2. Justificación .....	3
1.3. Hipótesis .....	3
<b>2. MARCO TEÓRICO O MARCO REFERENCIAL</b> .....	4
2.1. Efecto antígenotóxico de productos vegetales .....	4
2.2. Descripción botánica de <i>Bauhinia forficata</i> Link .....	5
2.3. Composición fitoquímica de las hojas de <i>Bauhinia forficata</i> Link .....	6
2.4. Propiedades de la <i>Bauhinia forficata</i> Link .....	7
2.5. SMART (Test de Mutación Somática y de Recombinación) .....	8
2.5.1. <i>Drosophila melanogaster</i> y sus aplicaciones en la Genética .....	8
2.5.2. Test SMART (Test de Mutación Somática y de Recombinación) en alas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	9
2.6. Papel del Peróxido de Hidrógeno .....	11
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	13
3.1. Diseño metodológico .....	13
3.2. Criterios de Exclusión .....	13
3.3. Criterios de inclusión .....	13
3.4. Variables .....	13
3.4.1. Independientes. ....	13
3.4.2. Dependientes. ....	13
3.5. Colecta de ejemplar .....	14
3.6. Identificación taxonómica .....	14
3.7. Preparación del extracto etanólico de <i>Bauhinia forficata</i> Link .....	14
3.8. Determinación de la dosis letal cincuenta (DL <sub>50</sub> ) del Peróxido de Hidrógeno .....	15
3.9. Test de Mutación Somática y Recombinación (SMART) para genotoxicidad del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> .....	16

3.10. Test de Mutación Somática y Recombinación (SMART) para determinar el efecto antimutagénico del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> frente al Peróxido de Hidrógeno .....	17
3.11. Procedimientos para el análisis de las láminas.....	18
3.12. Índice del porcentaje de reducción de una sustancia ensayada frente a un potente mutágeno .....	19
3.13. Análisis estadístico .....	19
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>20</b>
4.1. Determinación de la DL <sub>50</sub> del Peróxido de Hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	20
4.2. Determinación de toxicidad del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> mediante el test de SMART .....	22
4.3. Determinación del efecto antimutagénico del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> frente al Peróxido de Hidrógeno mediante el test de SMART .....	25
4.3.1. Primer tratamiento .....	25
4.3.2. Segundo tratamiento.....	27
4.3.3. Tercer Tratamiento .....	29
4.3.4. Cuarto Tratamiento .....	31
4.3.5. Comparación entre todos los tratamientos.....	34
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>37</b>
5.1. CONCLUSIONES .....	37
5.2. RECOMENDACIONES.....	38
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>50</b>
<b>Anexo A:</b> Criterios de exclusión e inclusión.....	<b>51</b>
<b>Anexo B:</b> Área de colecta.. .....	<b>52</b>
<b>Anexo C:</b> <i>Bauhinia forficata</i> en fresco en el lugar de colecta .....	<b>53</b>
<b>Anexo D:</b> <i>Bauhinia forficata</i> Link. Material estudiado. ....	<b>53</b>
<b>Anexo E:</b> Preparación del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> Link.....	<b>54</b>
<b>Anexo F:</b> Determinación de la dosis letal cincuenta (DL <sub>50</sub> ) del Peróxido de Hidrógeno.....	<b>54</b>
<b>Anexo G:</b> SMART para genotoxicidad del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> .....	<b>55</b>

<b>Anexo H:</b> Cruza estándar del test SMART.....	55
<b>Anexo I:</b> Tratamiento de las larvas <i>mwh+/<i>flr</i><sup>3</sup></i> para la determinación del efecto antimutagénico del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> frente al Peróxido de Hidrógeno..	56
<b>Anexo J:</b> Procedimientos para el análisis de las láminas...	56

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Tratamiento agudo de larvas de <i>D. melanogaster</i> con Peróxido de Hidrógeno .....	21
<b>Figura 2:</b> Clones encontrados en alas de <i>D. melanogaster</i> tratadas para la determinación del potencial efecto genotóxico del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> .....	23
<b>Figura 3:</b> Potencial genotóxico del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> .....	24
<b>Figura 4:</b> Tratamiento simple para la determinación del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> .....	26
<b>Figura 5:</b> Tratamiento combinado para la determinación del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> .....	28
<b>Figura 6:</b> Pretratamiento con Peróxido de Hidrógeno para la determinación del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> .....	30
<b>Figura 7:</b> Pretratamiento con el extracto etanólico de <i>B. forficata</i> para la determinación del potencial antigenotóxico del extracto etanólico.....	32
<b>Figura 8:</b> Clones encontrados en alas de <i>D. melanogaster</i> tratadas para la determinación del potencial antimutagénico del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> frente al Peróxido de Hidrógeno.....	33
<b>Figura 9:</b> Comparación entre todos los tratamientos para la determinación del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> .....	35

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Diseño metodológico de los tratamientos.....	18
<b>Tabla 2:</b> Tratamiento agudo de larvas de <i>D. melanogaster</i> con Peróxido de Hidrógeno .....	20
<b>Tabla 3:</b> Análisis estadístico del potencial genotóxico del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> . Cruce estándar .....	24
<b>Tabla 4:</b> Análisis estadístico del potencial antigenotóxico del extracto de <i>B. forficata</i> frente al Peróxido de Hidrógeno mediante un tratamiento simple. Cruce estándar .....	26
<b>Tabla 5:</b> Análisis estadístico del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> frente al Peróxido de Hidrógeno mediante un tratamiento combinado. Cruce estándar .....	28
<b>Tabla 6:</b> Análisis estadístico del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> frente al Peróxido de Hidrógeno mediante un post tratamiento con el extracto etanólico. Cruce estándar .....	30
<b>Tabla 7:</b> Análisis estadístico del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> frente al Peróxido de Hidrógeno mediante un pretratamiento con el extracto etanólico. Cruce estándar .....	32
<b>Tabla 8:</b> Análisis estadístico del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de <i>B. forficata</i> frente al Peróxido de Hidrógeno mediante la comparación entre todos los tratamientos. Cruce estándar.....	35

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
SMART	Somatic Mutation And Recombination Test
MSP	Manchas Simples Pequeñas
MSG	Manchas Simples Grandes
MG	Manchas Gemelas
mL	Mililitros
g	Gramos
et al.	Y otros
HepG2	Línea celular de cáncer de hígado humano (carcinoma hepatocelular)
V79	Células de linfoma de ratón
mg	Miligramos
DL <sub>50</sub>	Dosis Letal Cincuenta
<i>mwh</i>	Multiple wing bair
<i>flr<sup>3</sup></i>	Flare
µg	Microgramos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
DAD	Detector de arreglo de diodos
LOH	Loss of Heterozygosity
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrógeno
G <sub>0</sub>	Fase fuera del ciclo celular
G <sub>1</sub>	Primera fase de la Interfase del ciclo celular
FACEN	Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencias y Tecnologías
L	Litros
°C	Grados centígrados
µL	Microlitros
mL	Mililitros
TM	Total de manchas
M	Molar
µM	Micromolar

subsp	Sub especie
sf	Sin fecha
kg	Kilogramos
h	Hora
Ec	Ecuación

## 1. INTRODUCCIÓN

En Paraguay existe una costumbre cultural arraigada en la medicina tradicional procedente de los guaraníes, conocedores de las propiedades beneficiosas de plantas nativas y que emplearon acertadamente en la prevención y tratamiento de enfermedades que afectan al hombre (Melgarejo, 2014). La Fitoterapia, con base en el saber popular, es de uso periódico en nuestro país, particularmente en zonas rurales en las que se observa un número significativo de personas que consumen plantas medicinales, ya sea en infusión o decocción, debido a diversas causas, entre otras, la propia tradición y las dificultades de índole diversa para acceder los centros de salud urbanos que, cuentan con farmacias y medicamentos adecuados (Soria, 2015).

Ciertas plantas, usadas tradicionalmente como medicinales (Surh, 1999; Ferguson, 2001) se han destacado, debido al aumento en el empleo de las mismas (Degen *et al.*, 2008), además por demostrarse tener varios principios activos, como ser propiedades antígenotóxicas y anticarcinógenas (Ferrer, 2002) y porque pueden ser fuentes para obtener medicamentos para diversas patologías humanas, los cuales podrían alcanzar ser más seguros y eficaces (Ibarrola y Degen, 2011) y es por esto, que en las últimas décadas se volvió necesaria la búsqueda experimental de dichos principios activos en estos vegetales.

Puede haber dos grandes grupos de antimutágenos: los agentes que impiden que los carcinógenos se almacenen o reaccionen con los sitios diana (blancos de ataques de las sustancias carcinógenas), los cuales son llamados bloqueadores, mientras los que previenen la evolución de los procesos neoplásicos, son denominados agentes supresores (Wattenberg, 1981).

La *Bauhinia forficata* Link, conocida popularmente como pata de buey es empleada en decocción o con el tereré para el tratamiento de afecciones de piel, garganta, pecho, estómago, hígado y riñón; se conoce sus efectos como hipoglucemiante, antiinflamatorio, hipocolesterolemiante y diurético (Menezes *et al.*, 2007; de Sousa Lino *et al.*, 2004; Volpato *et al.*, 2008; Pin *et al.*, 2009). En estudios previos se ha evidenciado inducción de apoptosis en células HepG2 vía activación de caspasa-3 y ulterior proteólisis de poli (AD)-ribosa (polimerasa) (Lim *et al.*, 2006). Lectinas aisladas desde las hojas de esta planta han probado inhibir el crecimiento de varios tipos de líneas celulares transformadas particularmente de cáncer de mama (Silva *et al.*, 2014) y melanoma (Lubkowski *et al.*, 2017).

La elevada concentración de flavonoides y compuestos fenólicos (Oliveira *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2006; Sartorelli y Correa 2007; Menezes *et al.*, 2007; Düsman *et al.*, 2013) permiten a esta planta poseer un potencial efecto antioxidante y consecuentemente preventivo a procesos mutagénicos inducidos por especies oxígeno-reactivas y que pueden conllevar a cambios genéticos conducente a procesos de transformación celular y subsecuentemente cáncer.

Dado los antecedentes expuestos y atendiendo a la riqueza de flavonoides en la planta, en esta investigación se propone como objetivo general evaluar el efecto antimutagénico de *Bauhinia forficata* Link utilizando el Test de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en *Drosophila melanogaster*, y de esta manera ampliar el conocimiento de la farmacopea nacional, si su consumo reviste beneficios para la salud de quienes la usan como una terapia alternativa y consecuentemente explorar su uso potencial como fuente de antioxidantes naturales de ayuda en la prevención de complicaciones asociadas a estrés oxidativo celular.

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo General:**

Evaluar la acción antimutagénica del extracto etanólico de *Bauhinia forficata* mediante SMART en *Drosophila melanogaster*.

### **1.1.2. Objetivos Específicos:**

1. Determinar la dosis letal cincuenta (DL50) del Peróxido de Hidrógeno en *Drosophila melanogaster*.
2. Examinar la toxicidad del extracto etanólico de *Bauhinia forficata*.
3. Contrastar el papel antimutagénico del extracto frente al Peróxido de Hidrógeno.
4. Analizar estadísticamente los resultados obtenidos de los grupos experimentales a diferentes dosis con los grupos controles.

## **1.2. Justificación**

Como el ser humano se expone de manera accidental como deliberada a agentes genotóxicos como son las aguas contaminadas (Martínez y Gómez, 2007), pesticidas (Labrada *et al.*, 1996), herbicidas (Lee *et al.*, 2000) o inclusive a especies vegetales utilizadas con fines terapéuticos sin conocer sus actividades citotóxicas como genotóxicas (Fernández *et al.*, 1999).

Ensayos anteriores han demostrado que las hojas de *B. forficata* tienen elevada concentración de flavonoides y compuestos fenólicos, ya sean en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Oliveira *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2006; Sartorelli y Correa, 2007; Menezes *et al.*, 2007; Düsman *et al.*, 2013), lo que conlleva a que es un buen antioxidante. Por todo esto expuesto, esta investigación se realiza para la búsqueda de la posible acción antimutagénica del extracto etanólico de las hojas de *B. forficata* que permita una considerable disminución de los efectos negativos que ejercen los agentes genotóxicos sobre el material genético y de esa manera incorporaría un gran aporte a la farmacopea paraguaya (conocimiento medicinal tradicional).

### **1.3. Hipótesis:**

“El extracto etanólico de las hojas de *B. forficata* a cierta concentración exhibe actividad antimutagénica ante la inducción a mutaciones en alas de individuos de *D. melanogaster*”

## **2. MARCO TEÓRICO O MARCO REFERENCIAL**

### **2.1. Efecto antigenotóxico de productos vegetales**

Los agentes físicos o químicos son capaces de inducir cambios en el material genético (ADN) de las células, como ser cambios heredables, deleciones, inversiones, recombinaciones u otros tipos de mutaciones, de esta manera estos agentes pasan a ser llamados mutágenos y de acuerdo a la dosis del agente genotóxico la frecuencia de aparición de las mutaciones está en proporción directa a la exposición (Moreno *et al.*, 2002).

El cáncer en sus etapas iniciales se debe principalmente a mutaciones y en variados estudios realizados se destacan dos procesos íntimamente relacionados, la mutagénesis y la carcinogénesis (Hollstein y Shomer, 1996). A partir de estos estudios, la genética toxicológica se ha envuelto en la búsqueda de agentes que puedan evitar algunos efectos negativos sobre el material genético de los individuos, de esa manera, varios científicos han descubierto a los antimutágenos o antigenotoxinas (Arrebola *et al.*, 2009).

Una sustancia antimutagénica es aquella que tiene la capacidad de poder disminuir o evitar el daño mutacional del ADN en la célula (Kada, 1984).

Existen dos maneras de distinguir a los agentes antimutágenos, la sustancia que actúan en forma directa con la genotoxina, transformándola bioquímica o químicamente la estructura del mutágeno, a esta sustancia se las llaman desmutágenos (Kada *et al.*, 1986), mientras que la sustancia biológicamente activa, la cual obstruye las funciones celulares que decretan los procesos mutagénicos o reparación del ADN dañado, permitiendo una disminución de la frecuencia de las mutaciones inducidas o espontáneas, son llamadas bioantimutágenos (Simic *et al.*, 1997).

A través de estudios científicos y con los avances que han surgido en el campo de la química farmacéutica y farmacológica, se han conocido que los orígenes de ciertas drogas están relacionados con los vegetales, ya sea

de forma directa o indirecta, y por todo esto, las plantas, utilizadas ampliamente en la fitoterapia para el tratamiento de enfermedades y por su poder curativo y/o preventivo, siguen siendo consumidas en forma de té, infusiones, o decoctos, especialmente en el continente americano (De Carvalho *et al.*, 2001; Deguchi *et al.*, 2000).

Los antimutágenos obtenidos mediante estas formas de consumición constituyen un abastecimiento importante para la lucha contra el cáncer, ya que actúan como agentes quimiopreventivos (anticarcinógeno), y otros padecimientos de riesgo, como la mutagénesis (antimutágenos) (Deguchi *et al.*, 2000).

## **2.2. Descripción botánica de *Bauhinia forficata* Link**

El género *Bauhinia* posee aproximadamente 250 especies distribuidas en las regiones tropicales, el número más elevado de entidades se encuentra en el continente americano, siendo el área de la región amazónica de Perú y Brasil con la mayor diversidad específica (Fortunato, 1986).

La *B. forficata* es un árbol siempreverde, de hasta 10 m de altura. Tallos ramificados, con ramas pubescentes a glabras. Hojas bilobuladas, alternas, simples, con colores. Espítulas triangular-lanceoladas, pilosas, caedizas. Botón floral tubuloso, cilindroide, capitado, tomentoso o estrigoso, flores blancas, vistosas, pedicelo, bráctea y bractéolas triangulares a ovadas, caedizas con tricomas en la base de la cara adaxial; hipanto tubuloso a levemente campanulado, internamente glabra, de pétalos muy largos y angostos. Estambres fértiles 10, alternos. Frutos legumbres angostas, aplanadas, negras, abiertas en dos partes en la madurez; pocas semillas ovoides, crece en claros de bosques y en bordes de caminos y se distribuye en Alto Paraná, Amambay, Caaguazú, Central, Cordillera (Fortunato 1986; Pin *et al.*, 2009).

### 2.3. Composición fitoquímica de las hojas de *Bauhinia forficata* Link

*B. forficata* posee una variedad de compuestos como flavonoides, terpenoides y esteroides (Pereira *et al.*, 2014; Toloza y Fernández, 2015).

Estudios realizados al perfil fenólico de ambas subespecies de *Bauhinia forficata*, han demostrado la existencia de 72% de flavonoides en la subespecie forficata y 61%, en la de pruinosa (Ferrerres *et al.*, 2012)

Esta planta contiene aceites esenciales, saponinas, taninos, mucílago, catequinas, heteroglicósidos cianogenéticos, antocianinas, alcaloides y ácidos volátiles fijos (Pepato *et al.*, 2004).

Diversos estudios han destacado la presencia de canferitrina (canferol 3,7-diramnósido) en la subsp. *forficata* y su ausencia en la subsp. *pruinosa*, mientras que en esta última se destaca la presencia de rutina (quercetina-3-O-rutinósido), ambos, con propiedades hipoglicemiantes, ya que son flavonoides glicosilados (de Sousa *et al.*, 2004; Ferreres *et al.*, 2012).

El perfil cromatográfico del té de hojas de esta planta analizado por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC: High Performance Liquid Chromatography) reveló que contiene los siguientes compuestos principales kaempferol-3-O-(2-ramnosil) rutinósido (2)> quercetina-3-O- (2-ramnosil) rutinósido (1)> quercetina-3-O- rutinósido (3)> kaempferol-3-O-rutinósido (Salguiero *et al.*, 2016).

Otros investigadores con la técnica de HPLC acoplado al detector de arreglo de diodos (DAD), han encontrado en extractos de hojas de *Bauhinia forficata* los contenidos de kaempferitrin y 3,7-di-Orhamnopyranosyl quercetina (Da Cunha *et al.*, 2010; Pinheiro *et al.*, 2006.)

Además, esta técnica muestra información adicional debido a la presencia de compuestos antioxidantes, mediante las reacciones de óxido-reducción generadas en el detector electroquímico, los cuales podrían corresponder a otros compuestos fenólicos (catequina, epicatequina, ácido gálico) (Toloza y Fernández, 2015).

#### 2.4. Propiedades de la *Bauhinia forficata* Link

La etnobotánica de Chile, Brasil y Paraguay utilizan las decocciones de hojas y corteza de *B. forficata* como hipoglucemiante, laxativas, carminativas, astringente, tónico, depurativo y para combatir la disentería, diarrea, inflamaciones, infecciones de la piel, afecciones del hígado (Pin *et al.*, 2009; Toloza y Fernández, 2015).

Trabajos previos han comprobado que la decocción de hojas de *B. forficata* disminuye la concentración de glucosa en sangre de ratas *Wistar* con diabetes inducida por estreptozotocina y no produce efectos tóxicos medibles con los marcadores enzimáticos utilizados en el estudio (Pepato *et al.*, 2004).

Estudios han indicado que el extracto acuoso de sus hojas son fuente potencial de antioxidantes naturales y puede ser útil para prevenir las complicaciones diabéticas inducidas por el estrés oxidativo, además posee acción antimicrobiana, antiproliferativa y de apoptosis (da Silva y Filho, 2002; Lim *et al.*, 2006).

El potencial citotóxico y antimutagénico del extracto acuoso de hojas de *B. forficata* se evaluó en células de médula ósea de ratas *Wistar* tratadas *in vivo* y por la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos, se demostró que tiene actividad antioxidante, permitiendo la disminución de un porcentaje de alteraciones cromosómicas inducidas en forma simultánea por el agente quimioterapéutico Ciclofosfamida (Düsman *et al.*, 2013).

La actividad mutagénica y tóxica del extracto hidroalcohólico de hojas fue analizada empleando ensayos de micronúcleos en médula ósea de ratones albinos suizos, mediante la administración de dosis por medio intraperitoneal, concluyendo que el extracto hidroalcohólico, considerando las concentraciones, tiempo y sistemas de pruebas evaluadas, no es tóxico, ni presenta clastogenicidad. Sin embargo, ensayos adicionales de mutagenicidad se deben realizar para confirmar la hipótesis de uso seguro de la planta (Pereira *et al.*, 2014).

## **2.5. SMART (Test de Mutación Somática y de Recombinación)**

### **2.5.1. *Drosophila melanogaster* y sus aplicaciones en la Genética**

Thomas Hunt Morgan y sus colaboradores, adoptaron a la *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) como individuo modelo para su estudio desde el año 1910, aislando varios mutantes y analizando el mecanismo de herencia y arrojando la localización de los genes con respecto a otro en cromosomas sexuales (Sturtevant, 1913). Gracias a la fundamentación del organismo modelo de estudio de la mosca de la fruta hoy día se tienen bastos conocimientos de la genética, la elección de ella como espécimen modelo es a causa de su fácil manejo y económicamente no lleva mucho gasto, posee solo 4 pares de cromosomas y, además, permite la obtención de varias generaciones en cortos periodos de tiempos (Petitpierre, 1997).

La mosca de la fruta sigue manteniendo su estatus de organismo modelo en las investigaciones genéticas o referentes a ellas, porque posee genes que son homólogos a los genes humanos arrojando datos interesantes en la comprensión de los roles que juegan estos genes (Deepa Parvathi *et al.*, 2011).

Muchos investigadores utilizan a este individuo como modelo para estudiar la organización de los genes y casi todos los aspectos de la biología de los organismos eucariotas, así como también la biología del desarrollo y la biología de la conducta (Deepa Parvathi *et al.*, 2011).

El genoma de la mosca de la fruta ha sido secuenciado, identificándose más de 13.000 genes y proporcionado así un recurso invaluable para los biólogos de la mosca. Los estudios en *Drosophila* permitieron la identificación de muchos genes necesarios para el desarrollo embrionario (Genes Hox). En ensayos realizados en ratones, ha permitido demostrar que los homólogos de muchos de estos genes secuenciados son importantes para el desarrollo de los mamíferos. Todos estos componentes han conducido a la amplia utilización de la *Drosophila* para investigaciones con respecto a la mutación y la toxicología genética (Anne y Erika, 1996).

Gracias al desarrollo de la técnica SMART (Test de Mutación Somática y de Recombinación), la *Drosophila melanogaster* ha tomado mayor importancia en la evaluación de genotoxinas y antígenotoxinas, debido a que

los resultados hallados en este bioensayo pueden ser extrapolables a los humanos «*Homo sapiens sapiens*» por la homología genética existente entre estas dos especies (Deepa Parvathi *et al.*, 2011).

### **2.5.2. Test SMART (Test de Mutación Somática y de Recombinación) en alas de *Drosophila melanogaster***

De los innumerables ensayos disponibles para la determinación de la genotoxicidad y antigenotoxicidad, la prueba SMART en *Drosophila melanogaster*, tiene algunas características que lo hacen muy adecuado para el cribado de las mismas, es decir, es un ensayo de bajo costo y fácil, usando un organismo eucariota *in vivo*. Una de las características de este ensayo es su capacidad para la detección de actividad genotóxica como antigenotóxica, actividad promutágenos y procarcinógenos, sin la necesidad de activación metabólica exógena (Ashburner, 1989).

Esta prueba, también conocida como la prueba de la mancha del ala, suministra un medio rápido para la evaluación del potencial genotóxico como antigenotóxico de una sustancia química que induce a la pérdida de heterocigosidad (LOH por sus siglas en inglés *Loss of Heterozygosity*), esto es ocasionado porque la sustancia puede inducir una mutación génica, una reorganización cromosómica, la rotura de cromosomas, o la pérdida de cromosomas tantos enteros como fragmentos de los mismos, también es causante de la recombinación mitótica o somática. Es importante destacar que estudios recientes señalaron que la mayoría de los procesos iniciales de cáncer, la activación de los protooncogenes o supresión de genes tumorales se originan por procesos de recombinación somática (Deepa Parvathi *et al.*, 2011; Young *et al.*, 2006).

La técnica SMART en sí consiste en la cruce de dos cepas de *Drosophila melanogaster* que presentan marcadores recesivos en las células de las alas generando un fenotipo no silvestre en el tipo de pelos de las alas, estas pueden ser del tipo *mwh* (*multiple wing hair* = pelos múltiples de las alas), en donde las células del ala, poseen pelos múltiples que pueden ser de a tres, de a cuatro, de a cinco o hasta inclusive de a seis pelos por cada célula,

o pelos del tipo *flr<sup>3</sup>* (*flare* = llamarada) este fenotipo presenta un solo pelo por cada célula, pero estos pelos son semejantes en morfología bajo el microscopio a una llama o de una fogata (Deepa Parvathi *et al.*, 2011).

La cepa de *Drosophila melanogaster* con el marcador recesivo de los pelos múltiples en el ala es la *mwh/mwh*, esta mutación radica en el cromosoma 3 en la región 0.3 (*mwh*, 3-0.3), y la que posee el marcador recesivo *flr<sup>3</sup>* es la cepa *flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, rip<sup>p</sup>sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> y Bd<sup>S</sup>*, esta mutación también en el cromosoma 3, pero en la región 38.8 (*flr<sup>3</sup>*, 3-38.8). Existe diferencia morfológica entre estas dos cepas y es que la cepa *mwh/mwh* posee el extremo distal de las alas enteras, sin embargo, la cepa *flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, rip<sup>p</sup>sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> y Bd<sup>S</sup>* tiene recortadas (Deepa Parvathi *et al.*, 2011).

Los individuos adultos, llamados individuos de la primera generación (Filial 1), generados a partir de la cruce entre hembras *flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, rip<sup>p</sup>sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> y Bd<sup>S</sup>* y machos *mwh/mwh*, son genóticamente heterocigotas TM3 y trans-heterocigotas *mwh+/+flr3*, estas larvas poseen entre 10 a 30 células del disco imaginal del ala que son los blancos de ataques de los xenobióticos (sustancias sintetizadas en el laboratorio) y de las sustancias de origen naturales, causando la pérdida de la heterocigosidad en estas larvas, ocasionando que aparezcan las mutaciones en las alas, luego que estas se conviertan en imagos (individuos adultos) (Graf *et al.*, 1992). Es trascendental destacar que este grupo de células imaginales son las que darán, en los individuos adultos, origen a las alas, y cada ala posee 30 000 células aproximadamente (Deepa Parvathi *et al.*, 2011).

En un grupo de moscas de la fruta, químicamente tratadas, el número total de mutaciones inducidas, arrojan datos cuantitativos relativos a la actividad genotóxica del compuesto en su totalidad, en tanto que los tipos de clones (mutaciones detectadas) pueden revelar los mecanismos genéticos que intervinieron en la producción de estas mutaciones en las alas (Deepa Parvathi *et al.*, 2011).

Los tipos de clones que se encuentran en los análisis de las alas de los organismos Trans-heterocigotas *mwh+/+flr<sup>3</sup>* tanto en estudios genotóxicos

como antigenotóxicos son; Manchas Simples Pequeñas (MSP) son 1 a 2 células del ala en las que poseen el fenotipo mutante (manchas *mwh* o *flr<sup>3</sup>*); Manchas Simples Grandes (MSG), otro clon observado en los análisis y son 3 o más células del ala que se encuentra afectada por fenotipos mutantes (manchas *mwh* o *flr<sup>3</sup>*). Estos clones aparecen debido a varios fenómenos genéticos que afectan al cromosoma 3, como por ejemplo una delección, una mutación puntual, un evento de no disyunción cromosómica, o por una recombinación mitótica; otro tipo de clon observado es el de la Mancha Gemela (MG), este tipo de mutación es poco frecuente en los análisis y es ocasionada por un solo tipo de evento cromosómico, el de la recombinación mitótica (Deepa Parvathi *et al.*, 2011).

En la descendencia de Heterocigotas TM3 luego del tratamiento solo se observan 2 tipos de clones y con frecuencias de aparición muy baja, estas son las Manchas Simples Pequeñas y Grandes (MSP y MSG), debido a eventos mutagénicos en el cromosoma 3, como delecciones, mutaciones puntuales, o no disyunción. En estos individuos, al no poseer el gen recesivo de la mutación tipo *flr<sup>3</sup>*, las Manchas Gemelas (MG) no son observadas (Deepa Parvathi *et al.*, 2011).

Los datos cuantitativos obtenidos luego del conteo de los clones, las cuales son las frecuencias de aparición de las mutaciones (clon), son examinados con un análisis estadístico del tipo Binomial Condicional (Test de Kastenbaum-Bowman), el cual arroja diagnósticos certeros y precisos para el análisis o el tipo de estudio en cuestión (Graf *et al.*, 1992).

## **2.6. Papel del Peróxido de Hidrógeno**

Louis Jacques Thenard, científico francés, cuando hizo reaccionar el Peróxido de Bario con ácido nítrico, descubrió el Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o agua oxigenada. Richard Wolffenstein, obtuvo el  $H_2O_2$  de manera pura gracias a la destilación al vacío, es un líquido incoloro, pero ligeramente más viscoso que el agua, debido a la gran cantidad de enlaces de hidrógeno (Wisniak, 2002).

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un agente oxidante inestable de gran uso, ampliamente difundido. Se presenta en concentraciones del 3 - 60%, según su uso antiséptico o industrial (Torres *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que el efecto causado por la generación de los radicales hidroxilos y por otras especies reactivas de oxígeno sobre la estructura del ADN es nocivo, ya que promueve la ruptura entre los fosfatos de la doble cadena debido a la inestabilidad de la misma, ocasionando mayores daños a nivel de cromatina, generando transcripciones erróneas de información genética y subsecuentes alteraciones a la estructura general de las células y los tejidos (Conde, 2004).

En estudios más específicos se ha demostrado que el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en concentraciones extremas, median el daño celular. Los tejidos vivos, las membranas lipídicas, enzimas y el ADN de células, sufren daños irreversibles que están relacionados con enfermedades crónicas debido al estrés oxidativo producido (Kontogiorgis *et al.*, 2010).

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un agente genotóxico, que es capaz de producir modificaciones de las características particulares del ADN, capaz de dar lugar a múltiples reacciones, llegando a producir un daño celular al encontrarse en elevadas cantidades, ocurre sobre diferentes macromoléculas, tal es el caso de lípidos, proteínas y ADN, conociéndose a este daño como estrés oxidativo. En el ADN, el estrés oxidativo puede dar lugar a fenómenos como mutaciones y carcinogénesis. Los linfocitos humanos periféricos representan una población celular donde el ADN está predominantemente en la etapa pre-sintética del ciclo celular, fase  $G_0$  (Camacho *et al.*, 2010).

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Diseño metodológico:

La investigación comprende un estudio experimental analítico puro de corte transversal, con un diseño en bloques al azar.

#### 3.2. Criterios de Exclusión:

Durante el análisis microscópico y conteo, segmento por segmento (Anexo A<sub>1</sub>) no se tomaron en cuenta aquellas células del ala que poseían solo 2 tricomas pilosos y que no se encontraba rodeada por alguna célula con 3 o más tricomas pilosos (Anexo A<sub>2</sub>).

#### 3.3. Criterios de inclusión:

Durante el análisis microscópico y conteo se tomaron en cuenta a:

1. Manchas pequeñas simples (MSP) que incluyen 1 o 2 células (*mwh* o *flr<sup>3</sup>*) (Anexo A<sub>3</sub> y A<sub>4</sub>).
2. Manchas simples grandes (MSG) de más de 3 células (*mwh* o *flr<sup>3</sup>*) (Anexo A<sub>5</sub>).
3. Manchas gemelas (MG) con un área *mwh* y otra *flr<sup>3</sup>* adyacentes (Anexo A<sub>6</sub>).

#### 3.4. Variables:

**3.4.1. Independientes:** Diluciones del extracto etanólico de la *Bauhinia forficata*.

**3.4.2. Dependientes:** Índice de pelos mutados en alas (conteo de las manchas mutantes «*mwh*, *flr<sup>3</sup>* o ambas» en el par de alas).

### 3.5. Colecta de ejemplar

Las muestras vegetales fueron colectadas del vivero de plantas medicinales (-25.253529,-57.567852) (Anexo B) del Jardín Botánico y Zoológico de Asunción en estado estéril (sin flor), y fueron depositadas en el laboratorio de Recursos Vegetales FACEN para la identificación taxonómica por especialistas (Anexo C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>).

### 3.6. Identificación taxonómica

La identificación taxonómica se realizó en el Laboratorio de Recursos Vegetales de la FaCEN (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales), utilizando claves de identificación taxonómica y base de datos de Fortunato (1986) (Anexo D).

### 3.7. Preparación del extracto etanólico de *Bauhinia forficata* Link

Las muestras vegetales (hojas) fueron secadas a temperatura ambiente de entre 19°- 21°C (Anexo E<sub>1</sub>). Las hojas secas fueron trituradas con ayuda de un molino manual de granos hasta que quedaron pulverizadas (Anexo E<sub>2</sub>). De esta se pesó 500 gramos (g) (Anexo E<sub>3</sub>) y se disolvió en 2 litros (L) de etanol destilado al 70% durante 30 días (cada 48 horas se precedió al agitación o removido del recipiente) a temperatura ambiente (Anexo E<sub>4</sub>), posteriormente, el macerado se filtró con ayuda de gasa y algodón (Anexo E<sub>5</sub>), separando de esta manera la parte líquida del residuo. La concentración del extracto etanólico se hizo mediante un evaporador rotativo de la marca QUIMIS® (Anexo E<sub>6</sub>) a una temperatura de 80 °C, luego de esto se procedió al calentamiento con ayuda de baño maría (Anexo E<sub>7</sub>) con una temperatura de 80°C, calentamiento directo (Anexo E<sub>8</sub>) también a una temperatura de 80 °C y, por último, baño maría (80 °C), para eliminar totalmente el alcohol de la muestra, obteniéndose una masa viscosa de color verdoso oscuro, aroma dulce. El rendimiento fue de 5,05% y fue conservada a 4 °C en heladera, marca mabe®.

### 3.8. Determinación de la dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>) del Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Se evaluó en dos etapas: En la primera, se usaron concentraciones de 50, 500 y 1000 µL del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 2 mL de agua destilada, para obtener una concentración de 0,12; 1,2 y 2,4 M respectivamente y en la segunda etapa, concentraciones de 25, 50, 100, 200, 300 y 400 µL del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 4 mL de agua destilada, para conseguir concentraciones de 0,06; 0,12; 0,24; 0,48; 0,72 y 0,96 M correspondientemente (Anexo F<sub>1</sub>). En ambas etapas se sometieron a 100 larvas de tercer instar, obtenidas mediante cruce estándar.

Se consiguieron 320 hembras vírgenes de *Drosophila melanogaster* (cepa *flr<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3, ri p<sup>o</sup>sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> y Bd<sup>S</sup>*) en condiciones normales de temperatura ambiente (22°-24° C) (Anexo F<sub>2.1</sub>). Las hembras obtenidas se cruzaron con 160 machos vírgenes de *Drosophila melanogaster* (cepa *mwh/mwh*) (Anexo F<sub>2.2</sub>), que se depositaron en cuatro frascos diferentes (con 80 hembras y 40 machos, respectivamente, todas las cruces fueron depositadas en un medio ovopositor (Graf *et al.*, 1984), por 72 horas. (Anexo F<sub>3</sub>)

Pasada las 72 horas se procedió a la extracción de 1000 larvas de tercer estadio (tercer instar), las cuales fueron depositadas en nueve frascos (100 larvas cada una) con medio instantáneo preparado en el momento del traspaso de las larvas con 1,5 g de puré de papa Knorr®, rehidratado con 5 mL de las siguientes soluciones; 0,12 M de Peróxido de Hidrógeno (C<sub>1.1</sub>), 1,2 M de peróxido de hidrógeno (C<sub>1.2</sub>), 2,4 M de Peróxido de Hidrógeno (C<sub>1.3</sub>), 0,06 M de Peróxido de Hidrógeno (C<sub>2.1</sub>), 0,12 M de Peróxido de Hidrógeno (C<sub>2.2</sub>), 0,24 M de Peróxido de Hidrógeno (C<sub>2.3</sub>), 0,48 M de Peróxido de Hidrógeno (C<sub>2.4</sub>), 0,72 M de Peróxido de Hidrógeno (C<sub>2.5</sub>) y 0,96 M de Peróxido de Hidrógeno (C<sub>2.6</sub>) y un frasco (100 larvas) con medio instantáneo preparado en el momento del traspaso de las larvas con 1,5 g de puré de papa Knorr®, rehidratado con 5 mL de agua destilada (control negativo). Estos frascos fueron sometidos a tratamiento agudo para la determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del Peróxido de Hidrógeno (Graf *et al.*, 1984). (Anexo F<sub>4</sub>)

Como parámetro de la toxicidad del Peróxido de Hidrógeno, se utilizó el porcentaje de sobrevivencia de los individuos tratados, considerando como dosis tóxica cuando el porcentaje de sobrevivencia sea menor a 50% y una dosis sub tóxica cuando el porcentaje de sobrevivencia sea mayor al 50%.

### **3.9. Test de Mutación Somática y Recombinación (SMART) para genotoxicidad del extracto etanólico de *Bauhinia forficata***

Se obtuvieron 150 hembras vírgenes de *Drosophila melanogaster* (cepa *flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, ri p<sup>o</sup>sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> y Bd<sup>S</sup>*) en condiciones normales de temperatura ambiente (22°- 24° C). Las hembras obtenidas se cruzaron con 75 machos de *Drosophila melanogaster* (cepa *mwh/mwh*), que se depositaron en tres frascos diferentes (con 50 hembras y 25 machos, respectivamente), todas las cruas fueron depositadas en un medio ovopositor (Graf *et al.*, 1984), por 72 horas. (Anexo G<sub>1</sub>)

Las diferentes soluciones del extracto etanólico se obtuvieron mediante digregado por ultrasonido (Sonorex RK106S, de la marca Bandelin®) por 2 minutos a una temperatura de 20 °C. (Anexo G<sub>2.1</sub>; G<sub>2.2</sub> y G<sub>2.3</sub>)

Pasada las 72 horas se procedió a la extracción de 600 larvas de tercer estadio (tercer instar), las cuales fueron depositadas en cinco frascos (100 larvas cada una) con medio instantáneo preparado en el momento del traspaso de las larvas con 1,5 g de puré de papa Knorr®, rehidratado con 5 mL de las siguientes soluciones del extracto etanólico; 10,01 mg.mL<sup>-1</sup>, 25,50 mg.mL<sup>-1</sup>, 52,01 mg.mL<sup>-1</sup>, 75,41 mg.mL<sup>-1</sup> y 101,76 mg.mL<sup>-1</sup> y un frasco (100 larvas) con medio instantáneo preparado en el momento del traspaso de las larvas con 1,5 g de puré de papa Knorr®, rehidratado con 5 mL de Tween 80 al 0,1%. Todos estos frascos fueron sometidos a tratamiento crónico para la determinación de la toxicidad del extracto etanólico (Graf *et al.*, 1984) (Anexo G<sub>3</sub>). Todos estos tratamientos se realizaron hasta la eclosión de los adultos trans-heterocigotas *mwh+/+flr<sup>3</sup>* y heterocigotas TM3.

### **3.10. Test de Mutación Somática y Recombinación (SMART) para determinar el efecto antimutagénico del extracto etanólico de *Bauhinia forficata* frente al Peróxido de Hidrógeno**

Para esta parte se obtuvieron 277 hembras vírgenes de *Drosophila melanogaster* (cepa *flr<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3, ri p<sup>o</sup>sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> y Bd<sup>S</sup>*) en condiciones normales de temperatura ambiente (22°-24° C). Las hembras obtenidas se cruzaron con 138 machos de *Drosophila melanogaster* (cepa *mwh/mwh*), que se depositaron en seis frascos diferentes (con 40 hembras y 20 machos) y un frasco (con 37 hembras y 18 machos), todas las cruces fueron depositadas en un medio ovopositor (Graf *et al.*, 1984) (Anexo H).

Se procedió a la extracción de 700 larvas de tercer estadio (tercer instar), de las cuales 500 fueron expuestas a diferentes tratamientos crónicos, 100 fueron tratadas por una hora con el agente mutágeno, pasada esa hora se procedió a lavarlas con agua destilada a modo de deshacer restos del mutágeno y fueron transferidas a otro medio que contenía el extracto etanólico y otras 100 fueron tratadas por una hora con el agente mutágeno, luego de esa hora, a modo de deshacer restos del mutágeno se procedió a lavarlas con agua destilada y fueron transferidas a otro medio que contenía solo agua destilada. También se extrajeron 100 larvas de segundo estadio (segundo instar) para ser sometidas por 72 horas con el extracto etanólico, después de ese tiempo se lavaron las larvas con agua destilada, para de esa manera eliminar los restos del extracto y fueron trasladadas a otro medio, para ser sometidas por 48 horas con el agente mutágeno. Todos los medios fueron preparados con 1,5 g de puré de papa instantáneo Knorr®, rehidratados con las diferentes sustancias testadas (Tabla 1) (Anexo I)

Tabla 1: Diseño metodológico de los tratamientos

Unidad Experimental	Número de larvas	Tratamientos	Pretratamiento	Postratamientos
<b>Tratamiento simple</b>	<b>100</b>	5 mL de Agua destilada (A)		
	<b>100</b>	5 mL de extracto etanólico (52,01 mg.mL <sup>-1</sup> ) (B)	—	—
	<b>100</b>	5 mL de Tween 80 al 0.1% (C)		
	<b>100</b>	5 mL Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) (D)		
<b>Tratamiento combinado</b>	<b>100</b>	5 mL Extracto etanólico de extracto etanólico (52,01 mg.mL <sup>-1</sup> ) junto con el Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) (E)	—	—
<b>Pretratamiento con el agente mutágeno</b>	<b>100</b>		5 mL de Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) tratado por una hora	5 mL de Extracto etanólico (52,01 mg.mL <sup>-1</sup> ) por 48 horas (F)
<b>Pretratamiento con el Extracto</b>	<b>100</b>		5 mL de Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) tratado por una hora	5 mL de Agua destilada (H)
	<b>100 (2do. Estadio)</b>		5 mL de Extracto etanólico (52,01 mg.mL <sup>-1</sup> ) por 72 horas	5 mL de Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) tratado por 48 horas (G)

### 3.11. Procedimientos para el análisis de las láminas

Una vez que las moscas adultas eclosionaron, se procedió a la muerte de los mismos por sobredosis con Éter Etílico, y se seleccionaron al azar 10 individuos trans-heterocigotas *mwh+/*flr3** de cada tratamiento (5 individuos

de cada sexo), de las cuales se extrajeron las alas con ayuda de una Lupa estereoscópica Carl Zeiss® y se las montaron (20 alas por lámina y por tratamiento) con Solución de Faüre (Goma arábica 300 g, Glicerol 20 mL, Hidrato de Cloral 50 g, y Agua destilada 50 mL). La observación de las láminas con las alas correspondientes se realizó con ayuda del microscopio óptico Olympus® a un aumento de 400X (400 veces más), los sectores o regiones de las alas analizadas fueron solamente las regiones A, B, C', C, D', D y E, también los márgenes que las separa (Anexo J).

Se cuantificó el índice de aparición de las manchas mutantes en los pares de alas analizadas. Se clasificó las manchas según los criterios de inclusión y exclusión.

### **3.12. Índice del porcentaje de reducción de una sustancia ensayada frente a un potente mutágeno**

Se calculó la diferencia de mutaciones entre el mutágeno sólo y el combinado (Sustancia + Mutágeno) referido al mutágeno y se expresó en porcentaje empleando la siguiente ecuación:

$$\left\{ \frac{TM \text{ con el agente mutágeno} - (TM \text{ con el extracto} + agente \text{ mutágeno})}{TM \text{ con el agente mutágeno}} \right\} * 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Donde;

TM: Total de mutaciones

### **3.13. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se analizaron mediante tablas estadísticas de acuerdo con Frei y Würigler (1988) que corresponde a un modelo estadístico Binomial Condicional (Test de Kastenbaum-Bowman)  $\alpha=\beta=0,05$  (Kastenbaum y Bowman, 1970). Los gráficos estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 6.00, La Jolla California USA.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Determinación de la DL<sub>50</sub> del Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

En el tratamiento de las larvas con el Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a una concentración de 0,12 M sobrevivieron el 75% de las moscas, en la de 1,2 M, el 26% y en la de 2,4 M, 4%, mientras que en el tratamiento con el Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a una concentración de 0,06 M sobrevivieron 82% de las moscas, en la de 0,12 M, el 82%; en la de 0,24 M, el 69%; en la de 0,48 M, el 69%; en la 0,72 M, el 64% y en la de 0,96 M, el 48% y en el tratamiento con Agua destilada sobrevivieron 95% de moscas (Tabla 2 y Figura 1).

Con estos resultados se determinó que la DL<sub>50</sub> del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está en una concentración de 0,96 M (400 µL del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 4 mL de agua destilada), ya que en esa concentración han sobrevivido 48 moscas, lo cual indica que han muerto 52 moscas, generando así, aproximadamente un 50% de supervivencia (Tabla 2 y Figura 1).

**Tabla 2: Tratamiento agudo de larvas de *D. melanogaster* con Peróxido de Hidrógeno.**

CONCENTRACIONES	Porcentaje de moscas adultas	Porcentaje de moscas muertas
<b>Primer tratamiento</b>		
(H <sub>2</sub> O)d	95	5
C 1.1 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,12 M)	76	24
C 1.2 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1,2 M)	26	74
C 1.3 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2,4 M)	4	96

Segundo tratamiento		
C 2.1 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,06 M)	82	18
C 2.2 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,12 M)	82	18
C 2.3 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0, 24 M)	69	31
C 2.4 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0, 48 M)	69	31
C 2.5 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,72 M)	64	36
C 2.6 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,96 M)	48	52

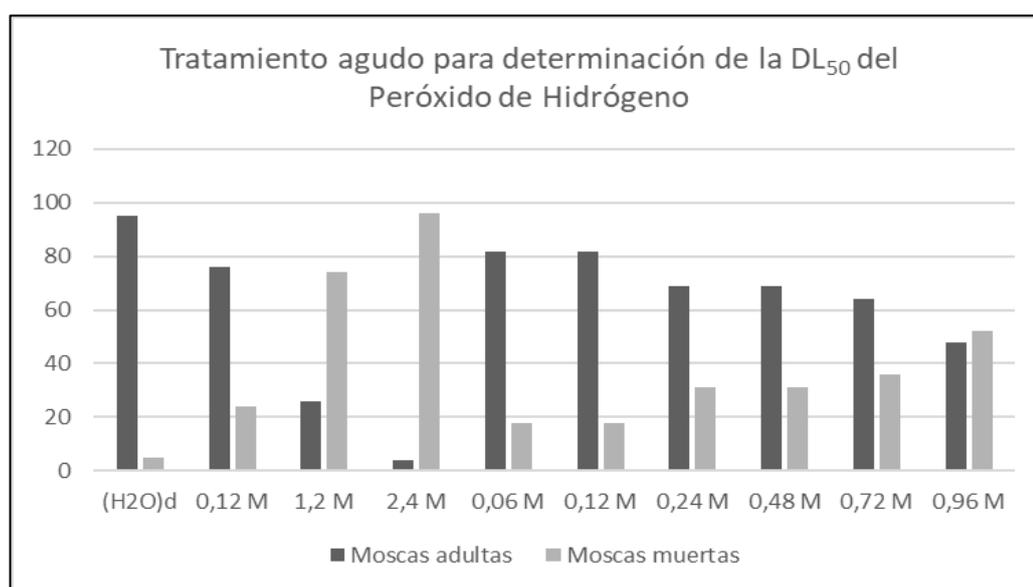


Figura 1: Tratamiento agudo de larvas de *D. melanogaster* con Peróxido de Hidrógeno

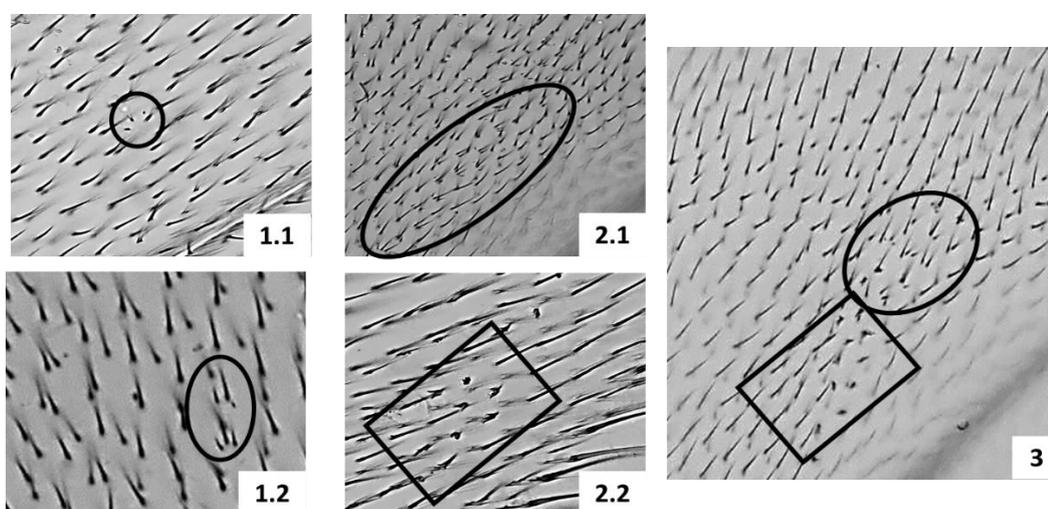
Para los ensayos de antigenotoxicidad, Jiménez (2013) uso como dosis adecuada del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> una concentración de 50  $\mu$ L.(4mL<sup>-1</sup>), lo que equivale a 0,12 M, para determinar esa dosis, sometió a 100 larvas de *Drosophila melanogaster* mediante barrido grueso [50, 500 y 1000  $\mu$ L. (2mL<sup>-1</sup>)] y a 200 larvas de *Drosophila melanogaster* mediante barrido fino [25, 50, 100, 200, 300 y 400  $\mu$ L.(4mL<sup>-1</sup>)]. Pinedo Torres (2010) para el Ensayo Cometa de los linfocitos extraídos de muestra sanguínea, de ratas albinas, cepa Holtzmann, uso 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pérez (2017) uso fibroblastos de murciélagos de dos especies, *Diphylla ecaudata* y *Desmodus rotundus*. El primero es más susceptible a daño por estrés oxidante, puesto que a partir de concentraciones de 75  $\mu$ M (7,5 x10<sup>-5</sup> M) de Peróxido ya se llega a la dosis letal 50, mientras

que para el segundo es necesario emplear una dosis de 100  $\mu\text{M}$  ( $1 \times 10^{-4}$  M) para llegar a ese punto. Cápiro *et al.* (2001) usaron la línea celular CHO obtenida de ovario de *Cricetulus griseus* (Hamster chino), para demostrar el efecto protector (acción antioxidante) de la decocción de *Cymbogon citratus* (caña santa) frente al Peróxido de Hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) al  $5 \times 10^{-5}$  mol, y demostraron una disminución altamente significativa de la frecuencia de células portadoras de aberraciones cromosómicas. Martínez-Valdivieso *et al.* (sf) estudiaron la acción genotóxica de un extracto acuoso de *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* (calabacín) mediante el ensayo de mutaciones y recombinaciones somáticas en alas de *Drosophila melanogaster* (Somatic Mutation And Recombination Test o S.M.A.R.T.) y como control positivo usaron 0,12 M de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### **4.2. Determinación de toxicidad del extracto etanólico de *Bauhinia forficata* mediante el test de SMART**

En la concentración de 10,01  $\text{mg.mL}^{-1}$  se contaron 6 clones para manchas simples y pequeñas, 3 clones para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total de contaron 9 clones, con frecuencias de 0,6, 0,3, 0,0 y 0,9 respectivamente, en cuanto a la concentración de 25,50  $\text{mg.mL}^{-1}$  se contaron 9 clones para manchas simples y pequeñas, 2 clones para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total de contaron 11 clones, con frecuencias de 0,9, 0,2, 0,0 y 1,1 respectivamente, mientras que en la concentración de 52,01  $\text{mg.mL}^{-1}$  se contaron 6 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total de contaron 6 clones, con frecuencias de 0,6, 0,0, 0,0 y 0,6 respectivamente, no obstante en la concentración de 75,41  $\text{mg.mL}^{-1}$  se contaron 9 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, 1 clon para manchas gemelas, en total de contaron 10 clones, con frecuencias de 0,9, 0,0, 0,1 y 1,0 respectivamente, sin embargo en la concentración de 101,76  $\text{mg.mL}^{-1}$  se contaron 8 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas

gemelas, en total de contaron 8 clones, con frecuencias de 0,8, 0,0, 0,0 y 0,8 respectivamente, en comparación, en el tratamiento con Tween 80 (0,1 %) se contaron 3 clones para manchas simples y pequeñas, 1 clon para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total de contaron 4 clones, con frecuencias de 0,3, 0,1, 0,0 y 0,8 respectivamente y en el tratamiento con agua destilada se contaron 7 clones para manchas simples y pequeñas, 2 clones para mancha simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total de contaron 9 clones, con frecuencias de 0,35, 0,1, 0,0 y 0,45 respectivamente (Tabla 3 y Figura 2).



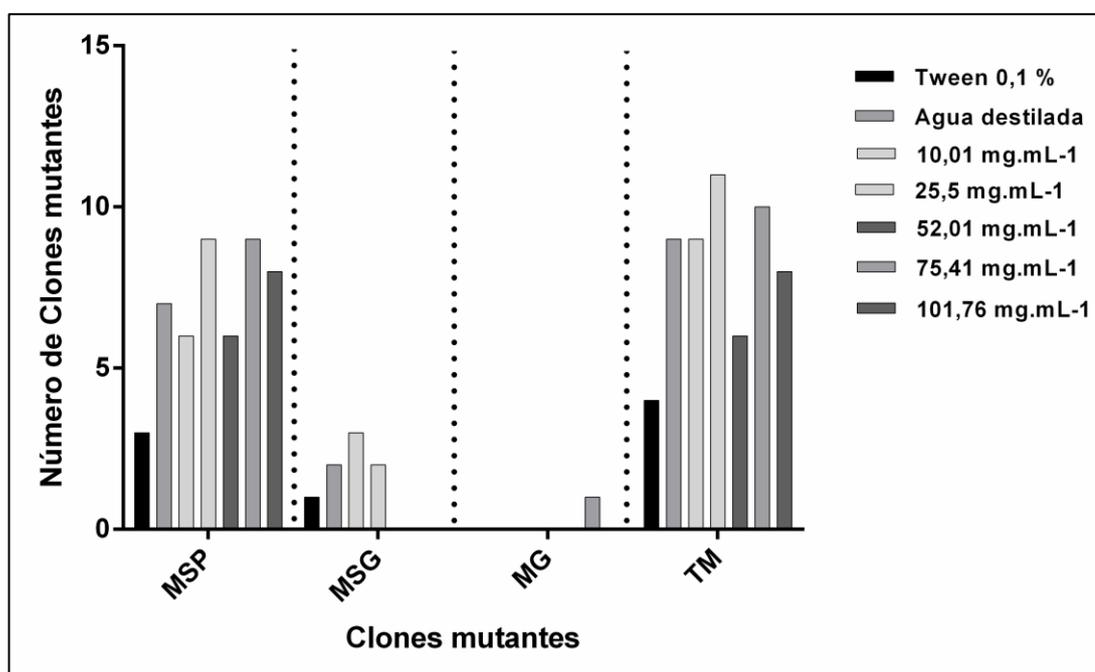
**Figura 2: Clones encontrados en alas de *D. melanogaster* tratadas para la determinación del potencial efecto genotóxico del extracto etanólico de *B. forficata*.** (1) Mancha Simple y Pequeña (MSP): Manchas de tipo *mwh* en tratamiento con 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> del extracto (1.1 y 1.2), (2) Mancha Simple y Grande (MSG): Manchas del tipo *mwh* (2.1) y manchas del tipo *flr*<sup>3</sup> (2.2) en tratamiento con 10,01 mg.mL<sup>-1</sup> del extracto y (3) Mancha Gemela (MG): Manchas del tipo *mwh* y *flr*<sup>3</sup> en tratamiento con 75,41 mg.mL<sup>-1</sup> del extracto. Las manchas del tipo *mwh* están enmarcados dentro del círculo y manchas del tipo *flr*<sup>3</sup> están enmarcados dentro del rectángulo. Aumento (400X). Microscopio Óptico Compuesto Motic®.

Como todos los resultados del extracto son inconclusos, se determinó la subtoxicidad del mismo, mediante el menor número de clones mutados presentes en las diferentes concentraciones, que en este caso es en la concentración de 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> (Tabla 3 y Figura 3).

**Tabla 3: Análisis estadístico del potencial genotóxico del extracto etanólico de *B. forficata*. Cruce estándar**

Tratamiento	N. de Alas	MSP	MSG		
		(1-2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 2	(>2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 5	MG <i>m</i> = 5	TM <i>m</i> = 2
<b>Tween 80</b>					
(0,1 %)	20	0,30 (03)	0,10 (01)	0,00 (00)	0,40 (04)
Agua destilada	20	0,35 (07)	0,10 (02)	0,00 (00)	0,45 (09)
<b>Concentraciones del extracto</b>					
10,01 mg.mL <sup>-1</sup>	20	0,60 (06) i	0,30 (03) i	0,00 (00) i	0,90 (09) i
25,5 mg.mL <sup>-1</sup>	20	0,90 (09) i	0,20 (02) i	0,00 (00) i	1,10 (11) i
52,01 mg.mL <sup>-1</sup>	20	0,60 (06) i	0,00 (00) i	0,00 (00) i	0,60 (06) i
75,41 mg.mL <sup>-1</sup>	20	0,90 (09) i	0,00 (00) i	0,10 (01) i	1,00 (10) i
101,76 mg.mL <sup>-1</sup>	20	0,80 (08) i	0,00 (00) i	0,00 (00) i	0,80 (08) i

a. Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia  $\alpha = \beta = 0,05$ ; b. Incluso las manchas simples flr<sup>3</sup> raras; c. Considerando los clones mwh para las manchas simples mwh y para las manchas gemelas.



**Figura 3: Potencial genotóxico del extracto etanólico de *B. forficata***

Alonso (2007) estudiando toxicidad aguda de un extracto acuoso liofilizado de *B. candidans* (estimada en 100 veces la dosis normal de una persona adulta) en ratones, determinaron como concentración ideal, una dosis

de 0,87 g.kg<sup>-1</sup>, ya que no arrojó ninguna muerte. Raj Kapoor *et al.* (2007) realizaron ensayos de toxicidad aguda de *B. variegata* en ratones y determinaron una DL<sub>50</sub> a 2,5 g.kg<sup>-1</sup>. Narayan *et al.* (2012) evaluaron la toxicidad aguda de varios extractos de *B. vahlii* en ratas y encontraron que dicha dosis debe ser superior a la dosis de 353 mg.kg<sup>-1</sup> de peso, ya que a esa concentración no hubo letalidad en animales usados en el experimento. Singh *et al.* (2016) ensayaron extracto de hoja de *B. variegata* en moluscos y establecieron una CL<sub>50</sub> igual a 5.98 mg.L<sup>-1</sup>.

#### **4.3. Determinación del efecto antimutagénico del extracto etanólico de *B. forficata* frente al Peróxido de Hidrógeno mediante el test de SMART**

Esto se realizó mediante la evaluación con cuatro tratamientos diferentes.

##### **4.3.1. Primer tratamiento**

En el tratamiento simple del extracto etanólico de *B. forficata* (52,01 mg.mL<sup>-1</sup>) (B) se contaron 6 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 6 clones, con frecuencias de 0,3, 0,0, 0,0 y 0,3 respectivamente; a su vez, en el tratamiento con el Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) (D) se contaron 19 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 19 clones, con frecuencias de 0,95, 0,0, 0,0 y 0,95 respectivamente; en cuanto al tratamiento con Agua destilada (A) se contaron 7 clones para manchas simples y pequeñas, 2 clones para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 9 clones, con frecuencias de 0,35, 0,1, 0,0 y 0,45 respectivamente y en el tratamiento con Tween 80 (0,1%) (C) se contaron 9 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 9 clones, con frecuencias de 0,45, 0,0, 0,0 y 0,45 respectivamente (Tabla 4).

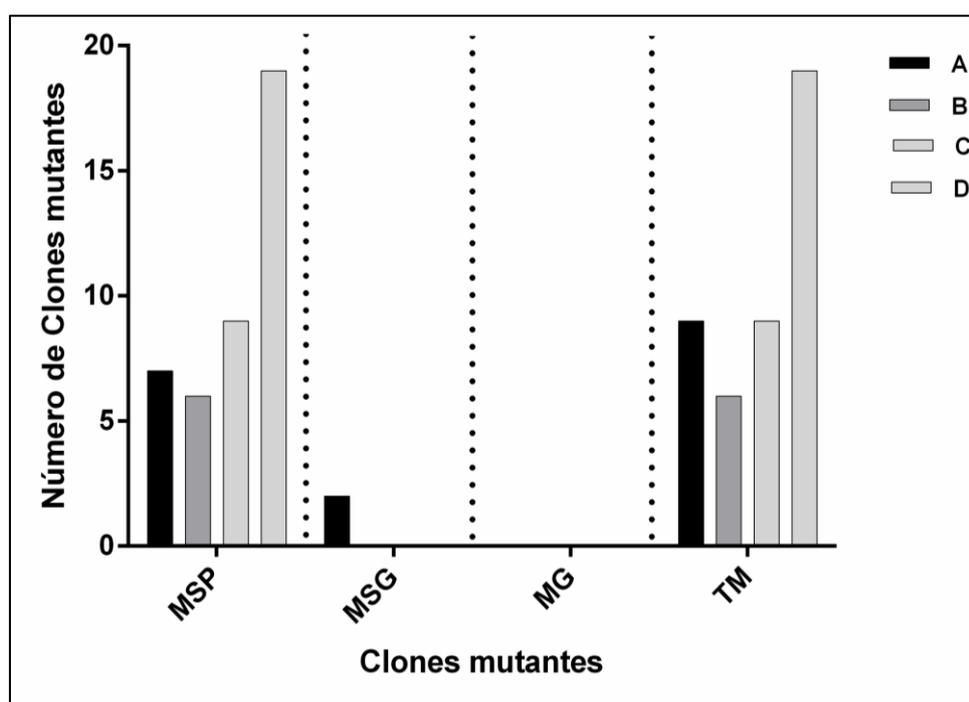
Este tratamiento demuestra que el extracto etanólico no posee efecto genotóxico, esto es debido a que muestra solo 6 clones mutantes, con una

frecuencia de 0,30 comparado con los 19 clones, con una frecuencia de 0.95, que muestra el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabla 4 y Figuras 4 y 8).

**Tabla 4: Análisis estadístico del potencial antigenotóxico del extracto de *B. forficata* frente al Peróxido de Hidrógeno mediante un tratamiento simple. Cruce estándar**

Tratamiento	N° de alas	MSP	MSG	MG	TM
		(1-2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 2	(>2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 5	<i>m</i> = 5	<i>m</i> = 2
A	20	0,35 (07)	0,10 (02)	0,00 (00)	0,45 (09)
B	20	0,30 (06) i	0,00 (00) I	0,00 (00) i	0,30 (06) -
C	20	0,45 (09) i	0,00 (00) I	0,00 (00) i	0,45 (09) i
D	20	0,95 (19) +	0,00 (00) I	0,00 (00) i	0,95 (19) +

a. Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia  $\alpha = \beta = 0,05$ ; b. Incluso las manchas simples flr<sup>3</sup> raras; c. Considerando los clones mwh para las manchas simples mwh y para las manchas gemelas. Donde (A) es Agua destilada, (B) es el extracto etanólico a una concentración de 52, 10 mg.mL<sup>-1</sup>, (C) es Tween 80 al 0,1 % y (D) es el Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M.



**Figura 4: Tratamiento simple para la determinación del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de *B. forficata*.** Donde (A) es Agua destilada, (B) es el extracto etanólico a una concentración de 52, 10 mg.mL<sup>-1</sup>, (C) es Tween 80 al 0,1 % y (D) es el Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M.

Pereira *et al.* (2014) demostró que el extracto hidroalcohólico de las hojas no presentaba actividad genotóxica, mediante el test de micronúcleos en ratones albinos (Swiss) usando concentraciones de 1000, 1500 y 2000 mg.kg<sup>-1</sup>. Camparoto *et al.* (2002) empleando células de la médula ósea de rata Wistar (*Rattus norvegicus*), tampoco encontró actividad citotóxica para el extracto acuoso de *B. forficata* en una concentración de 4,65 g.L<sup>-1</sup>. Pepato *et al.* (2004), recurriendo a ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina y post tratadas con el extracto acuoso de hojas de *B. forficata* a una concentración de 150 g.L<sup>-1</sup>, han demostrado que las mismas mejoran la actividad diabética sin causar daño tisular.

#### **4.3.2. Segundo tratamiento**

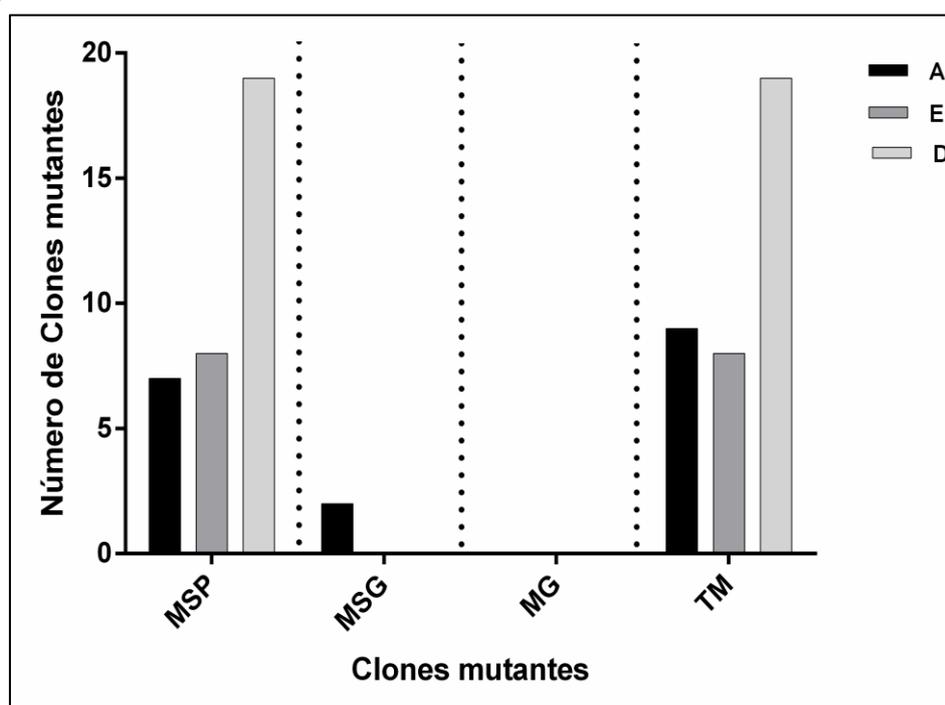
En el tratamiento combinado del extracto etanólico de *Bauhinia forficata* (52,01 mg.mL<sup>-1</sup>) más Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) (E) se contaron 8 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 8 clones, con frecuencias de 0,4, 0.0, 0.0 y 0,4 respectivamente; en cuanto al tratamiento con el Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) (D) se contaron 19 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 19 clones, con frecuencias de 0.95, 0.0, 0.0 y 0.95 respectivamente y en el tratamiento con Agua destilada (A) se contaron 7 clones para manchas simples y pequeñas, 2 clones para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 9 clones, con frecuencias de 0.35, 0.1, 0.0 y 0.45 respectivamente (Tabla 5).

El tratamiento combinado muestra resultados inconclusos, a pesar de tener menos cantidad de clones, en este caso 8 clones, con frecuencia de 0.40 comparado con los 19 clones, con frecuencia de 0,95 del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabla 5 y Figuras 5 y 8).

**Tabla 5: Análisis estadístico del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de *B. forficata* frente al Peróxido de Hidrógeno mediante un tratamiento combinado. Cruce estándar**

Tratamiento	N° de alas	MSP (1-2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 2	MSG (>2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 5	MG <i>m</i> = 5	TM <i>m</i> = 2	Inhibición (%)
A	20	0,35 (07)	0,10 (02)	0,00 (00)	0,45 (09)	
E	20	0,40 (08)	i 0,00 (00)	I 0,00 (00)	i 0,40 (08)	i 57,89
D	20	0,95 (19)	+ 0,00 (00)	I 0,00 (00)	i 0,95 (19)	+

a. Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia  $\alpha = \beta = 0,05$ ; b. Incluso las manchas simples *fir*<sup>3</sup> raras; c. Considerando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas. Donde (A) es Agua destilada, (E) es tratamiento combinado (extracto etanólico a una concentración de 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> junto con el Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M) y (D) es Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M.



**Figura 5: Tratamiento combinado para la determinación del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de *B. forficata*.** Donde (A) es Agua destilada, (E) es tratamiento combinado (extracto etanólico a una concentración de 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> junto con el Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M) y (D) es Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M.

La leve disminución en la cantidad de clones mutantes comparadas con las observadas en el tratamiento con el agente mutágeno, podría deberse, según Graf *et al.* (1984) y Jiménez (2013), a que la sustancia evaluada tiene

un efecto general sobre la actividad de la genotoxina. Ribeiro *et al.* (2013), demostraron también una actividad antimutagénica del extracto etanólico de *B. holophylla* a una concentración de  $7,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  en células del carcinoma hepatocelular (HepG2) registrándose una disminución del 76% en la frecuencia de micronúcleos inducidos por Benzopireno. Düsman *et al.* (2013) utilizando ratas Wistar y un extracto acuoso de hojas frescas de *B. forficata*, con una concentración de  $4,65 \text{ g.L}^{-1}$ , encontró para tratamiento combinado una reducción del 91,4% en las alteraciones cromosómicas inducidas por la Ciclofosfamida

#### **4.3.3. Tercer Tratamiento**

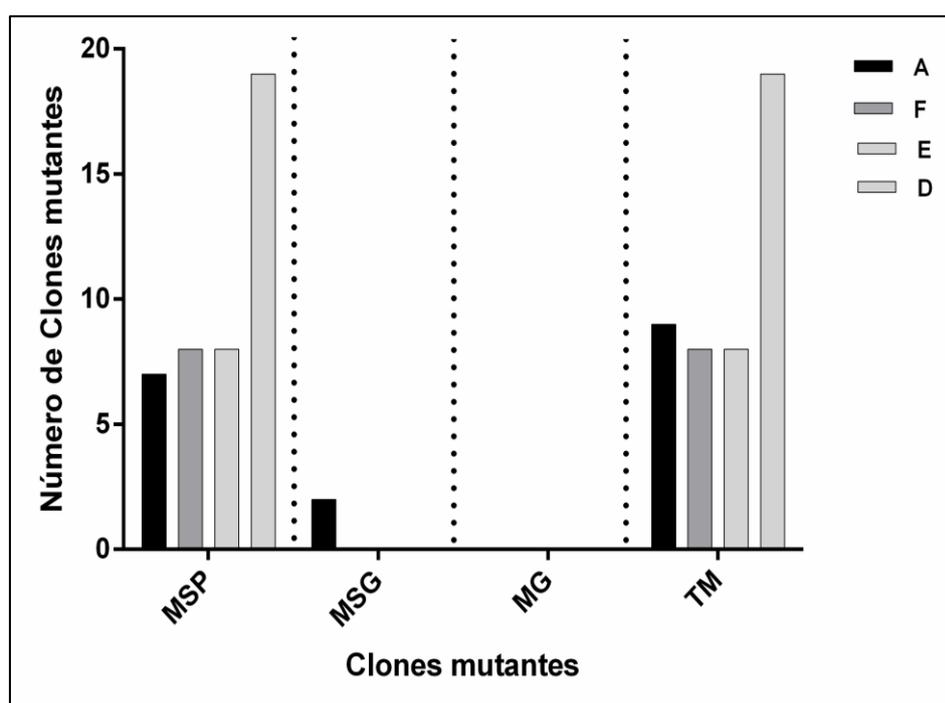
En el pretratamiento del Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) (1 h) con el extracto etanólico (48 h) (F) se contaron 8 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 8 clones, con frecuencias de 0,4, 0,0, 0,0 y 0,4 respectivamente; en tanto que en el tratamiento con el Peróxido de Hidrógeno (D) se contaron 19 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 19 clones, con frecuencias de 0,95, 0,0, 0,0 y 0,95 respectivamente; mientras que en el tratamiento con Agua destilada (A) se contaron 7 clones para manchas simples y pequeñas, 2 clones para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 9 clones, con frecuencias de 0,35, 0,1, 0,0 y 0,45 respectivamente y en el tratamiento combinado del extracto etanólico de *B. forficata* ( $52,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) más Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) (E) se contaron 8 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 8 clones, con frecuencias de 0,4, 0,0, 0,0 y 0,4 respectivamente (Tabla 6).

El pretratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  muestra resultado inconcluso, a pesar de tener menos cantidad de clones, en este caso 8 clones con frecuencia de 0,40 comparado con 19 clones con frecuencia de 0,95 del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Tabla 6 y Figuras 6 y 8).

**Tabla 6: Análisis estadístico del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de *B. forficata* frente al Peróxido de Hidrógeno mediante un post tratamiento con el extracto etanólico. Cruce estándar**

Tratamiento	N° de alas	MSP (1-2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 2	MSG (>2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 5	MG <i>m</i> = 5	TM <i>m</i> = 2	Inhibición (%)
A	20	0,35 (07)	0,10 (02)	0,00 (00)	0,45 (09)	
F	20	0,40 (08) i	0,00 (00) I	0,00 (00) i	0,40 (08) i	57,89
E	20	0,40 (08) i	0,00 (00) I	0,00 (00) i	0,40 (08) i	57,89
D	20	0,95 (19) +	0,00 (00) I	0,00 (00) i	0,95 (19) +	

a. Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia  $\alpha = \beta = 0,05$ ; b. Incluso las manchas simples flr<sup>3</sup> raras; c. Considerando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas. Donde (A) es Agua destilada, (F) es pretratamiento con Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M (1 h) y post tratado con extracto etanólico a una concentración de 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> (48 h), (E) es tratamiento combinado (extracto etanólico a una concentración de 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> junto con el Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M) y (D) es Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M.



**Figura 6: Pretratamiento con Peróxido de Hidrógeno para la determinación del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de *B. forficata*.** Donde (A) es Agua destilada, (F) es pretratamiento con Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M (1 h) y post tratado con extracto etanólico a una concentración de 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> (48 h), (E) es tratamiento combinado (extracto etanólico a una concentración de 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> junto con el Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M) y (D) es Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M.

La leve disminución en la cantidad de clones mutantes comparadas con las observadas en el tratamiento con el agente mutágeno, podría deberse según Graf *et al.* (1984) y Jiménez (2013), a que la sustancia probada interfiere sobre las lesiones inducidas y fijadas por la genotoxina. Düsman *et al.* (2013) utilizando un post tratamiento de extracto acuoso de hojas frescas de *B. forficata*, con una concentración de  $4,65 \text{ g.L}^{-1}$  en ratas Wistar, encontró una reducción del 94,6% en las alteraciones cromosómicas inducidas por la Ciclofosfamida.

#### **4.3.4. Cuarto Tratamiento**

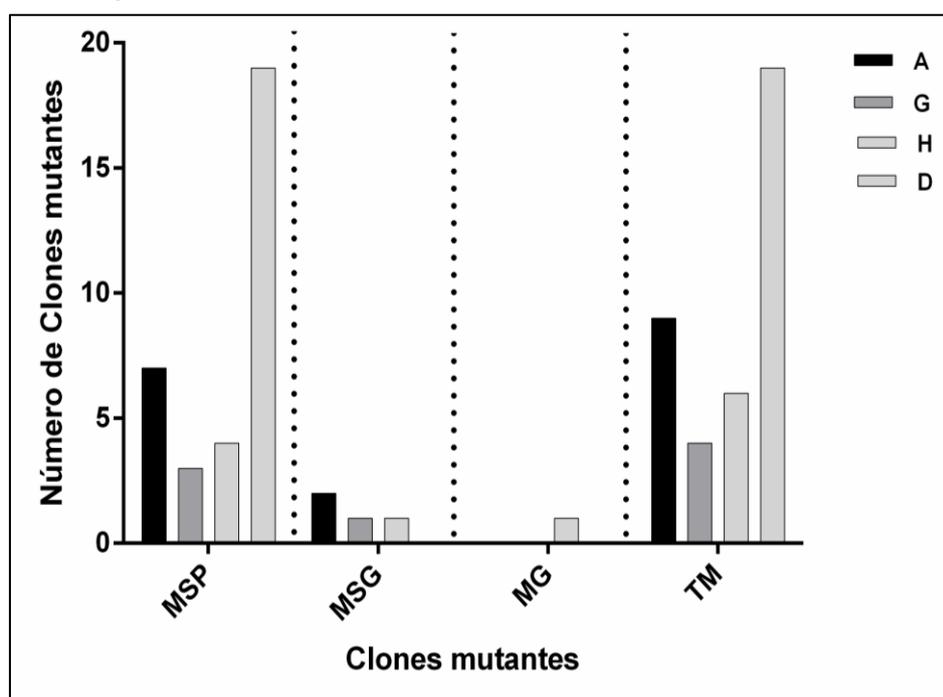
En el pretratamiento con el extracto etanólico de *B. forficata* ( $52,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) (72 h) y post tratada con un tratamiento con Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) (48 h) (G) se contaron 3 clones para manchas simples y pequeñas, 1 clon para mancha simple y grande, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 4 clones, con frecuencias de 0,15, 0,05, 0,0 y 0,2 respectivamente; mientras que en el tratamiento con el Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) (D) se contaron 19 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 19 clones, con frecuencias de 0,95, 0,0, 0,0 y 0,95 respectivamente; en cambio en el tratamiento con agua destilada (A) se contaron 7 clones para manchas simples y pequeñas, 2 clones para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 9 clones, con frecuencias de 0,35, 0,1, 0,0 y 0,45 respectivamente y en el tratamiento con Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) (1 h) y post tratada con agua destilada (H) se contaron 4 clones para manchas simples y pequeñas, 1 clon para manchas simples y grandes, 1 clon para manchas gemelas, en total se contaron 6 clones, con frecuencias de 0,2, 0,05, 0,05 y 0,3 respectivamente (Tabla 7).

El pretratamiento con el extracto etanólico demuestra que hay una disminución en la cantidad de clones mutados, 4 clones con frecuencia de 0,20 comparado con los 19 clones con frecuencia de 0,95 en el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Tabla 7 y Figuras 7 y 8).

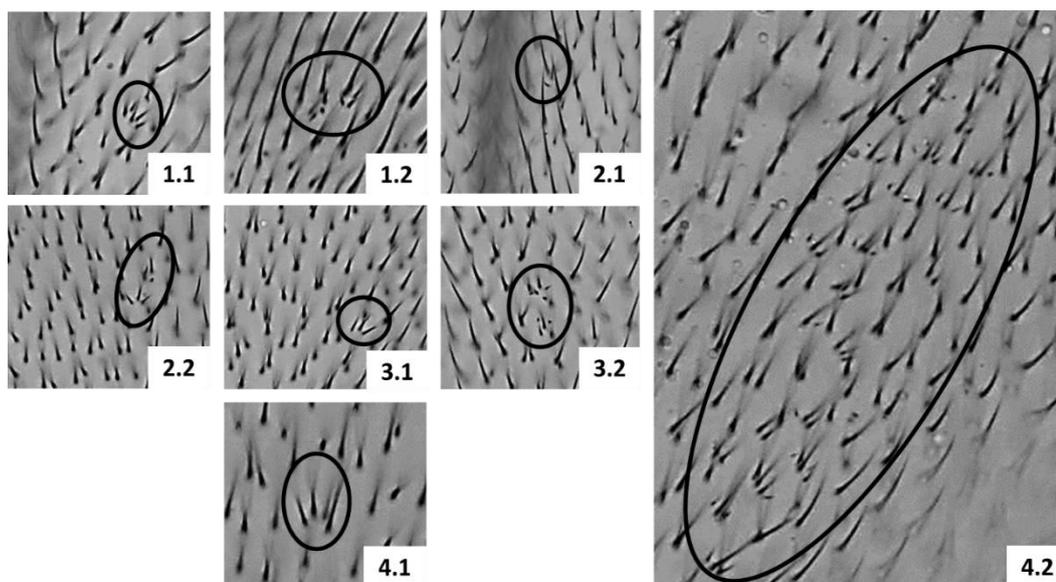
**Tabla 7: Análisis estadístico del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de *B. forficata* frente al Peróxido de Hidrógeno mediante un pretratamiento con el extracto etanólico. Cruce estándar**

Tratamiento	N° de alas	MSP (1-2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 2	MSG (>2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 5	MG <i>m</i> = 5	TM <i>m</i> = 2	Inhibición (%)
<b>A</b>	20	0,35 (07)	0,10 (02)	0,00 (00)	0,45 (09)	
<b>G</b>	20	0,15 (03)	-	0,05 (01)	0,20 (04)	78,94
<b>H</b>	20	0,20 (04)	-	0,05 (01)	0,30 (06)	
<b>D</b>	20	0,95 (19)	+ 0,00 (00)	0,00 (00)	0,95 (19) +	

a. Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia  $\alpha = \beta = 0,05$ ; b. Incluso las manchas simples  $\text{flr}^3$  raras; c. Considerando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas. Donde (**A**) es Agua destilada, (**G**) es pretratamiento con el extracto etanólico a una concentración de  $52,01 \text{ mg.mL}^{-1}$  (72 h) y post tratada con Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M (48 h), (**H**) es tratamiento con Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M (1 h) y post tratada con agua destilada y (**D**) es Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M.



**Figura 7: Pretratamiento con el extracto etanólico de *B. forficata* para la determinación del potencial antigenotóxico del extracto etanólico.** Donde (**A**) es Agua destilada, (**G**) es pretratamiento con el extracto etanólico a una concentración de  $52,01 \text{ mg.mL}^{-1}$  (72 h) y post tratada con Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M (48 h), (**H**) es tratamiento con Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M (1 h) y post tratada con agua destilada y (**D**) es Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M.



**Figura 8:** Clones encontrados en alas de *D. melanogaster* tratadas para la determinación del potencial antimutagénico del extracto etanólico de *B. forficata* frente al Peróxido de Hidrógeno. (1) **Tratamiento simple:** Mancha Simple y Pequeña (MSP) del tipo *mwh* (1.1 y 1.2), (2) **Tratamiento combinado:** Mancha Simple y Pequeñas (MSP) del tipo *mwh* (2.1 y 2.2). (3) **Post tratamiento:** Mancha Simple y Pequeñas (MSP) del tipo *mwh* (3.1 y 3.2) y (4) **Pretratamiento:** Mancha Simple y Pequeñas (MSP) del tipo *mwh* (4.1) y Mancha Simple y Grande (MSG) del tipo *mwh* (4.2). Aumento (400X). Microscopio Óptico Compuesto Motic®.

Con este resultado queda demostrado que el extracto etanólico de *B. forficata* podría ser un buen agente protector, ya que fue capaz de prevenir la formación de clones mutados, que según Graf *et al.* (1984) y Jiménez (2013), a que la sustancia evaluada actúa antes que las lesiones sean inducidas por la genotoxina y a su alto contenido de antioxidantes naturales, encontrados en los extractos ensayados por Salgueiro, *et al.* (2016) y Khalil, *et al.* (2008). Düsman *et al.* (2013), en su ensayo con ratos Wistar encontró una reducción del 71,1% de mutaciones inducidas por ciclofosfamida, usando un extracto acuoso de hojas frescas de *B. forficata* a concentración de 4,65 g.L<sup>-1</sup>.

Además, Lim *et al.* (2006) registraron acción apoptótica demostrada por mediante el ensayo TUNEL (ensayo para la detección de la fragmentación del ADN) con de células HepG2 (carcinoma hepatocelular hepático) tratadas con HY53 (C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>), a su vez este equipo de investigadores ha demostrado la antiproliferación de las HepG2, mediante un análisis de citometría de flujo, el cual evidenció que dichas células quedaban detenidas en fase G<sub>1</sub> del ciclo celular.

#### **4.3.5. Comparación entre todos los tratamientos**

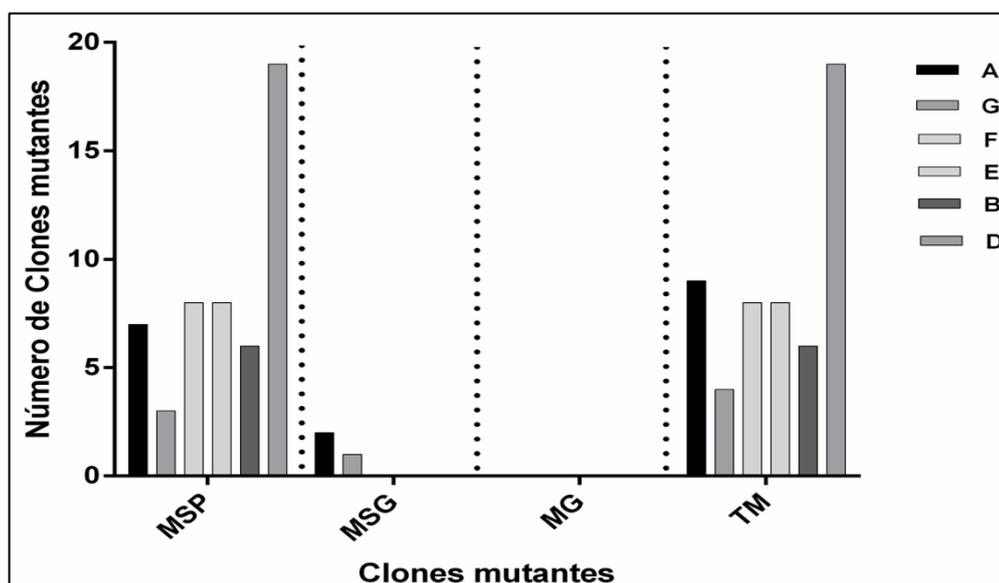
En el pretratamiento con el extracto etanólico de *Bauhinia forficata* ( $52,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) (72 h) y post tratada con Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) (48 h) (G) se contaron 3 clones para manchas simples y pequeñas, 1 clon para mancha simple y grande, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 4 clones, con frecuencias de 0,15, 0,05, 0,0 y 0,2 respectivamente; en cuanto al pretratamiento con el Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) (1 h) y post tratada con el extracto etanólico (48 h) (F) se contaron 8 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 8 clones, con frecuencias de 0,4, 0,0, 0,0 y 0,4 respectivamente; mientras que en el tratamiento combinado del extracto etanólico de *B. forficata* ( $52,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) junto con el Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) (E) se contaron 8 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 8 clones, con frecuencias de 0,8, 0,0, 0,0 y 0,8 respectivamente; a su vez, en el tratamiento simple del extracto etanólico de *B. forficata* ( $52,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) (B) se contaron 6 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 6 clones, con frecuencias de 0,6, 0,0, 0,0 y 0,6 respectivamente; no obstante en el tratamiento con el Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) (D) se contaron 19 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 19 clones, con frecuencias de 0,95, 0,0, 0,0 y 0,95 respectivamente y por último, en el tratamiento con Agua destilada (A) se contaron 7 clones para manchas simples y pequeñas, 2 clones para manchas simples y grandes, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 9 clones, con frecuencias de 0,35, 0,1, 0,0 y 0,45 respectivamente (Tabla 8).

Al realizar una comparación entre todos los tratamientos realizados, se observa que se obtiene un mejor resultado en el pretratamiento con el extracto (Tabla 8 y Figura 9).

**Tabla 8: Análisis estadístico del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de *B. forficata* frente al Peróxido de Hidrógeno mediante la comparación entre todos los tratamientos. Cruce estándar**

Tratamiento	N° de alas	MSP (1-2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 2	MSG (>2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 5	MG <i>m</i> = 5	TM <i>m</i> = 2	Inhibición (%)
A	20	0,35 (07)	0,10 (02)	0,00 (00)	0,45 (09)	
G	20	0,15 (03)	-	0,05 (01)	0,20 (04)	78,94
F	20	0,40 (08)	i	0,00 (00)	0,40 (08)	57,89
E	20	0,40 (08)	i	0,00 (00)	0,40 (08)	57,89
B	20	0,30 (06)	i	0,00 (00)	0,30 (06)	-
D	20	0,95 (19)	+	0,00 (00)	0,95 (19)	+

a. Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia  $\alpha = \beta = 0,05$ ; b. Incluso las manchas simples flr<sup>3</sup> raras; c. Considerando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas. Donde (A) es Agua destilada, (G) es pretratamiento con el extracto etanólico a una concentración de 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> (72 h) y post tratada con Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M (48 h), (F) es pretratamiento con Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M (1 h) y post tratado con extracto etanólico a una concentración de 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> (48 h), (E) es tratamiento combinado (extracto etanólico a una concentración de 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> junto con el Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M), (B) es el extracto etanólico a una concentración de 52, 10 mg.mL<sup>-1</sup> y (D) es Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M.



**Figura 9: Comparación entre todos los tratamientos para la determinación del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de *B. forficata*. Donde (A) es Agua destilada, (G) es pretratamiento con el extracto etanólico a una concentración de 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> (72 h) y post tratada con Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M (48 h), (F) es pretratamiento con Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M (1 h) y post tratado con extracto etanólico a una concentración de 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> (48 h), (E) es tratamiento combinado (extracto etanólico a una concentración de 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> junto con el Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M), (B) es el extracto etanólico a una concentración de 52, 10 mg.mL<sup>-1</sup> y (D) es Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M.**

Estas disminuciones de las alteraciones, podría ser causada por sustancias antimutagénicas que impiden la formación de la mutación o induce a la reparación de los daños del ADN, la cual fue comprobada también por Kada *et al.* (1978) mediante el ensayo de mutagenicidad con la cepa de Salmonella TA98 de Ames; Kojima *et al.* (1992) usando células V79 de hámster chino y Kuroda *et al.* (1992) usando cultivos celulares de mamíferos.

El extracto acuoso de *B. forficata* puede inactivar química o enzimáticamente e inhibir la formación de mutaciones en el ADN, también puede inhibir la activación metabólica de agentes promutágenos o pueden recoger moléculas reactivas, ya que pueden actuar directamente sobre los receptores de los mismos (Kada *et al.*, 1978; Kojima *et al.*, 1992 y Kuroda *et al.*, 1992).

La actividad antioxidante que presenta el extracto acuoso de *B. forficata* se debe especialmente a la presencia de polifenoles y flavonoides, los cuales fueron corroborados en el trabajo de Salgueiro *et al.* (2016), mediante la reducción de la peroxidación lipídica y los niveles de tioles totales (SH) no proteicos en eritrocitos humanos.

Los polifenoles, especialmente los flavonoides, al poseer una estructura ideal para la eliminación de radicales libres y para la interacción con los grupos activos mutágenos o para la protección de los sitios de ADN que podrían ser afectados por el mutágeno (Droge, 2002; Ratnam *et al.*, 2006 y Toloza y Fernández, 2015).

Con la realización de estudios previos, se puede deducir que tanto, el extracto etanólico y acuoso, pueden ser útiles en la prevención de las complicaciones diabéticas asociados con el estrés oxidativo (Salgueiro *et al.* 2016; Khalil *et al.* 2008 y Toloza y Fernández, 2015) y ayudado con este estudio, se podría demostrar, que esta planta, es capaz de reducir la presencia de eventos mutagénicos, los cuales también fueron demostrados por Düsman *et al.* (2013), Pepato *et al.* (2004), Pereira *et al.* (2014) y Ribeiro *et al.* (2013).

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que el extracto etanólico de *B. forficata* a la concentración de 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> no presenta efecto genotóxico, al contrario presenta una acción antimutagénica, ya que fue capaz de interrumpir sobre la acción genotóxica del mutágeno (Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0,96 M) utilizado para la inducción a mutaciones en esta investigación, obteniéndose una reducción del 57,89% tanto en el tratamiento combinado como en el de post tratamiento y un 78,94% en el pretratamiento, aceptando la hipótesis propuesta en la tesis y permite deducir, que es un buen agente protector para la reducción del daño al material genético ocasionado por posibles eventos mutagénicos u oxidantes a causa de efectos ambientales extrínsecos y teniendo potencialidades para el desarrollo de un fitomedicamento, se recomienda el consumo moderado de la decocción de las hojas, esto es debido a que la mayoría de las personas la consumen así, como tratamiento alternativo para ciertas enfermedades.

## 5.2. RECOMENDACIONES

A consecuencia de los resultados obtenidos en esta investigación en el cual se evidenció los efectos positivos del extracto etanólico de hojas de *B. forficata* ante eventos mutagénicos inducidos en *D. melanogaster*, se recomienda seguir realizando ensayos con dicha planta, especialmente, de la manera que la población utiliza esta planta. Además, mediante la separación de sus metabolitos secundarios según la afinidad química de las mismas y empleando ensayos como el test cometa para estudiar la reparación del ADN en *D. melanogaster*, ensayo *in vitro* de micronúcleos y el análisis de FISH, ensayo de mutación del receptor de células T para controlar la exposición genotóxica humana, test genotoxicológico con marcadores RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar).

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, J. (2007). Tratado de fitofármacos y nutraceuticos (pp. 905-911). Buenos Aires: Corpus.
- ANNE, B.H. & ERIKA, H., 1996. Mutations in the Human Homologue of *Drosophila* patched (PTCH) in basal cell carcinomas and the Gorlin syndrome: different in vivo mechanisms of PTCH inactivation. *Cancer Res.* 56: 4562-4565.
- ARREBOLA, D.F.A.; FERNANDEZ, L. A. R.; FERIA, Y. L., & RIVERO, D.D. 2009. Las plantas, fuente de agentes antimutagénicos y quimiopreventivos. *Revista Toxicológica en Línea.* Págs. 37- 51.
- ASHBURNER, M. 1989. *Drosophila: A Laboratory Handbook.* Cold Spring Harbor Laboratory.: New York; PP. 123-134.
- CAMACHO, G.; MORÁN, J.; BETANCOURT, N.; MONREAL K. & BENITEZ, M. 2010. Evaluación por ensayo cometa de daño celular inducido con Peróxido de Hidrógeno a linfocitos de sangre periférica *In vitro*. Departamento de Biología Celular. Universidad Autónoma de Aguas Calientes, México.
- CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. D. O.; MANTOVANI, M. S. & VICENTINI, V. E. P. (2002). Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. *Genetics and Molecular Biology*, 25(1), 85-89.
- CÁPIRO, N.; SÁNCHEZ-LAMAR, Á.; FONSECA, G.; BALUJA, L. & BORGES, E. 2001. Capacidad protectora de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf:

ante el daño genético inducido por estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 20(1), 34-37.

CONDE PÉREZ-PRINA, J.C. 2004. Daño al ADN en sangre periférica de ratones mutantes de catalasa.

DA CUNHA, A. M.; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A. G.; BÜRGER, C. & BIAVATTI, M. W. 2010. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. *Phytomedicine*, 17(1), 37-41.

DA SILVA, K. L. & FILHO, V. C. 2002. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Química nova*, 25(3), 449-454.

DE ARRÚA, R. L. D.; VILLALBA, Y. P. G. & AMARILLA, A. 2009. Legislación sobre Plantas Medicinales y Fitoterápicos en Paraguay: una tarea pendiente. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(1), 12-16.

DE CARVALHO, P. B. & FERREIRA, E. I. 2001. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia*, 72(6), 599-618.

DE SOUSA LINO, C.; DIÓGENES, J. P. L.; PEREIRA, B. A.; FARIA, R. A. P. G.; NETO, M. A.; ALVES, R. S.; DE QUEIROZ, M. G.; DE SOUSA, F. C. & VIANA, G. S. B. 2004. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(1), 125-127.

DE SOUSA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; PIZZOLATTI, M. G.; SZPOGANICZ, B. & SILVA, F. R. M. B. 2004. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3, 7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. *Journal of natural products*, 67(5), 829-832.

- DEGEN, R., GONZÁLEZ, Y.P. & AMARILLA A. 2008. Legislación sobre plantas medicinales y fitoterápicas en Paraguay. una tarea pendiente. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 7: 1 - 5.
- DEEPA PARVATHI, V.; AKSHAYAAMRITHA, S.; MATHANGI, R.; SWARNA, R. & SOLOMON, F. D. P. 2011. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Advanced Biotech*. Vol. 10 Issue 03.22-24.
- DEGUCHI, T.; OHBA, R. & UEDA, S. 2000. Radical scavenging activity of a purple pigment, hordeumin, from uncooked barley bran-fermented broth. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3198-3201.
- DROGE, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
- DÜSMAN, E.; ALMEIDA, I. V. D.; COELHO, A. C.; BALBI, T. J.; DÜSMAN TONIN, L. T. & VICENTINI, V. E. P. 2013. Antimutagenic effect of medicinal plants *Achillea millefolium* and *Bauhinia forficata* in vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- FERGUSON, L. R. 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475(1-2), 89-111.
- FERNÁNDEZ, V.; *et al.* 1999. Acción de algunas plantas medicinales paraguayas sobre el ciclo replicativo celular. *Revista Nacional de Ciencia y Tecnología*. Nº1. Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo-Paraguay.
- FERRER, M. 2002. *Estudio del potencial antimutagénico de Phyllanthus orbicularis*. *Departamento de Genética y Microbiología* (Doctoral dissertation, Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona: España, 2002.

- FERRERES, F., GIL-IZQUIERDO, A.; VINHOLES, J.; SILVA, S. T.; VALENTÃO, P. & ANDRADE, P. B. 2012. *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties. *Food Chemistry*, 134(2), 894-904.
- FORTUNATO, R. H. 1986. Revisión del género *Bauhinia* (Cercideae, Caesalpinioidea, Fabaceae) para la Argentina. *Darwiniana*, 527-557.
- FREI, H. & WÜRGLER, F.E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 203(4): 297-308. doi:10.1016/0165-1161(88)90019-2.
- GRAF, U. & D. SINGER. 1992. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 8 (I), 15-2.
- GRAF, U.; WÜRGLER F. E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON H.; HALL C. B. & KALE, P. G. 1984. Somatic Mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6:153-188.
- HOLLSTEIN, M.B. & SHOMER, M. 1996. Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines updated compilation. *Nucl. Acid Res.* 24:141-146.
- IBARROLA, D. A.; DEGEN DE ARRÚA, R. L. & FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN. 2011. Catálogo ilustrado de 80 plantas medicinales del Paraguay. Facultad de Ciencias Químicas-una y Agencia de Cooperación Internacional del Japón, Asunción, Paraguay.
- JIMÉNEZ, M. R. 2013. Estudio antigenotológico y de citotoxicidad de plantas medicinales de uso cotidiano y de sus fenoles más característicos (Doctoral dissertation, Universidad de Córdoba).

- KADA T. 1984. Environmental desmutagens and antimutagenicagents. Environ. Mut 1984; 240:135-151.
- KADA, T.; INOUE, T.; OHTA, T. & SHIRASU, Y. 1986. Antimutagens and their modes of action. In *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms* (pp. 181-196). Springer, Boston, MA.
- KADA, T.; MORITA, K. & INOUE, T. 1978. Anti-mutagenic action of vegetable factor (s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, 53(3), 351-353.
- KASTENBAUM, M.A. & BOWMAN, K.O. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 9(5): 527-549. doi:10.1016/0027- 5107(70)90038-2.
- KHALIL, N. M.; PEPATO, M. T. & BRUNETTI, I. L. 2008. Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. Biological research, 41(2), 165-171.
- KOJIMA, H.; KONISHI, H. & KURODA, Y. 1992. Combined mutagenicity of methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate in Chinese hamster V79 cells. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 266(2), 171-180.
- KONTOGIORGIS, C.; BOMPOU, E.M.; NTELLA, M. & BERGHE, W. 2010. Natural Products from Mediterranean Diet: From Anti-Inflammatory Agents to Dietary Epigenetic Modulators. Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Cu. 9. 101-124. 10.2174/187152310791110652.

- KURODA, Y.; JAIN, A. K.; TEZUKA, H. & KADA, T. 1992. Antimutagenicity in cultured mammalian cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 267(2), 201-209.
- LABRADA, R.; CASELEY, J. C., & PARKER, C. 1996. Manejo de malezas para países en desarrollo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
- LEE, H.L.; CHEN, K.W.; CHI, C.H.; HUANG, J.J. & TSAI, L.M. 2000. Clinical presentations and prognostic factors of a glyphosate-surfactant herbicide intoxication: A review of 131 cases. *Acad Emerg Med*.7:906-10.
- LIM, H.; LIM, Y.; CHO, Y. H. & LEE, C. H. 2006. Induction of apoptosis in the HepG2 cells by HY53, a novel natural compound isolated from *Bauhinia forficata*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 16(8), 1262-1268.
- LUBKOWSKI, J.; DURBIN, S. V.; SILVA, M. C.; FARNSWORTH, D., GILDERSLEEVE, J. C.; OLIVA, M. L. V. & WLODAWER, A. 2017. Structural analysis and unique molecular recognition properties of a *Bauhinia forficata* lectin that inhibits cancer cell growth. *The FEBS journal*, 284(3), 429-450.
- MARTÍNEZ-VALDIVIESO, D.; DEL RÍO-CELESTINO, M.; DOMÍNGUEZ-PÉREZ, I.; FERNÁNDEZ-BEDMAR, Z.; VILLATORO-PULIDO, M.; ALONSO-MORAGA, A.; FONT, R. & ANTER, J. s.f. Efectos quimiopreventivos del calabacín sobre las células de leucemia HL-60. *Actas de horticultura* N° 60.
- MARTÍNEZ-VALENZUELA, C. & GÓMEZ-ARROYO, S. 2007. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Rev. Int. Contam. Ambiental*. 23 (4) 185-200.
- MELGAREJO, A. O. 2014. Contribución a la medicina natural: Pohã Ñana, un Manuscrito inédito en Guaraní (Paraguay, S. XVIII). *Corpus. Archivos*

virtuales de la alteridad americana, 4(2). doi: 10.4000/corpusarchivos.1301.

- MENEZES, F.D.S.; MINTO, A.B.M.; RUELA. H.S.; KUSTER, R.M.; SHERIDAN, H. & FRANKISH, N. 2007. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. Rev. Bras. Farmacogn. 17: 8-13.
- MORENO ABRIL, O. & CARRILLO GALLEGO, E. 2002. Técnicas de estudio de la mutagenicidad. Higiene y Sanidad Ambiental, 2: 26-32.
- NARAYAN, D. S.; JAGANNATH, P. V. & CHANDRA, D. S. 2012. Evaluation of Anti-Inflammatory, Anti-diabetic activity of Indian *Bauhinia vahlii* (stembark). Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2(3), S1382-S1387.
- OLIVEIRA CLAYTON, Z.; MAIORANO VICTOR, A.; MARCUSSI, S.; SANTANA CAROLINA, D.; JANUARIO ANA, H.; LOURENCO MIRIAM, V.; SAMPAIO SUELY, V.; FANCA SUZELEI, C.; PEREIRA PAULO, S. & SOARES ANDREIMAR, M. 2005. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. J. Ethnopharmacol. 98: 213-216.
- PEPATO, M. T.; BAVIERA, A. M.; VENDRAMINI, R. C. & BRUNETTI, I. L. 2004. Evaluation of toxicity after one-months treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 4(1), 7.
- PEREIRA, A. C. S.; RIBEIRO, G. E.; SOUZA, L. C. R.; RUFINO, L. R. A.; CABRAL, I. S. R.; BORIOLLO, M. F. G. & FIORINI, J. E. 2014. Biologic activity of the hydroalcoholic extract of *Bauhinia forficata* Link on *Herpetomonas samuelpessoai* (Galvão.) Roitman. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 16(3), 585-592.

- PÉREZ, B. R. T. 2017. Estrés oxidante en dos especies de murciélagos vampiros: *Desmodus rotundus* y *Diphylla ecaudata* como modelos para el estudio del envejecimiento.
- PETITPIERRE, E. 1997. *Drosophila* y otros insectos en la investigación genética. Bol. S.E.A 20:401-103.
- PIN, A., GONZÁLEZ, G., MARÍN, G., CÉSPEDES, G., CRETTON, S., CHRISTEN, P., & ROGUET, D. 2009. Plantas Medicinales del Jardín Botánico de Asunción. AGR Servicios Gráficos. Paraguay. p 229.
- PINEDO TORRES, J. 2010. Evaluación genotóxica de los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* en linfocitos de ratas albinas cepa Holtzmann. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Perú.
- PINHEIRO, T. S.; JOHANSSON, L. A.; PIZZOLATTI, M. G. & BIAVATTI, M. W. 2006. Comparative assessment of kaempferitrin from medicinal extracts of *Bauhinia forficata* Link. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 41(2), 431-436.
- RAJKAPOOR, B.; RAVICHANDRA, V.; GOBINATH, M.; ANBU, J.; HARIKRISHNAN, N.; SUMITHRA, M.; SANKARI, M.; VENUGOPAL, R. & SAKTHISEKARAN, D. 2007. Effect of *Bauhinia variegata* on Complete Freund's Adjuvant induced arthritis in rats. J Pharmacol Toxicol, 2(5), 465-72.
- RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K. & KUMAR, M. R. 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. Journal of controlled release, 113(3), 189-207.
- RIBEIRO, D. L.; CILIAO, H. L. & SPECIAN, A. F. 2013. Protective effect and absence of apoptotic, cytotoxic and mutagenic effects of the extract of *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud in HePG2 cells. In Proceedings of

the 11th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM'13) (p. 163).

RODRIGUES DE ANDRADE, H.H.; REGULY, M.L.; & LEHMANN, M. 2004. Wing somatic mutation and recombination test. In *Drosophila Cytogenetics Protocols*, Ed. D. S. Henderson, 389- 412. Humana Press. Totowa. New Jersey.

SALGUEIRO, A. C. F.; FOLMER, V.; DA SILVA, M. P.; MENDEZ, A. S. L.; ZEMOLIN, A. P. P.; POSSER, T.; FRANCO, J.L. & PUNTEL, G. O. 2016. Effects of *Bauhinia forficata* tea on oxidative stress and liver damage in diabetic mice. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

SARTORELLI, P. & CORREA. D.S. 2007. Constituents of essential oil from *Bauhinia forficata* Link. *J. Essent. Oil Res.* 19: 468-469.

SILVA, M. C.; DE PAULA, C. A.; FERREIRA, J. G.; PAREDES-GAMERO, E. J.; VAZ, A. M.; SAMPAIO, M. U.; CORREIA, M. T. & OLIVA, M. L. V. 2014. *Bauhinia forficata* lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF7 human breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(7), 2262-2271.

SIMIC, D.; VUKOVIC-GACIC, B.; KNEZEVIC-VUKCEVIC J. 1997. Detection of natural bioantimutágenos and their mechanisms of action with bacterial assay-system. *Mutat Research* 1997; 402:51-57.

SINGH, K. L.; SINGH, D. K. & SINGH, V. K. 2016. Multidimensional Uses of Medicinal Plant Kachnar (*Bauhinia variegata* Linn.). *Am J Phytomed Clin Ther*, 4(02), 058-072.

SORIA, N., & RAMOS, P. 2015. Uso de plantas medicinales en la atención primaria de salud en Paraguay: algunas consideraciones para su uso

seguro y eficaz. Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, 13(2).

STURTEVANT, A. H. 1913. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. J. Exp. Zool., 14: 43-59.

SURH, Y. J. (1999). Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 428(1), 305-327.

TOLOZA-ZAMBRANO, P.; AVELLO, M. & FERNÁNDEZ, P. 2015. Determinación de rutina y trigonelina en extractos de hojas de *Bauhinia forficata* subsp. pruinosa y evaluación del efecto hipoglicemiante en humanos. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 14(1). pp.21-32.

TORRES BORREGO, J.; PÉREZ NAVERO, P.; IBARRA DE LA ROSA, I. & PÉREZ NAVERO, J. L. 1998. Ingestión letal de Peróxido de Hidrógeno. Anales españoles de pediatría, 48(6), 647-649.

Version, G. P. 2014. 6.00 for Windows [computer program]. *Version*. San Diego CA GraphPadSoftware.

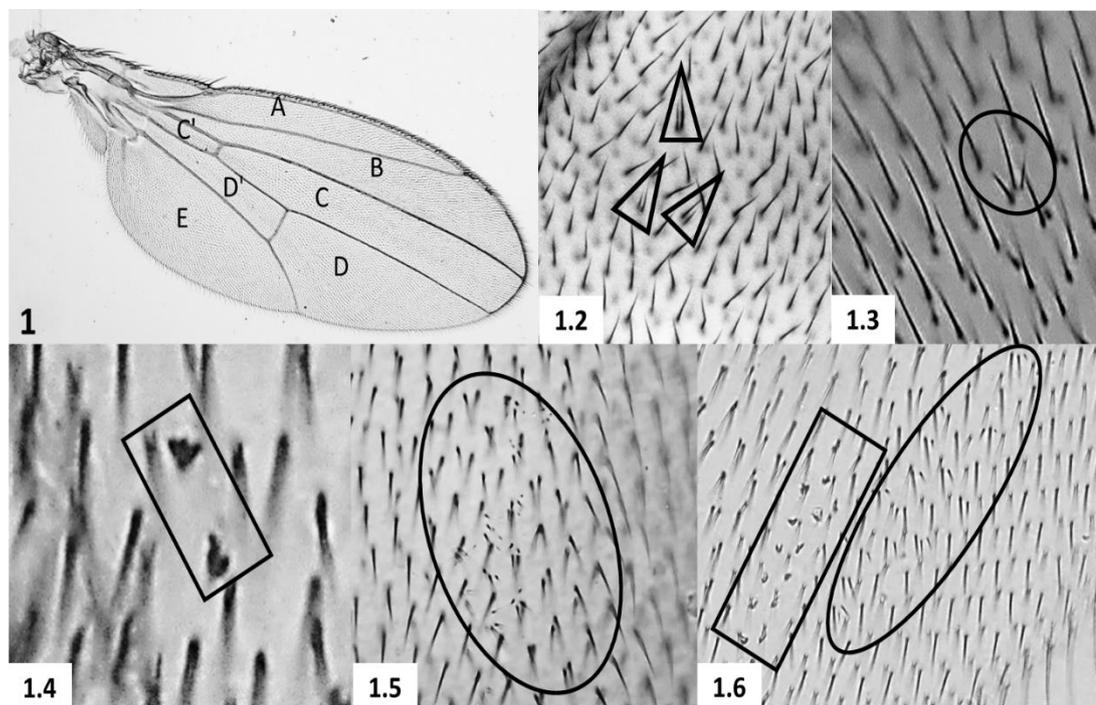
VOLPATO, G.T.; DAMASCENO, D.C.; RUDGE, M.V.C.; PADONAVI, C.R. & CALDERON, I.M.P. 2008. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 116:131-137.

WATTENBERG L.W. 1981. Inhibitors of chemical carcinogens, in: Burchenal, J.H; Oettgen, H.F(Eds.), Cancer: Achievements, Challenges and Prospects for the 1980s, Grune and Stratton, New York, NY; 1981. p.517-540.

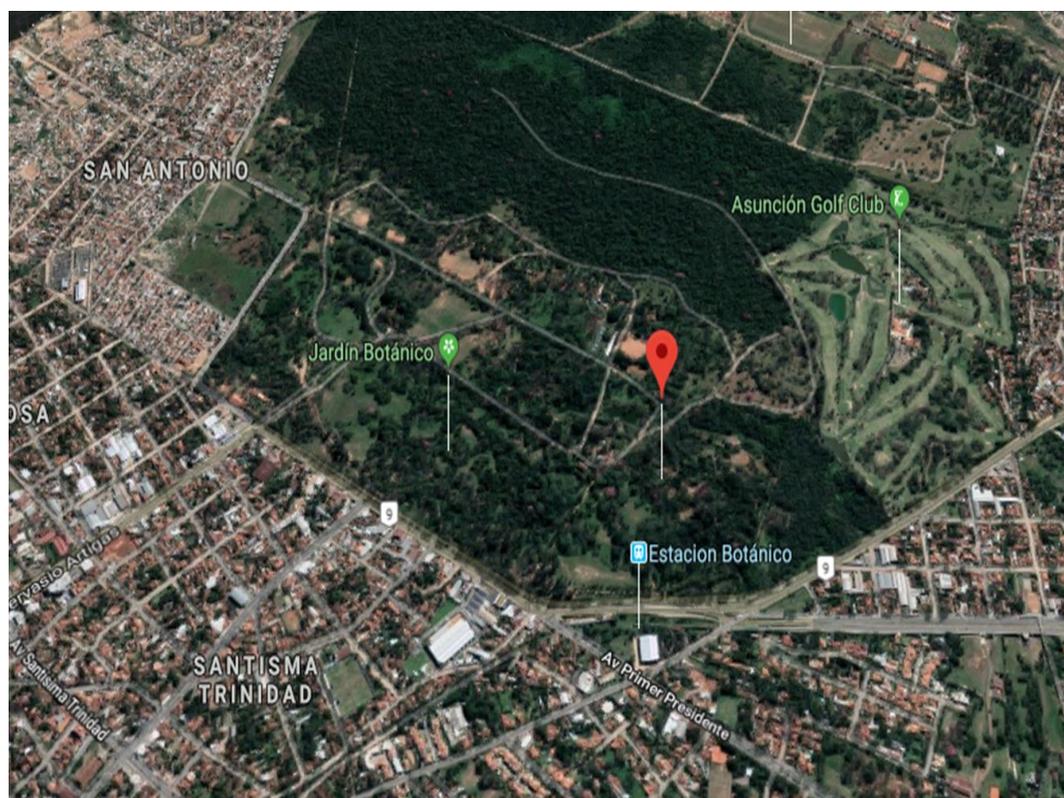
WISNIAK, J. (2002). Louis-Jacques Thenard. Revista CENIC. Ciencias Químicas, 33 (3), 141-149.

YOUNG, B.D.; DEBERNARDI, S.; LILLINGTON, D.M.; SKOULAKIS, S.; CHAPLIN, T.; FOOT, N.J.; & RAGHAVAN, M. 2006. A role for mitotic recombination in leukemogenesis. Adv. Enzyme Regul.46: 90-97.

## **ANEXOS**

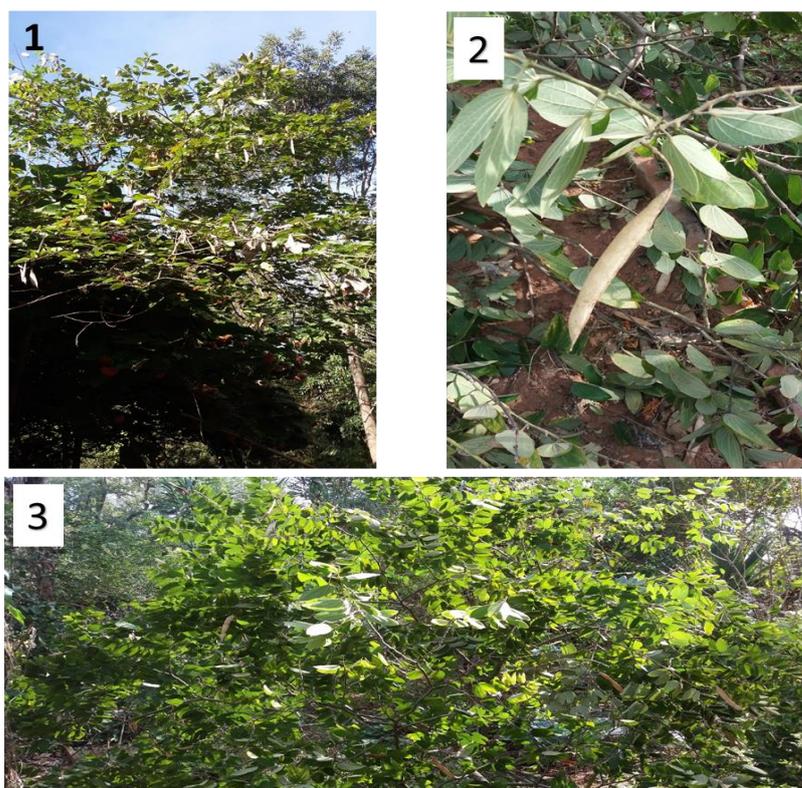


**Anexo A: Criterios de exclusión e inclusión.** (1). Segmentos del ala. (2) Pelos duplos (enmarcado dentro del triángulo). (3) Mancha Simple y Pequeña (MSP) del tipo *mwh*. (4) Mancha Simple y Pequeña (MSP) del tipo *flr<sup>3</sup>*. (5) Mancha Simple y Grande (MSG) del tipo *mwh*. (6) Mancha Gemela (*mwh* y *flr<sup>3</sup>*). Manchas del tipo *mwh* encerrados dentro del círculo. Manchas del tipo *flr<sup>3</sup>* enmarcados dentro del rectángulo.

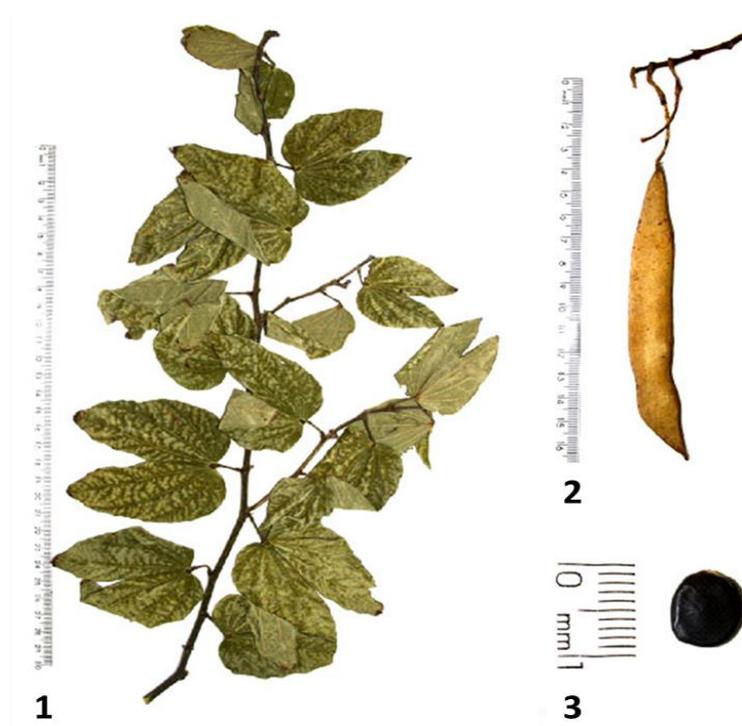


**Anexo B: Área de colecta.** Imagen Satelital (©2019DigitalGoogle)

**Fuente:** <https://www.google.com/maps/>



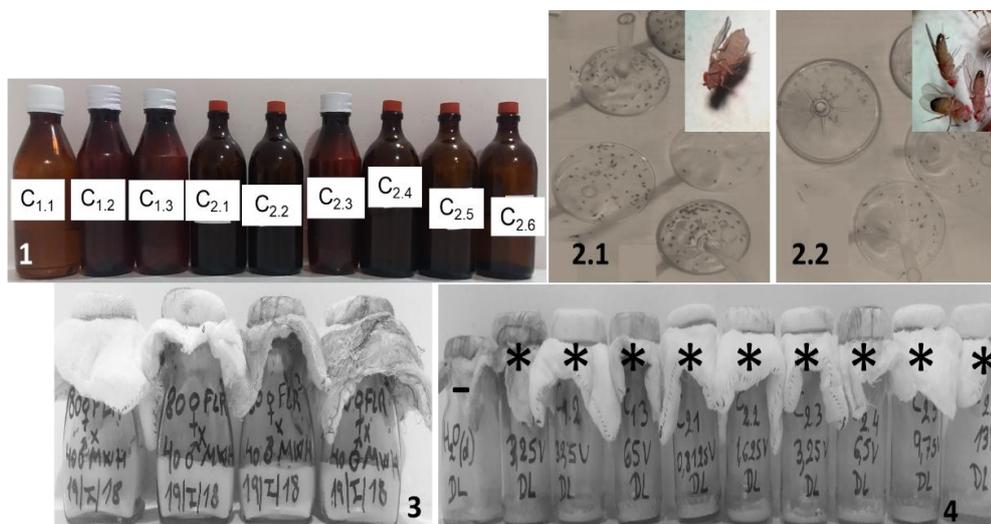
**Anexo C:** *Bauhinia forficata* en fresco en el lugar de colecta



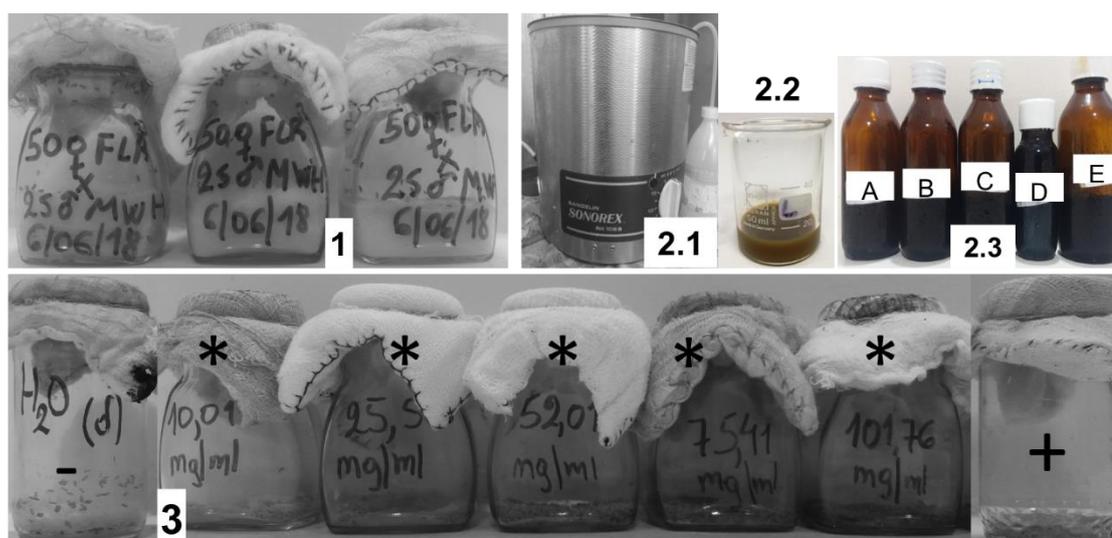
**Anexo D:** *Bauhinia forficata* Link. 1. Material estudiado, 2. Detalle del fruto, 3. Semilla.



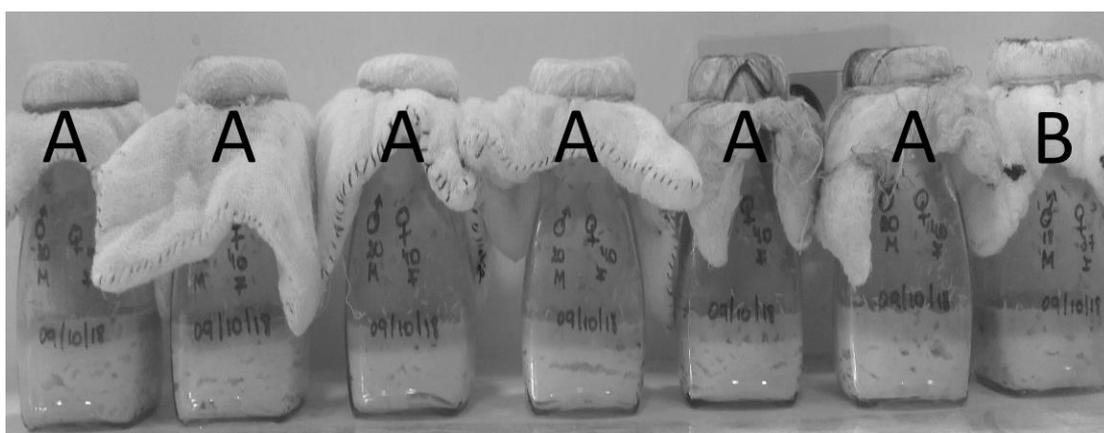
**Anexo E: Preparación del extracto etanólico de *Bauhinia forficata* Link.** (1) Secado. (2) Proceso de pulverización con ayuda de molino manual. (3) Hojas pulverizadas y pesadas. (4) Disolución en 2 L de etanol al 70%. (5) Filtrado. (6) Concentración del extracto con ayuda de evaporador rotativo, (7) baño maría y (8) calentamiento directo sobre la placa.



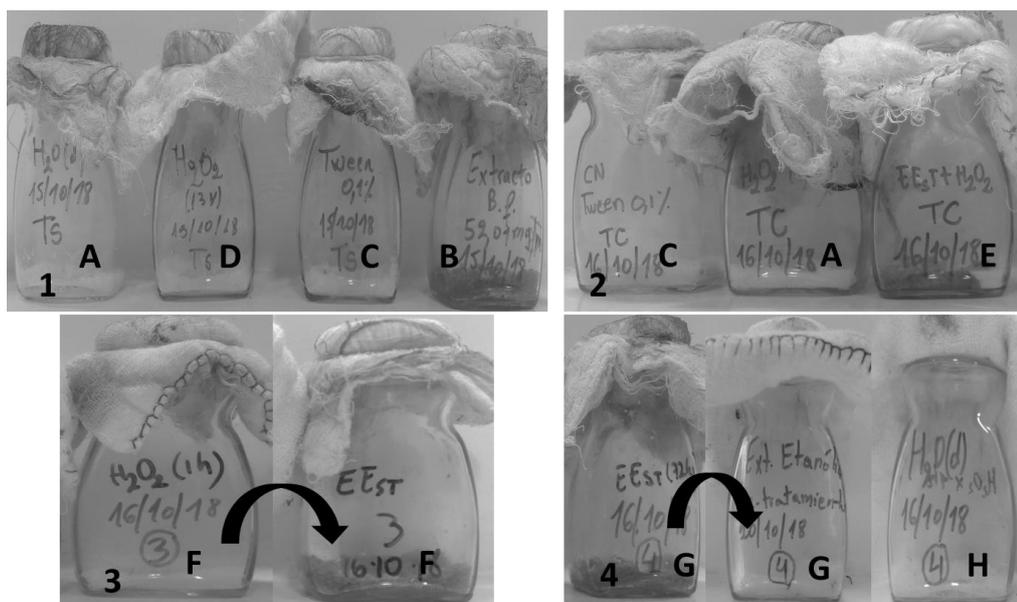
**Anexo F: Determinación de la dosis letal cincuenta ( $DL_{50}$ ) del Peróxido de hidrógeno.** (1) Diferentes concentraciones del Peróxido de Hidrógeno. ( $C_{1,1}$  = 0,12 M;  $C_{1,2}$  = 1,2 M;  $C_{1,3}$  = 2,4 M;  $C_{2,1}$  = 0,06 M,  $C_{2,2}$  = 0,12 M;  $C_{2,3}$  = 0,24 M;  $C_{2,4}$  = 0,48 M;  $C_{2,5}$  = 0,72 M y  $C_{2,6}$  = 0,96M). (2) Obtención de individuos vírgenes con ayuda de Lupa Estereoscópica (CARL ZEISS®) y © aumento de 20X. (2.1) Hembras vírgenes  $flr^3/ln(3LR)TM3$ ,  $ri^p sep I(3)89Aa bx^{34e}$  y  $Bd^S$ . (2.2) Machos vírgenes  $mwh/mwh$ . (3) Cruza estándar del test SMART. (4) Tratamiento de las larvas  $mwh+/+flr3$  con las diferentes concentraciones del Peróxido de Hidrógeno (\*) y Agua destilada (-).



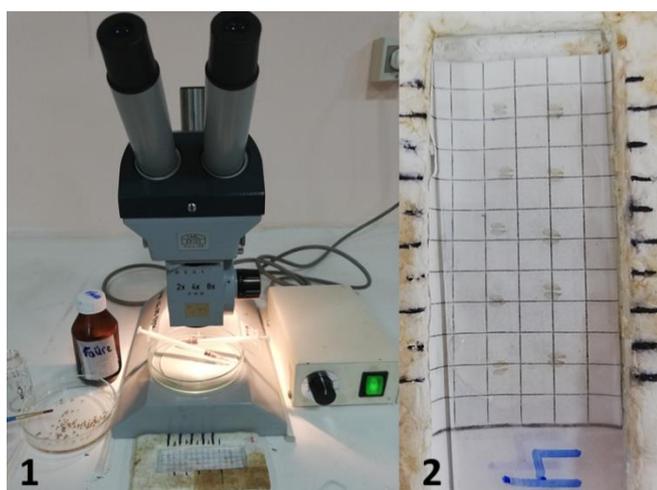
**Anexo G: SMART para genotoxicidad del extracto etanólico de *Bauhinia forficata*.** (1) Cruza estándar del test SMART (hembras vírgenes *flr<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3*, *ri p<sup>o</sup>sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup>* y *Bd<sup>S</sup>* por machos vírgenes *mwh/mwh*). (2) Preparado de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *B. forficata*. (2.1) Digregado por ultrasonido (2 minuto a 20 °C). (2.2) Solución obtenida. (2.3) Diferentes concentraciones. (A)= 10,01 mg.Ml<sup>-1</sup> (B)= 25,50 mg.Ml<sup>-1</sup> (C)= 52,01 mg.Ml<sup>-1</sup> (D)= 75,41 mg.Ml<sup>-1</sup> (E)= 101,76 mg.Ml<sup>-1</sup>. (3) Tratamiento de las larvas *mwh+/+flr<sup>3</sup>* con las diferentes concentraciones del extracto etanólico (\*), agua destilada (-) y Tween 0,1% (+)



**Anexo H: Cruza estándar del test SMART** (Cruza estándar del test SMART (hembras vírgenes *flr<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3*, *ri p<sup>o</sup>sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup>* y *Bd<sup>S</sup>* por machos vírgenes *mwh/mwh*). (A)= 40 hembras *flr<sup>3</sup>* X 20 machos *mwh*; (B)= 37 hembras *flr<sup>3</sup>* X 18 machos *mwh*).



**Anexo I: Tratamiento de las larvas *mwh+/+flr*<sup>3</sup> para la determinación del efecto antimutagénico del extracto etanólico de *B. forficata* frente al Peróxido de Hidrógeno. (1) Tratamiento simple: **A**= Agua destila, **B**= Extracto etanólico de *B. forficata* (52.01 mg.Ml<sup>-1</sup>), **C**= Tween 80 (0.1 %), **D**= Peróxido de Hidrógeno (0,96 M), (2) Tratamiento combinado: **E**= Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) junto con el extracto etanólico de *B. forficata* (52.01 mg.Ml<sup>-1</sup>). (3) Post tratamiento con el extracto etanólico de *B. forficata*: **F**= Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) tratado por 1 h, luego post tratado con el extracto etanólico de *B. forficata* (52.01 mg.Ml<sup>-1</sup>) por 48 h. (4) Pre tratamiento con el extracto etanólico de *B. forficata* : **G**= Extracto etanólico de *B. forficata* (52.01 mg.Ml<sup>-1</sup>) tratado por 72 h y luego post tratado con el Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) por 48 h y **H**= Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) tratado por 1 h y luego post tratado con agua destilada.**



**Anexo J: Procedimientos para el análisis de las láminas. 1.** Proceso de montaje de las alas **2.** Lámina lista para observación al microscopio