

# UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y  
Biotecnológicas**  
**Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica**



**« EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO Y  
POLIFENOLES TOTALES DEL SANCAYO (*Corryocactus brevistylus*) Y  
DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y  
GENOTOXICIDAD EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA »**

Tesis presentada por la Bachiller:

**Soany Milagros Alanoca Coaquira**

Para optar por el título profesional de:

**INGENIERA BIOTECNOLOGA**

Asesor:

**Dr. José Villanueva Salas**

**AREQUIPA – PERÚ**

**2014**

## DEDICATORIA

En primer lugar quiero dar gracias a Dios por haberme dado la oportunidad de cursar una carrera universitaria y terminarle de la mejor manera posible luego de 5 años de estudio; él me permitió de alguna manera u otra seguir adelante en todo momento hasta llegar al punto en el que me encuentro ahora, gracias.

El presente trabajo de tesis esta dedicado principalmente a mis padres, María Coaquira Huanacuni y Juan de Dios Alanoca Mamani, quienes siempre me dieron fortaleza y ánimos para seguir adelante, además de que creyeron en mi en todo momento incluso cuando yo no creía en mi misma. Es a ellos a quien quiero honrar con este trabajo porque sin ellos ahora posiblemente no habría logrado lo que soy.

También quiero dedicar este trabajo a mis dos hermanos José Luis y Juan Carlos Alanoca quienes me ayudaron y apoyaron en muchas ocasiones, en especial mi hermano Juan Carlos, el cual fue para mí algo más importante que un hermano o un amigo, un mentor y ejemplo a seguir con el quien aprendí que a pesar de las equivocaciones siempre se puede seguir adelante, gracias hermanos.

Quiero agradecer muy profundamente a mi asesor, el Dr. José Villanueva, el cual me brindó toda la ayuda posible para la realización de mi proyecto de tesis, por su tiempo, paciencia y tolerancia que tuvo conmigo durante toda esta etapa del proyecto, muchas gracias Doctor.

Y por último pero no menos importante, quiero dar las gracias a todas las personas que trabajan en el laboratorio del Dr. Villanueva, personas que además de apoyarme y ayudarme en la realización de mi proyecto, se convirtieron en unos grandes amigos, Elvis Gonzales, Celia Choquenaira, Jeaneth Medina y Julitza Paredes, además de las muchas personas que conocí y que no dudaron en ayudarme cuando se los pedí: Elizabeth Infa, Alejandro Rondón y Andrea Zea, muchas gracias chicos.

Y a todas esas personas que de alguna manera u otra influyeron en la realización y culminación de este trabajo, la Sra. Luisa, el Sr. Froilan, a la Srta Liliana y demás personas que tal vez este olvidando, les estoy a todos muy agradecida.

*“Lo que tú pienses que puedes hacer lo puedes lograr, por lo tanto hazlo. El valor está compuesto de talento, poder y magia, solamente fija tus metas y después la mente empezará a desarrollarlas. Empieza y el trabajo será terminado.”*

*Mary Kay Ash (1918–2001)*

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>INTRODUCCION</b> .....	xiii
<b>OBJETIVOS</b> .....	xv
<b>HIPOTESIS</b> .....	xvi
<b>VARIABLES E INDICADORES</b> .....	xvii
<b>CAPITULO I</b> .....	1
<b>MARCO TEORICO</b> .....	1
<b>1.1. SANCAYO (<i>Corryocactus brevistylus</i>)</b> .....	1
1.1.1 CLASIFICACION Y NOMBRES COMUNES.....	1
1.1.2 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.....	2
1.1.3 ORIGEN Y DISTRIBUCION.....	3
1.1.4 CARACTERISTICAS ECOLOGICAS DEL <i>Corryocactus</i> <i>brevistylus</i> .....	4
1.1.5 PROPIEDADES NUTRICIONALES.....	4
1.1.6 USOS.....	6
<b>1.2. RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO</b> .....	7
1.2.1 RADICALES LIBRES.....	7
1.2.2 ESTRÉS OXIDATIVO.....	11
<b>1.3. ANTIOXIDANTES</b> .....	12
1.3.1 CLASIFICACIÓN DE ANTIOXIDANTES.....	13
1.3.2 ANTIOXIDANTES NATURALES - ALIMENTOS FUNCIONALES.....	15
1.3.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	15
<b>1.4. ÁCIDO ASCÓRBICO</b> .....	18
1.4.1 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ÁCIDO ASCÓRBICO.....	19
1.4.2 BENEFICIOS DEL ÁCIDO ASCÓRBICO.....	20
<b>1.5. COMPUESTOS FENOLICOS</b> .....	21
1.5.1 CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....	21
1.5.2 FUNCIONES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....	22
1.5.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	23
1.5.3.1 MECANISMO DE ACCIÓN.....	23

<b>1.6. GENOTOXICIDAD.....</b>	<b>24</b>
<b>1.7. LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA.....</b>	<b>25</b>
<b>1.8. ENSAYO COMETA.....</b>	<b>26</b>
1.8.1 METODOLOGÍA Y CONSIDERACIONES TECNICAS.....	27
1.8.2 EVALUACIÓN.....	29
<b>CAPITULO II.....</b>	<b>31</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2. MATERIALES.....</b>	<b>31</b>
2.2.1 MATERIAL VEGETAL.....	31
2.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO.....	31
<b>2.3. MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
2.3.1 OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL.....	34
2.3.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	35
<b>2.4. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO.....</b>	<b>35</b>
2.4.1 MÉTODO VOLTAMÉTRICO.....	35
2.4.2 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO POR VOLTAMETRIA.....	36
2.4.3 CÁLCULOS.....	37
<b>2.5. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES.....</b>	<b>37</b>
2.5.1 MÉTODO DE FOLLIN-CIOCALTEU.....	37
2.5.2 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES POR ESPECTROFOTOMETRÍA.....	37
2.5.3 CÁLCULOS.....	39
<b>2.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL <i>Corryocactus brevistylus</i>.....</b>	<b>39</b>
2.6.1 MÉTODO DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL). BRAND- WILLIAMS ET AL. 1995.....	39
2.6.2 CÁLCULOS.....	42

2.6.3 MÉTODO ABTS (ACIDO 2,2'-AZINO-BIS-3-ETILBENZOTIAZOLIN-6-SULFONICO). MILLER Y RICE – EVANS, 1997.....	43
2.6.4 CÁLCULOS.....	46
2.6.5 ENSAYO CUPRAC (CAPACIDAD ANTIOXIDANTE REDUCTOR DE ION CÚPRICO). APAK ET. AL. 2004.....	47
2.6.6 CÁLCULOS.....	49
<b>2.7. DETERMINACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DEL <i>Corryocactus brevistylus</i> POR EL ENSAYO COMETA.....</b>	<b>49</b>
2.7.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE <i>Corryocactus brevistylus</i> (SANCAYO).....	49
2.7.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	49
<b>2.8. FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES.....</b>	<b>60</b>
<b>2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>61</b>
<b>CAPITULO III.....</b>	<b>62</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>62</b>
<b>3.1. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO.....</b>	<b>62</b>
<b>3.2. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES.....</b>	<b>64</b>
<b>3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL <i>Corryocactus brevistylus</i>.....</b>	<b>66</b>
3.3.1 MÉTODO DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL). ....	66
3.3.2. MÉTODO ABTS (ACIDO 2,2'-AZINO-BIS-3-ETILBENZOTIAZO LIN-6-SULFONICO).....	68
3.3.3 ENSAYO CUPRAC (CAPACIDAD ANTIOXIDANTE REDUCTOR DE ION CÚPRICO). ....	69
3.3.4 COMPARACIÓN DE LOS TRES METODOS QUE DETERMINAN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL <i>Corryocactus brevistylus</i> ...	71
3.3.5 INFLUENCIA DEL ÁCIDO ASCÓRBICO Y POLIFENOLES TOTALES EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL <i>Corryocactus brevistylus</i> .....	74
<b>3.4. DETERMINACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DEL <i>Corryocactus brevistylus</i> POR EL ENSAYO COMETA.....</b>	<b>75</b>
3.4.1 VIABILIDAD CELULAR.....	75
3.4.2 CUANTIFICACION DEL DAÑO DE DNA.....	75

3.4.3 INFLUENCIA DEL ÁCIDO ASCÓRBICO Y POLIFENOLES TOTALES EN LA GENOTOXICIDAD DEL <i>Corryocactus brevistylus</i> .....	87
<b>CAPITULO IV</b> .....	89
<b>CONCLUSIONES</b> .....	89
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	90
<b>REFERENCIAS</b> .....	91



## INDICE DE FIGURAS

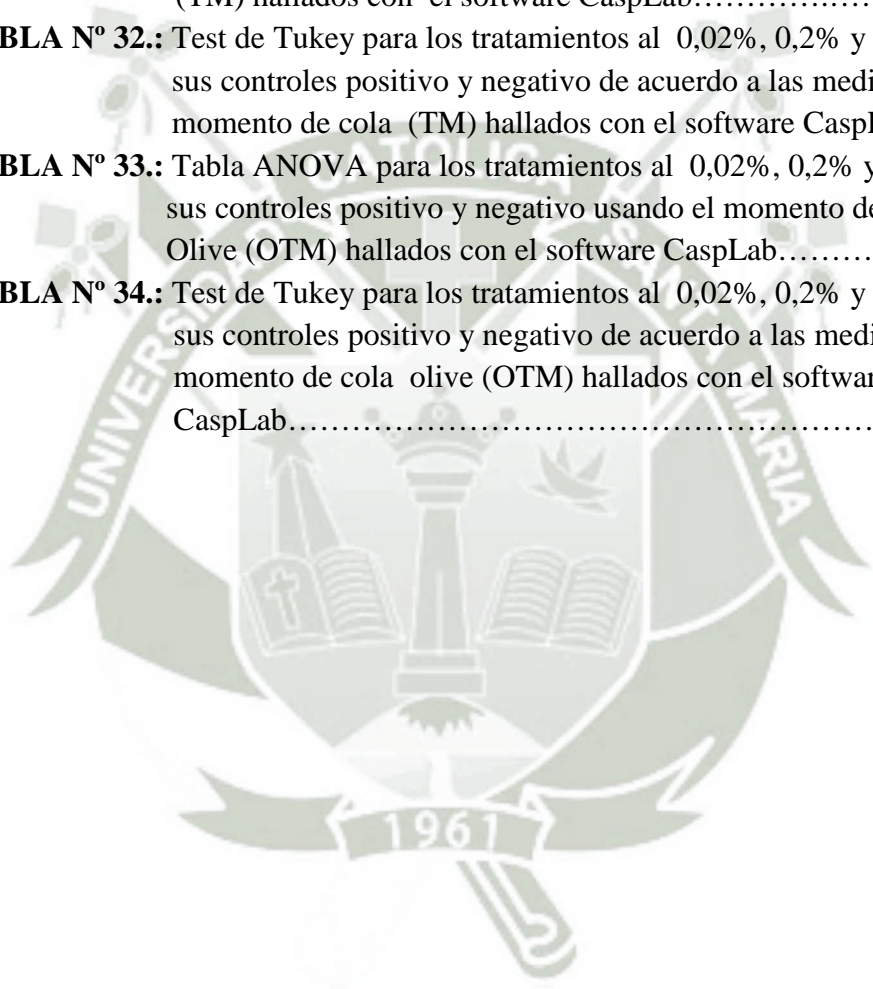
<b>FIGURA N° 1.:</b> Fruto de <i>Corryocactus brevistylus</i> .....	2
<b>FIGURA N° 2.:</b> Distribución del <i>Corryocactus brevistylus</i> en las laderas de la Cordillera de los Andes.....	3
<b>FIGURA N° 3.:</b> Neutralización del radical libre por un antioxidante.....	13
<b>FIGURA N° 4.:</b> Mecanismos de reacción por transferencia de un solo electrón y transferencia de átomos de hidrógeno.....	17
<b>FIGURA N° 5.:</b> Estructura química del ácido ascórbico.....	19
<b>FIGURA N° 6.:</b> Formas moleculares en equilibrio de la vitamina C.....	19
<b>FIGURA N° 7.:</b> Estructura de algunos compuestos fenólicos.....	22
<b>FIGURA N° 8.:</b> Esquema típico de un portaobjetos con las capas de agarosa dispuestas tipo sándwich.....	28
<b>FIGURA N° 9.:</b> Clasificación visual por análisis visual, observadas en el microscopio luego de una tinción con nitrato de plata. (a) Grado cero o sin daño, (b) Grado 1, (c) Grado 2, (d) Grado 3, (e) Grado 4, (APN) células apoptóticas.....	30
<b>FIGURA N° 10.:</b> Liofilizado de la muestra y su almacenamiento.....	34
<b>FIGURA N° 11.:</b> Voltámetro Metrohn, 757 VA Computrace.....	36
<b>FIGURA N° 12.:</b> Espectrofotómetro CARY 60 UV – VIS, Agilent Technologies.....	38
<b>FIGURA N° 13.:</b> Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.....	40
<b>FIGURA N° 14.:</b> Estándares para la curva de calibración del reactivo DPPH de menor a mayor concentración de Trolox.....	42
<b>FIGURA N° 15.:</b> Estructura del ABTS <sup>+</sup> antes y después de la reacción con el antioxidante.....	43
<b>FIGURA N° 16.:</b> Estructura de la vitamina E y Trolox.....	44
<b>FIGURA N° 17.:</b> Estándares para la curva de calibración del reactivo ABTS <sup>+</sup> de menor a mayor concentración de Trolox.....	46
<b>FIGURA N° 18.:</b> Reacción del reactivo CUPRAC con un agente antioxidante....	47
<b>FIGURA N° 19.:</b> Estándares para la curva de calibración del método CUPRAC de una menor a mayor concentración de Trolox.....	49
<b>FIGURA N° 20.:</b> Liofilizado de <i>Corryocactus brevistylus</i> (Sancayo).....	62
<b>FIGURA N° 21.:</b> Curva polarográfica de la muestra de <i>Corryocactus brevistylus</i> para la determinación de ácido ascórbico.....	63
<b>FIGURA N° 22.:</b> Curva de calibración de ácido gálico.....	65
<b>FIGURA N° 23.:</b> Representación de la curva de calibración de Trolox – DPPH.....	67
<b>FIGURA N° 24.:</b> Representación de la curva de calibración de Trolox – ABTS.....	69

<b>FIGURA N° 25.:</b> Representación de la curva de calibración de Trolox – CUPRAC.....	70
<b>FIGURA N° 26.:</b> Gráfico de caja y bigotes de los métodos DPPH, ABTS y CUPRAC.....	73
<b>FIGURA N° 27.:</b> Unidades arbitrarias de genotoxicidad registrada en linfocitos de sangre periférica para los diferentes tratamientos con <i>Corryocactus brevistylus</i> .....	76
<b>FIGURA N° 28.:</b> Porcentaje de ADN en cola registrada en linfocitos de sangre periférica expuesta a los tres tratamientos.....	79
<b>FIGURA N° 29.:</b> Gráfico de caja y bigotes para el porcentaje de ADN en cola registrada en linfocitos de sangre periférica expuesta a los tres tratamientos.....	80
<b>FIGURA N° 30.:</b> Efecto genotóxico del extracto acuoso de <i>Corryocactus brevistylus</i> al 0,02%, 0,2% y 2% en células mononucleares mediante el momento de cola (TM) y momento de cola Olive (OTM).....	82
<b>FIGURA N° 31.:</b> Gráfico de caja y bigotes para las medias del momento de cola (Tail Moment) obtenidos en el tratamientos al 0,02%, 0,2% y 2% además de los controles negativo y positivo.....	83
<b>FIGURA N° 32.:</b> Gráfico de caja y bigotes para las medias del momento de cola Olive (Olive Tail Moment) obtenidos en el tratamientos al 0,02%, 0,2% y 2% además de los controles negativo y positivo.....	85
<b>FIGURA N° 33.:</b> Comparación del efecto genotóxico del extracto acuoso de <i>Corryocactus brevistylus</i> (sancayo), donde: A: 0,02%, B: 0,2%, C: 2%, D: Control positivo, E: Control negativo.....	86
<b>FIGURA N° 34.:</b> Preparación del Extracto.....	104
<b>FIGURA N° 35.:</b> Extracción de sangre para el aislamiento de linfocitos.....	105
<b>FIGURA N° 36.:</b> Aislamiento de linfocitos, prueba de viabilidad e incubación con el extracto.....	105
<b>FIGURA N° 37.:</b> Preparación de las láminas de agarosa.....	106
<b>FIGURA N° 38.:</b> Lisis.....	107
<b>FIGURA N° 39.:</b> Electroforesis.....	107
<b>FIGURA N° 40.:</b> Neutralización.....	107
<b>FIGURA N° 41.:</b> Tinción.....	108
<b>FIGURA N° 42.:</b> Visualización en el microscopio.....	108
<b>FIGURA N° 43.:</b> Análisis en el software CaspLab.....	109

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA N° 1.:</b> Contenido en vitamina C y polifenoles de distintos frutos.....	5
<b>TABLA N° 2.:</b> Composición química de la pulpa y cáscara del <i>Corryocactus brevistylus</i> .....	5
<b>TABLA N° 3.:</b> Especies Reactivas y Radicales Libres.....	8
<b>TABLA N° 4.:</b> Antioxidantes Enzimáticos y no Enzimáticos. ....	14
<b>TABLA N° 5.:</b> Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción SET o HAT.....	16
<b>TABLA N° 6.:</b> Preparación de la tabla de calibración. ....	38
<b>TABLA N° 7.:</b> Preparación de la curva de calibración con DPPH.....	41
<b>TABLA N° 8.:</b> Preparación de la curva de calibración con ABTS <sup>+</sup> .....	45
<b>TABLA N° 9.:</b> Preparación de la curva de calibración para el ensayo CUPRAC.....	48
<b>TABLA N° 10.:</b> Grupos experimentales para el Ensayo Cometa.....	51
<b>TABLA N° 11.:</b> Preparación de cada uno de los tratamientos para el Ensayo Cometa.....	51
<b>TABLA N° 12.:</b> Interpretación de la cantidad de ADN en la cola.....	59
<b>TABLA N° 13.:</b> Contenido de ácido ascórbico en <i>Corryocactus brevistylus</i> .....	63
<b>TABLA N° 14.:</b> Datos de la curva de calibración para polifenoles totales.....	64
<b>TABLA N° 15.:</b> Contenido de polifenoles totales en <i>Corryocactus brevistylus</i> ...	65
<b>TABLA N° 16.:</b> Datos de la curva de calibración para Trolox – DPPH.....	67
<b>TABLA N° 17.:</b> Actividad antioxidante del sancayo por DPPH.....	68
<b>TABLA N° 18.:</b> Datos de la curva de calibración para Trolox – ABTS.....	68
<b>TABLA N° 19.:</b> Actividad antioxidante del sancayo por ABTS.....	69
<b>TABLA N° 20.:</b> Datos de la curva de calibración para Trolox – CUPRAC.....	70
<b>TABLA N° 21.:</b> Actividad antioxidante del sancayo por CUPRAC.....	71
<b>TABLA N° 22.:</b> Resultados de la actividad antioxidante a través de los métodos DPPH, ABTS y CUPRAC.....	71
<b>TABLA N° 23.:</b> ANOVA para la comparación de métodos sobre la actividad antioxidante.....	72
<b>TABLA N° 24.:</b> Test de Tukey para la comparación de métodos sobre la actividad antioxidante.....	72
<b>TABLA N° 25.:</b> Efecto del <i>Corryocactus brevistylus</i> en linfocitos de sangre periférica.....	76
<b>TABLA N° 26.:</b> Porcentaje promedio de ADN en cola registrada en grupos de linfocitos de sangre periférica tratadas con diferentes concentraciones de <i>Corryocactus brevistylus</i> y su correspondiente control negativo y positivo.....	78
<b>TABLA N° 27.:</b> Porcentaje de ADN en cola y nivel de daño registrados en linfocitos de sangre periférica de los tres tratamientos.....	78

<b>TABLA N° 28.:</b> Tabla ANOVA para los porcentajes de DNA en cola hallados en las concentración del 0,02%, 0,2% y 2%, y los controles positivo y negativo.....	79
<b>TABLA N° 29.:</b> Test de Tukey para la comparación de los tratamientos con <i>Corryocactus brevistylus</i> y los controles negativo y positivo....	80
<b>TABLA N° 30.:</b> Promedios globales del Momento de Cola (TM) y Momento de Cola Olive (OTM) registradas en los cometas analizados por el software CaspLab.....	81
<b>TABLA N° 31.:</b> Tabla ANOVA para los tratamientos al 0,02%, 0,2% y 2%, y sus controles positivo y negativo usando el momento de cola (TM) hallados con el software CaspLab.....	82
<b>TABLA N° 32.:</b> Test de Tukey para los tratamientos al 0,02%, 0,2% y 2%, y sus controles positivo y negativo de acuerdo a las medias del momento de cola (TM) hallados con el software CaspLab.....	83
<b>TABLA N° 33.:</b> Tabla ANOVA para los tratamientos al 0,02%, 0,2% y 2%, y sus controles positivo y negativo usando el momento de cola Olive (OTM) hallados con el software CaspLab.....	84
<b>TABLA N° 34.:</b> Test de Tukey para los tratamientos al 0,02%, 0,2% y 2%, y sus controles positivo y negativo de acuerdo a las medias del momento de cola olive (OTM) hallados con el software CaspLab.....	84



## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el contenido de ácido ascórbico y polifenoles totales del Sancayo (*Corryocactus brevistylus*), además de su actividad antioxidante y su efecto genotóxico en linfocitos de sangre periférica por el ensayo cometa

Se utilizaron frutos de *Corryocactus brevistylus* originarios de la provincia de Caylloma, perteneciente al departamento de Arequipa, los cuales fueron liofilizados en el laboratorio de Ingeniería Alimentarias de la Universidad Nacional de San Agustín. Se analizó morfológicamente una muestra de ellos en el herbario de la misma universidad y se confirmó su pertenencia a la especie *Corryocactus brevistylus*.

Se determinó el contenido de ácido ascórbico por el método voltamétrico obteniendo un valor de 1,42 mg A.A. /g de muestra liofilizada y el contenido de polifenoles totales por el método colorimétrico de Follin – Ciocalteu hallando un valor promedio de 6,41 mg GAE/g de muestra. Así mismo, se evaluó la actividad antioxidante del *Corryocactus brevistylus* obteniendo valores promedio de 90,30 umol TE/ g para el método DPPH, 154,20 umol TE/ g para el método ABTS y finalmente 76,74 umol TE/ g para el ensayo CUPRAC.

La evaluación de la genotoxicidad del sancayo (*Corryocactus brevistylus*) se realizó con linfocitos de sangre periférica extraídos por gradiente de densidad con Ficoll-Paque Premium. Las células se expusieron con el extracto acuoso de sancayo a concentraciones de 0,02 %, 0,2 % y 2 % a 37 °C por 30 min para su posterior fijación en portaobjetos embebidos previamente con agar. Se realizó el ensayo cometa con las células ya tratadas por medio de un tratamiento de Lisis por espacio de 18 h, incubación en una solución alcalina por 10 min, corrida electroforética a 30 V y 246 mA por 20 min, neutralización y finalmente teñido con nitrato de plata. Se contó y clasificó 50 cometas al azar, para luego analizarlos en el software CaspLab y obtener

sus resultados en base al % de DNA en cola (Tail DNA %), unidades arbitrarias (UA), momento de cola (TM) y el momento de cola Olive (OTM).

En el estudio de genotoxicidad, se obtuvo un valor del  $7,72 \pm 0,85$  de porcentaje de DNA en cola para el tratamiento al 0,02 % y valores de momento de cola (TM) de  $2,27 \pm 0,24$  y de momento de cola Olive (OTM) de  $3,01 \pm 0,47$ . Los extractos al 0,2 % y 2 % alcanzaron valores de porcentaje de DNA en cola de  $15,32 \pm 1,59$  y  $24,58 \pm 2,3$  respectivamente, además de valores en su TM de  $7,53 \pm 1,12$  y  $14,20 \pm 3,80$  y en su OTM de  $6,38 \pm 0,76$  y  $10,45 \pm 0,90$ .

Como resultados del estudio se concluyó que para la variedad de Caylloma, existe un mayor contenido de polifenoles totales equivalentes en mg de ácido gálico (GAE) por gramo de muestra (6,41 mg GAE/g) a comparación del contenido de ácido ascórbico (1,42 mg AA/g) encontrados en los frutos de *Corryocactus brevistylus* por lo que se puede presumir que su actividad antioxidante es atribuida en su mayoría a la existencia de polifenoles totales en el sancayo con una poca influencia de ácido ascórbico encontrado. De la misma forma, se observó que su extracto en las concentraciones del 0,02 % y 0,2 % no muestran genotoxicidad en las células mononucleares mientras que al 2 % es considerado ligeramente genotóxico con valores cercanos a los obtenidos con el control positivo. Se puede presumir que la genotoxicidad del sancayo es influenciada, en su mayoría, al poder prooxidante del ácido ascórbico existente en el fruto.

**Palabras clave:** *Corryocactus brevistylus*, ácido ascórbico, polifenoles totales, actividad antioxidante, genotoxicidad, ensayo cometa.

## ABSTRACT

In this study the content of ascorbic acid and total polyphenols of Sancayo (*Corryocactus brevistylus*) was evaluated, in addition to its antioxidant activity and genotoxic effect in peripheral blood lymphocytes through the comet assay.

*Corryocactus brevistylus* fruits belonging to Caylloma province, from the department of Arequipa, were freeze-dried in the laboratory of Food Engineering, National University of San Agustín. Sancayo sample was analyzed morphologically in the herbarium of the same university and its species *Corryocactus brevistylus* was confirmed.

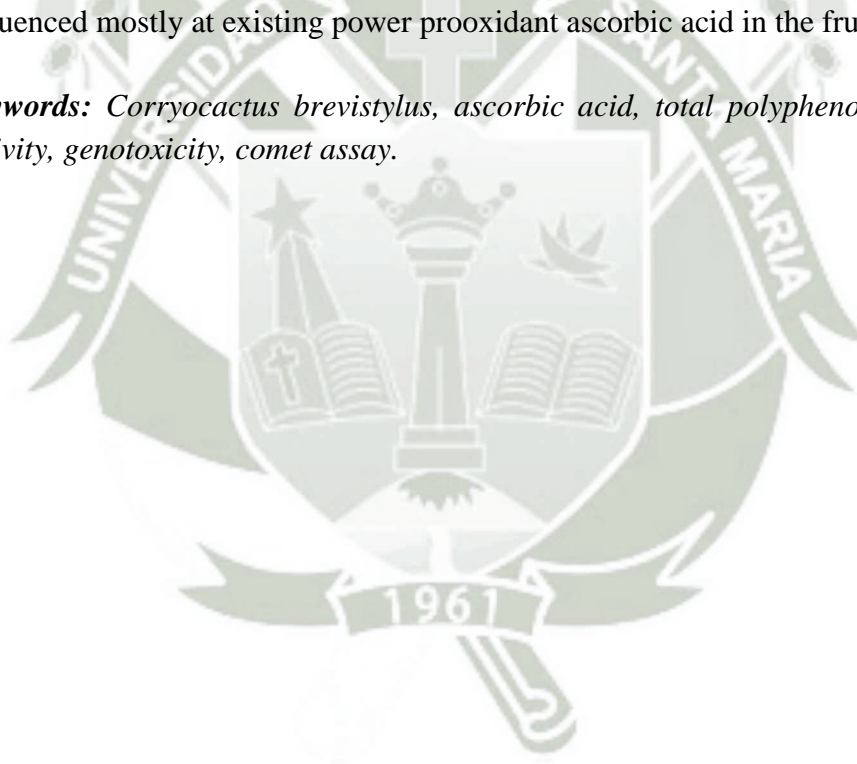
The ascorbic acid content was determined by the voltammetric method, obtaining a value of 1,42 mg AA /g of lyophilized sample and the total polyphenols content by the Follin – Ciocalteu method obtaining an average value of 6,41 mg GAE /g of lyophilized sample. Also, the antioxidant activity of *Corryocactus brevistylus* was evaluated, obtaining average values of 90,30  $\mu\text{mol TE /g}$  for DPPH method, 154,20  $\mu\text{mol TE /g}$  for the ABTS method and finally 76,75  $\mu\text{mol TE /g}$  for CUPRAC method.

The genotoxicity of *Corryocactus brevistylus* was evaluated using peripheral blood lymphocytes extracted by density gradient Ficoll-Paque Premium. Cells were exposed to the aqueous extract of sancayo at concentrations of 0,02 %, 0,2 % and 2 % at 37 ° C for 30 min. for subsequently pin up with agar in previously embedded glass slides. The comet assay was performed in treated cells, using a lysis treatment for 18 h, incubation in an alkaline solution for 10 min., electrophoresis run at 30 V and 246 mA for 20 min, neutralization and finally stained with Silver Nitrate. 50 comets were counted randomly and classified using the CaspLab software, and get the results based on Tail DNA %, arbitrary units (AU), Tail Moment (TM) and Tail Moment Olive (OTM).

In the genotoxicity studies, was obtained for treatment 0,02 %, a value of  $7,72 \pm 0,85$  Tail DNA %, in Tail Moment (TM) a value of  $2,27 \pm 0,24$  and for Olive Tail Moment (OTM)  $3,01 \pm 0,47$ . Extracts 0,2% and 2% reached values for Tail DNA % of  $15,32 \pm 1,59$  and  $24,58 \pm 2,3$  respectively, values of  $7,53 \pm 1,12$  and  $14,20 \pm 3,80$  for TM and finally  $6,38 \pm 0,76$  and  $10,45 \pm 0,90$  for OTM.

As results of the study it was concluded that for the variety of Caylloma, there is a higher content of total polyphenols in mg of gallic acid equivalent (GAE) per gram of sample ( $6,41 \pm 0,13$  mg GAE / g) compared to the content ascorbic acid (AA  $1,42 \pm 0,03$  mg / g) found in the fruits of *Corryocactus brevistylus* so it can be assumed that its antioxidant activity is attributed mostly to the presence of polyphenols in the Sancayo with a little influence of ascorbic acid founded. Likewise, it was observed that the extract at concentrations of 0,02 % and 0,2 % did not show genotoxicity mononuclear cells while 2% is considered genotoxic slightly nearer to those obtained with the positive control. It can be assumed that the genotoxicity of Sancayo is influenced mostly at existing power prooxidant ascorbic acid in the fruit.

**Keywords:** *Corryocactus brevistylus*, ascorbic acid, total polyphenols, antioxidant activity, genotoxicity, comet assay.



## INTRODUCCIÓN

Desde siempre la naturaleza ha proveído al hombre de una gran variedad de productos naturales que poseen propiedades beneficiosas para el ser humano y las células que conforman nuestro organismo. Estos productos naturales en su mayoría contienen moléculas capaces de contrarrestar los agentes nocivos a los cuales nuestro cuerpo y nuestras células están expuestos día a día, las que además dañan su estructura y por ende la salud de las personas.

Las moléculas capaces de proteger a nuestro organismo de los efectos causados por los radicales libres son conocidas como antioxidantes, los cuales son capaces de retardar o prevenir la oxidación de las moléculas de nuestro organismo ayudándonos a prevenir posibles enfermedades que afecten a futuro nuestra salud.<sup>91</sup>

La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante en la cual se pueden producir radicales libres. Los radicales libres al tener un electrón desapareado con capacidad de aparearse, buscan reaccionar con moléculas estables con el fin de alcanzar una estabilidad electroquímica conduciendo a nuestro organismo a diversas enfermedades, como: envejecimiento precoz, problemas del sistema cardiovascular (arteriosclerosis), problemas en el sistema nervioso, daño genético (mutaciones y cánceres), entre otras. Debido a que la capacidad de nuestro organismo para contrarrestar los radicales libres es limitada, es de mucho interés el consumo de alimentos naturales que proporcionen sustancias beneficiosas a la salud.<sup>92</sup>

Entre toda esa gran variedad natural, encontramos a la especie *Corryocactus brevistylus* o conocida como “sancayo”, el cual es una cactácea que tiene como fruto a unas bayas globulares comestibles las cuales tienen un alto contenido en vitamina C y polifenoles, llevándolos así a tener propiedades antioxidantes.<sup>85,64</sup>

El hábitat de esta especie se sitúa en el Suroeste de América, desde el sur del Perú abarcando los departamentos de Ayacucho, Arequipa, Moquegua y Tacna, hasta el norte de Chile por las regiones de Arica y Parinacota.<sup>64,14</sup> La mayor parte de la producción silvestre del fruto es consumida por los lugareños de la zona los cuales conocen de él, mientras que otra pequeña parte de este es vendido a la población la cual en su mayoría no conoce del fruto y mucho menos de sus propiedades.<sup>85</sup>

Existen numerosos estudios relacionados con la medición de la actividad antioxidante de diversas especies, como por ejemplo, la uva, limo, mango y tomate, en los que se da a conocer sus componentes principales, otorgándoles así una mayor importancia en las diferentes industrias.<sup>74</sup>

Los productos naturales al poseer componentes y propiedades beneficiosas para la salud de personas, han traído consigo la atención de la industria alimentaria y farmacéutica por lo que es necesario evaluar la toxicidad de los mismos para su uso y consumo seguro. El estudio genotóxico de diversos productos, suele ser evaluado en modelos de estudio *in vitro* como *in vivo* a través de numerosas técnicas siendo una de ellas el ensayo cometa. Este ensayo consiste en evaluar la formación de cometas a partir de células tratadas previamente con el extracto a estudiar, usando diversos modelos de estudio como el uso de linfocitos de sangre periférica el cual ha sido muy empleado en el estudio de genotoxicidad.<sup>103</sup>

Debido a la gran importancia atribuida al consumo del fruto de *Corryocactus brevistylus*, es que se realizó el presente trabajo en el que evaluó el contenido de ácido ascórbico por el método voltamétrico, el contenido de polifenoles totales por el método de Follin Ciocalteu, la actividad antioxidante por los métodos DPPH, ABTS y CUPRAC y la evaluación de su genotoxicidad en linfocitos de sangre periférica a través del ensayo cometa. Se evaluó los resultados obtenidos con los métodos propuestos para la determinación de la actividad antioxidante del Sancayo, además del efecto de las diferentes concentraciones de *Corryocactus brevistylus* usadas para su estudio genotóxico. Con el estudio de esta especie se espera conocer más acerca de este fruto y fomentar su consumo en la ciudad de Arequipa.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el contenido de ácido ascórbico y polifenoles totales del Sancayo (*Corryocactus brevistylus*) y determinar su actividad antioxidante y genotoxicidad en linfocitos de sangre periférica.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar el contenido de ácido ascórbico existente en el fruto sancayo (*Corryocactus brevistylus*)
- Determinar el contenido de polifenoles totales presentes en el fruto sancayo (*Corryocactus brevistylus*)
- Evaluar la actividad antioxidante de los frutos sancayo (*Corryocactus brevistylus*) con los métodos DPPH, ABTS y CUPRAC
- Evaluar el efecto genotóxico del fruto sancayo (*Corryocactus brevistylus*) en linfocitos de sangre periférica a través del ensayo cometa.

## HIPÓTESIS

Debido a que el Sancayo (*Corryocactus brevistylus*) es una especie endémica con antecedentes de poseer cantidades considerables de vitamina C y posiblemente también de polifenoles totales, es que se evaluó la actividad antioxidante del Sancayo y su poder genotóxicos en linfocitos de sangre periférica a través del ensayo cometa.

## VARIABLES E INDICADORES

Las variables dependientes e independientes del proceso:

PRUEBA	VARIABLES		INDICADORES
<b>Ácido Ascórbico</b>	Variables Dependientes	Concentración de ácido ascórbico presente en la muestra de <i>Corryocactus brevistylus</i> .	- Concentración obtenida de acuerdo al voltaje emitido.
	Variables Independientes	Concentración del sancayo	- Extracto acuoso al 2%
<b>Polifenoles Totales</b>	Variables Dependientes	Concentración de polifenoles totales presentes en la muestra de <i>Corryocactus brevistylus</i> .	- Cambio de coloración a través del método de Follin –Ciocalteu. - Absorbancia obtenida por el método espectrofotométrico.
	Variables Independientes	Concentración del sancayo	- Extracto metanólico al 2%
<b>Actividad Antioxidante</b>	Variables Dependientes	Presencia o ausencia de polifenoles y/o vitamina C en la muestra de <i>Corryocactus brevistylus</i>	- Cambio de coloración a través del método DPPH, ABTS y CUPRAC - Absorbancia obtenida por el método espectrofotométrico.
	Variables Independientes	Concentración del sancayo	- Extracto metanólico al 2%
<b>Ensayo Cometa</b>	Variables Dependientes	Efecto genotóxico del extracto de <i>Corryocactus brevistylus</i>	- Unidades arbitrarias
			- % DNA en cola
			- Momento de cola (Tail Moment- TM) - Momento de cola olive (Olive Tail Moment- OTM)
	Variables Independientes	Concentración del sancayo	- Extracto acuoso al 0,02%, 0,2% y 2%

## CAPITULO I

### MARCO TEORICO

#### 1.1. SANCAYO (*Corryocactus brevistylus*)

##### 1.1.1 CLASIFICACION Y NOMBRES COMUNES

El Sancayo es una especie endémica de las vertientes occidentales del sur del Perú (Arequipa, Ayacucho, Moquegua y Tacna) <sup>15</sup> así también como de la precordillera andina del norte de Chile (Arica, Parinacota y Tarapacá).<sup>40</sup>

El *Corryocactus brevistylus* es una especie de cactácea de ramificación libre de 2 a 5 m de altura, con unos tallos de color verde oscuro a verde claro amarillento de 12 - 15 cm de diámetro ramificado principalmente desde la base. Forma parte de la familia de las *Cactáceas* y es conocida principalmente por sus frutos, los cuales son unas bayas de color verdoso de 7 - 10 cm de diámetro, redondos y cubierto con abundante espinas, conocidas entre la población andina como Sancayo o Sanky. <sup>5</sup>

La posición taxonómica del *Corryocactus brevistylus* es la siguiente: <sup>14</sup>

Reino:	<i>Plantae</i>
Phyllum/División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Caryophyllales</i>
Familia:	<i>Cactaceae</i>
Género:	<i>Corryocactus</i>
Especie:	<i>C. brevistylus</i>
Subespecie:	<i>puquiensis</i>

**Nombres Comunes:** Sancayo, sanky, suja, cure, chona, cardón, tacaysiña, kontumela, guacalla, quiso de flores amarillas.

Se han reconocido dos subespecies de *Corryocactus brevistylus*: *brevistylus* y *puquiensis*. La subespecie *brevistylus* suele ser de 2-3 m de alto y posee unas flores de 10 cm de diámetro, esta subespecie suele producirse principalmente en la parte sur de la cordillera. La subespecie *puquiensis* posee unos tallos de 5 m. alto y por lo general unas flores de 6 cm de diámetro; se produce en la parte más septentrional de la cordillera, sobre todo en Arequipa, Perú. <sup>5</sup>

### 1.1.2 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

Es una planta de cuerpo arbustivo o a menudo arbóreo, de pocas costillas, constituido por tallos carnosos ramificados libremente desde la base con una coloración de verde oscuros a verde claro y conformado con espinas largas de hasta 24 cm de largo.<sup>13</sup>

Las ramas son articuladas y frecuentemente de varios metros de largo y de 8 a 15 cm de grosor. Poseen una epidermis verde que puede tornarse más adelante amarillenta por la insolación.<sup>40</sup>

Las costillas son de 6 a 9 distribuidos en forma triangular en corte transversal, con areolas redondeadas, separadas entre sí por 2 a 4 cm. Tiene un color café-anaranjadas cuando son nuevas y que se vuelven grises con el paso del tiempo.<sup>40</sup>

Las espinas son rectas y derechas de un color marrón que más adelante se hacen ligeros. La longitud de los mismos es muy desigual de más de 1 – 3 cm de largo las del borde y hasta 20 – 24 cm de largo las más céntricas.<sup>5,40</sup>



**FIGURA N° 1.: Fruto de *Corryocactus brevistylus*.** Extraído de *Ostolaza N., 2011.*

Las flores tienen una forma de embudo, son anchas y están ubicadas de forma lateral. Tienen una constricción por encima del ovario, poseen una corola muy abierta y un tubo floral densamente cubierto de escamas. El tamaño que posee es de 9 cm de largo y 10 cm de ancho, no tienen aroma y son de un color amarillo – doradas.<sup>64</sup>

Sus frutos se presentan de forma globular con un tamaño de 7 a 10 cm de diámetro, espinoso (espinas que pierde al madurar) y de un color verde oliva (Ver Figura N° 1). Su carne es ácida y jugosa con numerosas semillas negras y una cáscara con un interior mucilaginoso.<sup>64</sup>

### 1.1.3 ORIGEN Y DISTRIBUCION

El género *Corryocactus* es uno de los últimos géneros conocidos de cactáceas en el Suroeste de América. Es nativo del sur del Perú, norte de Chile y oeste de Bolivia, englobando alrededor de 30 especies la mayoría perteneciente al Perú (Ver Figura N° 2.), y el resto a Bolivia y Chile.<sup>64</sup>



**FIGURA N° 2.: Distribución del *Corryocactus brevistylus* en las laderas de la Cordillera de los Andes.** Extraído de: <http://www.cactusinhabitat.org/index.php?p=specie&id=37&l=es>

Las comunidades con Cactáceas de este tipo son propias de las vertientes occidentales y valles profundos interiores de la Cordillera Andina (Ver figura N° 2). Los biótupos sobre los que se asientan son muy característicos por su escasa estabilidad, con ríos de fango, riadas de derrubios y desprendimientos.<sup>87</sup>

El descubrimiento de la especie *Corryocactus* está relacionada con su nombre, el cual honra al Ing. Thomas Avery Corry (1862-1942) quien ayudó al Dr. Joseph

Rose en su labor de campo y descubrimiento de las tres primeras especies del género.<sup>14</sup>

#### **1.1.4 CARACTERÍSTICAS ECOLÓGICAS DEL *Corryocactus brevistylus***

Esta especie crece en laderas de cerros además de lugares pedregosos, arenosos y rocosos con poca humedad, con una altitud de entre los 2,500 a 3,500 msnm y con una tolerancia de temperatura mínima de hasta 10 °C. Las condiciones de crecimiento del *Corryocactus brevistylus* lo convierte en un fruto andino 100 % ecológico y que se produce libre de fertilizantes o pesticidas químicos.<sup>28</sup>

Las plantas de esta especie poseen características especiales que les permiten aprovechar y almacenar mejor el agua por mucho más tiempo, la más conocida es la presencia de espinas que funcionan como un receptor y conservador de la humedad. El *Corryocactus brevistylus* genera un ecosistema con un hábitat equilibrado en biodiversidad, genera microclimas favorables para otras especies, captura el CO<sub>2</sub> brindando a su vez O<sub>2</sub> y además evita la erosión de los suelos en las laderas con altas pendientes.<sup>28</sup>

#### **1.1.5 PROPIEDADES NUTRICIONALES**

Los frutos de sancayo poseen una elevada cantidad de agua por lo que suele ser más jugosa que carnosa. En el interior del jugo hay una gran cantidad de sustancias entre las que se encuentran principalmente vitaminas, polifenoles y minerales. La vitamina predominante en esta especie es la vitamina C la cual se encuentra en mayor cantidad que la naranja (50 mg /100 g), el limón (45 – 50 mg/ 100 g) y otros frutos con propiedades antioxidantes. (Ver Tabla N° 1)<sup>28</sup>

Además del contenido de vitamina C, se ha encontrado que la especie *Corryocactus brevistylus* perteneciente a la variedad de Ayacucho posee una cantidad considerable de polifenoles totales de 10,12 mg GAE/g (1012 mg GAE/ 100 g) que al ser comparada con otros frutos comestibles como: mandarina (242,6 mg GAE/ 100 g), manzana (426,7 mg GAE/ 100 g) o ciruela (376,5 mg GAE/ 100 g), se observa que sobrepasa en gran medida a estas otras especies. (Ver Tabla N° 1)<sup>54</sup>

El tercer componente de importancia lo constituyen los minerales entre los cuales podemos mencionar al calcio, fósforo y potasio, encontrándose que este último se encuentra en una mayor cantidad que la existente en el plátano (358 mg/100 g).<sup>85</sup>

**TABLA N° 1.: Contenido en vitamina C y polifenoles de distintos frutos.**

Extraído de *Geigy D., 1975.*

Fruto (pulpa)	Vitamina C:	Polifenoles:	
	mg de ácido ascórbico/100 g	mg de ácido gálico/ 100 g	Autor
Albaricoque fresco	7	45,7	<i>Tosun I., et all. 2003</i>
Cereza fresca	10	70,7 - 241,4	<i>Melicháčová S., et all. 2010</i>
Ciruela fresca	6	376,5	<i>Zapata S., et all. 2014</i>
Fresa fresca	60	1638,4	<i>Zapata S., et all. 2014</i>
Limón fresco	50	30 - 35	<i>Zapata P., et all. 2006</i>
Limón	45	60 - 70	<i>Zapata P., et all. 2006</i>
Mandarina fresca	31	242,6	<i>Zapata S., et all. 2014</i>
Manzana fresca	5	426,7	<i>Zapata S., et all. 2014</i>
Melocotón fresco	7	15 - 25	<i>Zapata P., et all. 2006</i>
Melón fresco	33	20 - 30	<i>Zapata P., et all. 2006</i>
Sandía	7	10 - 20	<i>Zapata P., et all. 2006</i>
Naranja	50	40 - 50	<i>Zapata P., et all. 2006</i>
Pera fresca	4	124,7	<i>Zapata S., et all. 2014</i>
Camu camu (liofilizado)	1445	1385,549 - 1188,573	<i>Salgado N., et all. 2012</i>

**TABLA N° 2.: Composición química de la pulpa y cáscara del *Corryocactus***

*brevistylus.* Extraído de: <http://www.lamolina.edu.pe/gaceta/edicion2006/notas/nota153.htm>

Componente	Pulpa	Cáscara
Caloría (Kcal).	17,6	28
Humedad (g/100g).	95,2	91,6
Carbohidrato g/100g).	3,1	5,6
Ceniza (g/100g).	0,4	1,4
Grasa (g/100g).	0	0
Fibra (g/100g).	0,9	1,7
Proteína (g/100g)	1,3	1,4
<b>Minerales</b>		
Calcio (ppm)	104,5	752
Potasio(ppm)	5566,4	1743,9
Fosforo (mg/100g)	12,8	6,7
<b>Vitaminas</b>		
Vitamina C (mg/100g)	57,1	2,5

En la Tabla N° 2 se puede observar la composición química de la pulpa y cáscara del *Corryocactus brevistylus*

De acuerdo con *Lobo V. et all*, el daño de los radicales libres se puede controlar con una defensa antioxidante adecuada y la ingesta de nutrientes antioxidantes pudiendo contribuir así a la mejora de la calidad de vida.<sup>50</sup> La vitamina C y polifenoles totales existente en las verduras y vegetales, como la *Myrciaria dubia* (camu – camu), son potentes antioxidante los cuales eliminan de manera eficaz los radicales libres existentes en nuestro organismo,<sup>2</sup> a la vez que ayudan a prevenir la formación de especies nitrosantes las cuales pueden dañar directamente el DNA de nuestras células.<sup>99</sup>

De acuerdo con un artículo de la Fundación del Consejo Internacional sobre Información Alimentaria (International Food Information Council Foundation) el potasio es un nutriente esencial para la salud en sus niveles más básicos, el cual permite el buen funcionamiento de las células, que junto con el sodio y otros compuestos trabaja como un electrolito que regula el balance de los fluidos del cuerpo. Estas acciones afectan las señales nerviosas, contracciones musculares y el tono de los vasos sanguíneos con un impacto de largo alcance en el cuerpo y el sistema cardiovascular.<sup>43</sup>

El consumo de sancayo es muy recomendado en la dieta de las personas que deseen bajar de peso, debido a su bajo contenido en azúcar y su composición rica en calcio, fósforo, vitamina C y polifenoles totales.<sup>43, 54</sup>

### 1.1.6 USOS

Posee propiedades curativas para las afecciones hepáticas y renales debido a su poder antioxidante. Se considera que el estrés oxidativo provoca un espectro de enfermedades y desempeña una función patogenética en la hepatopatía alcohólica, las hepatitis virales, la esteatohepatitis no alcohólica, la enfermedad hepática autoinmune, el cáncer hepático y la cirrosis hepática.<sup>69,79</sup> Es por ello que los antioxidantes parecieron alentadores en la prevención y el tratamiento del daño hepático.<sup>55</sup>

Además posee propiedades laxantes, de regulación del colesterol (debido a su contenido en vitamina C), y contra la osteoporosis (por la presencia de calcio).<sup>85</sup>

Desde el punto de vista cosmético, la cáscara del fruto es usado para tratar la alopecia, caspa y seborrea; además, la mucosidad de la misma sirve como

cicatrizante de heridas leves. Además de ello, el tallo es utilizado de forma triturada como analgésico y como tratamiento a los edemas y hematomas.<sup>68</sup>

a. **Uso Interno:**<sup>15</sup>

Debido a su contenido en vitamina C, polifenoles, calcio y potasio, es que se le atribuyen propiedades preventivas al cáncer, osteoporosis y la inflamación arterial, además de propiedades cicatrizantes.

b. **Uso Externo:**<sup>68</sup>

El *Corryocactus brevistylus* es una especie muy interesante, que ofrece lo siguiente:

- El fruto del *Corryocactus brevistylus* ha sido empleado como insumo para la fabricación de mermeladas, jaleas, caramelos, cócteles y bebidas como es el caso del "colca sour".
- Se ha utilizado el sancayo en la elaboración de bebidas natural y energizantes con propiedades antioxidantes.

## 1.2. RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO

### 1.2.1 RADICALES LIBRES

Los radicales libres (RL) son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado por lo que son muy reactivos y tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Esta reactividad es la base de su toxicidad y de su corta vida media.<sup>52</sup>

La función que desarrollan los radicales libres presenta dos caras opuestas, por un lado actúan como mediadores y reguladores a concentraciones fisiológicas, mientras que a concentraciones elevadas pueden actuar como potentes oxidantes citotóxicos.<sup>92</sup>

En los sistemas vivos se generan muchos tipos de radicales libres, siendo los más conocidos los radicales del oxígeno. Se utiliza el término "especies reactivas del oxígeno" (reactive oxygen species, ROS) como nombre colectivo para referirse a las especies derivadas del oxígeno, incluyendo tanto los derivados radicales como los no radicales, que son agentes oxidantes y/o fácilmente convertibles en radicales. De forma análoga existen especies

reactivas del nitrógeno (RNS), del cloro (RCIS) y del bromo (RBrS) lo cuales se pueden observar en la Tabla N° 3.<sup>35</sup>

Los radicales libres recorren nuestro organismo intentando robar un electrón de las moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido robar el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena que puede destruir nuestras células.<sup>31</sup>

**TABLA N° 3.: Especies Reactivas y Radicales Libres.** Extraído de *Halliwell B., et all, 2004.*

	Radicales Libres	No Radicales
<b>Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)</b>	Superóxido ( $O_2^-$ ), Hidroxilo (OH), Hidroperoxilo ( $HO_2$ ), Peroxilo ( $R_2$ ), Alcoxilo (RO), Carbonato ( $CO_3$ ), Dióxido de carbono ( $CO_2$ )	Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ), Ác. hipocloroso (HOCl), Ozono ( $O_3$ ), Singlete de oxígeno (ROOH), Peróxidos orgánicos (ROOH), Peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) Ác. Peroxinitroso (ONOOH)
<b>Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS)</b>	Óxido nitroso (NO), Dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ )	Ác. nitroso ( $HNO_2$ ), Cation nitrosilo ( $NO^+$ ) Anion nitrosilo ( $NO^-$ ), Tetraóxido de dinitrógeno ( $N_2O_4$ ), Trióxido de dinitrógeno ( $N_2O_3$ ), Peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), Ác. Peroxinitroso (ONOOH), Cation nitrilo ( $NO_2^+$ ), Peroxinitrito de alquilo (ROONO), Cloruro de nitrilo ( $NO_2Cl$ )
<b>Especies Reactivas de Cloro (RCIS)</b>	Cloro atómico (Cl)	Ác. hipocloroso (HOCl), Cloruro de nitrilo ( $NO_2Cl$ ), Cloraminas, Gas de cloro ( $Cl_2$ )
<b>Especies Reactivas de Bromo (RBrS)</b>	Bromo atómico (Br)	Ác. hipobromoso (HOBr)

Los radicales libres pueden generarse a partir de **fuentes endógenas**, relacionadas con el metabolismo del oxígeno y con las diversas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunitario, o de **fuentes exógenas**, como el tabaco, la contaminación del aire, la radiación UV, etc.<sup>31</sup>

Se pueden distinguir 4 fuentes endógenas que originan la mayoría de agentes oxidantes producidos por las células, las cuales son:

- a. **La respiración mitocondrial**, el cual es el principal proceso biológico que además lleva a la generación de anión superóxido en la cadena de transporte de electrones a nivel mitocondrial (respiración celular). Normalmente, la reducción de oxígeno a agua en la cadena respiratoria requiere la transferencia secuencial de electrones, y generalmente esto se acompaña por la formación de radicales libres. Cuando la concentración de ADP es baja los intermediarios de la cadena respiratoria están en estado reducido, y en esa situación hay una gran producción de anión superóxido.<sup>18</sup>
- b. **Las células fagocíticas**, leucocitos, neutrófilos, macrófagos y eosinófilos, los cuales al activarse por medio de mediadores proinflamatorios (prostaglandinas, óxido nítrico) o de productos bacterianos, destruyen las células infectadas por medio de un ataque oxidativo en el que se producen grandes cantidades de  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH$ ,  $NO$ ,  $OCl^-$ . Las infecciones crónicas llevan a una actividad fagocítica continua que provoca una inflamación crónica siendo este el principal factor de riesgo del cáncer.<sup>27,3</sup>
- c. **Los peroxisomas**, los cuales son los encargados de la degradación de ácidos grasos y otras moléculas, producen  $H_2O_2$  como subproducto que es degradado de forma natural por la enzima catalasa. Bajo ciertas condiciones, alguno de los peróxidos escapa a la degradación y se libera a otros compartimentos celulares provocando un incremento del daño por oxidación en el ADN.<sup>44</sup>
- d. **Las enzimas del complejo Citocromo P450**, las cuales son las principales responsables del metabolismo oxidativo de los xenobióticos, producen subproductos oxidantes que pueden dañar el ADN.<sup>101</sup>

Como fuentes exógenas de producción de radicales libres tenemos:

- a. Los óxidos de nitrógeno del humo del tabaco.<sup>18</sup>
- b. Las sales de hierro y cobre, los cuales promueven la generación de radicales oxidantes a partir de peróxidos.<sup>18</sup>

- c. La irradiación con radiaciones electromagnéticas y particularmente la radiación ionizante, la cual daña los tejidos causando fisión del enlace del agua produciendo así átomos de hidrogeno, electrones hidratados y radicales hidroxilo.<sup>16</sup>
- d. Los alimentos que ingerimos a través de la dieta, especialmente los de origen vegetal, que se oxidan en mayor o menor grado generando diferentes tipos de oxidantes como peróxidos, aldehídos, ácidos grasos oxidados y metales de transición.<sup>4</sup>

El daño celular por los radicales libres se da en diferentes macromoléculas, como son:

- a. **Lípidos:** Los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana celular, son una de las principales dianas de los procesos de oxidación inducidos por radicales libres. El daño a los lípidos consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación. *Iniciación*, en donde el ácido graso diana pierde un átomo de hidrógeno convirtiéndose así en un radical lipídico. *Propagación*, en el que este nuevo radical se reorganiza molecularmente para incrementar su estabilidad y reaccionar con el oxígeno dando lugar a un hidroperóxido lipídico y un nuevo radical lipídico, esto conocido como peroxidación lipídica (LPO). *Terminación*, etapa en la que pueden suceder tres cosas: se consume una de las moléculas reactivas ( los ácidos grasos o el oxígeno ), se forma un radical relativamente poco reactivo o se forma un par no radical por la reacción de dos radicales.<sup>86</sup>
- b. **Proteínas:** Las proteínas pueden ser dañadas directa o indirectamente por el contacto con los diversos radicales libres, principalmente  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{RO}\cdot$  y  $\text{RNS}$ . El radical hidroxilo es muy reactivo con las proteínas y causa particularmente modificaciones en la tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína. Forma entrecruzamientos de tipo covalente e induce la fragmentación de la cadena polipeptídica, lo que se traduce en una pérdida de la función o en una mayor susceptibilidad a las enzimas proteolíticas. Las proteínas oxidadas son fácilmente degradadas por enzimas proteolíticas debido a la formación de grupos carbonilo, a la creación de nuevos grupos N-terminales o a cambios conformacionales de la molécula.<sup>72</sup>
- c. **Ácido desoxirribonucleico (DNA):** El daño provocado a nivel del ADN por los radicales libres puede generar mutaciones somáticas provocando la síntesis de proteínas defectuosas, y consecuentemente transformaciones malignas. El daño provocado a nivel de DNA es causado mayormente por los radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) los cuales pueden llegar a oxidar a la

desoxirribosa e inducir el rompimiento del enlace entre este azúcar y el grupo fosfato del siguiente nucleótido. Esto puede provocar rompimientos de cadena sencilla los que pueden ser reparados por medio de las enzimas correspondientes, pero que cuando una gran cantidad de radicales hidroxilo atacan una parte restringida de la molécula de ADN, se forman numerosos rompimientos de cadena sencilla, y con ello rompimientos de cadena doble causando daño permanente al material genético.<sup>95</sup>

### 1.2.2 ESTRÉS OXIDATIVO

Este estrés oxidativo puede darse tanto por un exceso de producción de radicales libres (RL) y especies reactivas de oxígeno (ROS), así como por un problema o alteración en el sistema de defensa antioxidante. En términos químicos, el estrés oxidativo es un gran aumento en la reducción del potencial celular o una gran disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares como el glutatión.<sup>47</sup>

El estrés oxidativo en condiciones severas puede causar la muerte celular, en condiciones moderadas desencadenar la apoptosis y en condiciones intensa puede provocar la necrosis. Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células, preservado por enzimas a través de un constante aporte de energía metabólica, sin embargo desbalances en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres dañando los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN.<sup>47</sup>

El estrés oxidativo puede generarse por 2 motivos:<sup>35</sup>

- a. La disminución de antioxidantes que puede ser ocasionada por la malnutrición (ingesta dietética insuficiente de alfa-tocoferol, ácido ascórbico o aminoácidos azufrados necesarios para la generación de glutatión.)
- b. La producción excesiva de especies reactivas de oxígeno causadas por: radiación, exposición a altas concentraciones de oxígeno, elevada concentración de contaminantes o una excesiva activación de los sistemas naturales productores de radicales (enfermedades crónicas inflamatorias como artritis reumatoide o situaciones agudas en las que se desencadena una respuesta inflamatoria sistémica como es la enfermedad grave).

El daño que produce el estrés oxidativo habitualmente se relaciona con el proceso de envejecimiento (asociado a la acumulación de componentes celulares

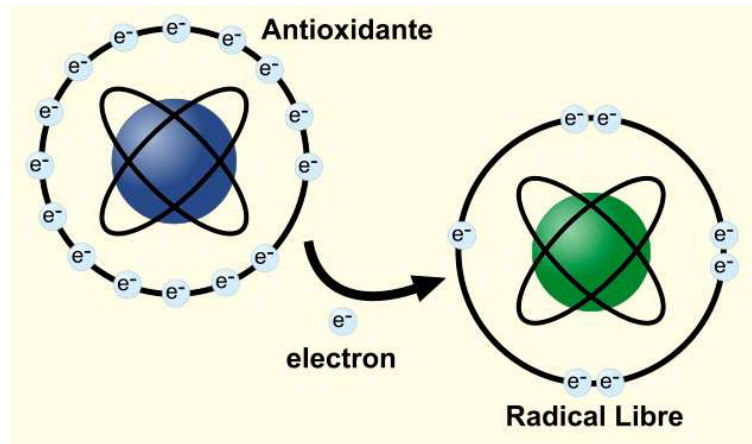
oxidados como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos). Son numerosas las patologías que han sido asociadas con este desbalance entre oxidantes y antioxidantes; la aterosclerosis, el cáncer, la enfermedad de Alzheimer, la diabetes mellitas, enfermedades autoinmunes, inflamatorias crónicas, situaciones de injuria por isquemia y repercusión en los tejidos, el síndrome de distrés respiratorio, etc. La cuantificación o valoración del estrés oxidativo al que está sometida la población parece ser un posible indicador del peligro que suponen ciertos factores de riesgo del ambiente.<sup>57</sup>

Existen otros factores que desencadenan el estrés oxidativo los cuales se debe tener en cuenta, como el tipo de vida y la dieta los cuales pueden llegar a actuar como prooxidantes. Como ejemplo tenemos el tabaco inhalado, cuyo exceso puede incrementar un estrés oxidativo debido a la inflamación pulmonar causada por el mismo. En cuanto a los factores alimenticios se conoce que las dietas ricas en grasas pueden contribuir a un estrés oxidativo debido al incremento de peroxidación lipídica. Las carnes rojas ricas en grasas se cree que intensifican el estrés oxidativo a través de la ingesta del hierro heme, molécula que contiene hierro y que es capaz de hacer ciclos redox en los que un solo electrón puede ser aceptado o donado por el metal, esta acción cataliza reacciones que producen radicales hidroxilo y especies reactivas del oxígeno.<sup>59</sup>

### 1.3. ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son un conjunto de compuestos químicos o productos biológicos que contrarrestan de una manera directa o indirecta los efectos nocivos de los radicales libres u oxidantes, tales como oxidación a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.<sup>100</sup> Son cualquier sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de este último.<sup>37</sup>

El antioxidante al reaccionar con el radical libre le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil con escasos o nulos efectos tóxicos y que en algunos casos, como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes (Ver Figura N° 3). Los antioxidantes pueden producirse en las células (antioxidante endógeno) y también pueden ser suministrados externamente a través de los alimentos o suplementos, (antioxidantes exógenos).<sup>24</sup>



**FIGURA N° 3.: Neutralización del radical libre por un antioxidante.**

Extraído de: <http://blog.hsnstore.com/que-son-antioxidantes/>

### 1.3.1 CLASIFICACIÓN DE ANTIOXIDANTES:

Los antioxidantes pueden ser de dos tipos:

- a. Los **Antioxidantes endógenos** son las enzimas (proteínas) con capacidad antioxidante que no se consumen al reaccionar con los radicales libres y son dependientes de sus cofactores tales como el cobre, el hierro, el zinc, el magnesio y selenio.
- b. Los **Antioxidantes exógenos** son las moléculas que provienen de la dieta, y se consumen al reaccionar con los radicales libres, por lo que deben ser reemplazados regularmente.

Estos se clasifican, según su naturaleza, en dos grupos: **antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos** (Ver Tabla N° 4).

- a. **Antioxidantes Enzimáticos:** Los antioxidantes enzimáticos incluyen enzimas capaces de eliminar o neutralizar especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno o sus intermediarios. En esta categoría se encuentran: superóxido dismutasas, glutatión peroxidasa, catalasa, tioredoxinareductasa y glutatión reductasa.<sup>58</sup>
- b. **Antioxidantes no Enzimáticos:** Permiten la inhibición de la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), la inhibición de la unión de iones metálicos necesarios para la formación de ERO y la regulación de la actividad antioxidante llevándose a cabo a través de múltiples cascadas.<sup>58</sup> Algunos ejemplos de estos

antioxidantes, son: las vitaminas E y C, los betacarotenos, los flavonoides y los licopenos, fitoestrógenos polifenoles, ácido úrico, ubiquinol (Co-enzima Q) y la melatonina. También tenemos como antioxidantes no enzimáticos endógenos a: proteínas intraplasmáticas (lactoferrina, ferritina), proteínas plasmáticas (transferrina, ceruloplasmina, albumina), complejos organometálicos (quelantes de hierro y cobre) y péptidos de bajo peso molecular (glutation).

**TABLA N° 4.: Antioxidantes Enzimáticos y no Enzimáticos.** Extraído de Powers S., et all, 1999.

	<b>Antioxidantes Enzimáticos</b>	<b>Ubicación Celular</b>	<b>Propiedades</b>
<b>ENDÓGENOS</b>	Mn Superóxido dismutasa	Mitocondria	Dismuta radicales peróxido
	Cu-Zn Superóxido dismutasa	Citosol	Dismuta radicales Superóxido
	Glutation (GHS) peroxidasa	Citosol y Mitocondria	Remueve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y hidroperóxidos orgánicos.
	Catalasa	Citosol y Mitocondria	Remueve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>EXÓGENOS</b>	<b>Antioxidantes no Enzimáticos</b>		
	Vitamina E	Compuesto fenólicos solubles en lípidos; localizada en membranas.	Principal antioxidante que disrumpe la cadena de peroxidación lipídica.
	Vitamina C (ácido ascórbico)	Soluble en agua; localizada en Citosol.	Neutraliza una amplia variedad de ROS en fase acuosa; regenera la vitamina E.
	Ácido lipoico	Tiol endógeno; localizado tanto en la fase acuosa como en la lipídica	Interviene en el reciclado de vitamina C; puede ser buen sustituto de GSH
	Ubiquinonas	Derivados de quinona soluble en lípidos; localizadas en membrana.	Las formas reducidas son antioxidantes eficientes
	Carotenoides	Soluble en lípidos; localizados principalmente en membranas	Antioxidantes; reducen la peroxidación lipídica.

Además de las vitaminas, los oligoelementos como el cobre, el zinc, el manganeso, el selenio y el hierro son necesarios incorporarlos al organismo a través de la dieta, porque conforman la parte activa del núcleo de las enzimas antioxidantes.<sup>11</sup>

### 1.3.2 ANTIOXIDANTES NATURALES – ALIMENTOS FUNCIONALES

Se considera que un alimento puede ser funcional si se ha demostrado de manera satisfactoria que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, siendo esto relevante para la mejoría de la salud y el bienestar y/o reducción del riesgo de adquirir enfermedades. De acuerdo con esto, se puede decir que los alimentos funcionales (*Functional food*) son aquellos que contienen componentes biológicamente activos que ejercen efectos beneficiosos en una o varias funciones del organismo y que se traducen en una mejoría de la salud o en una disminución del riesgo de sufrir enfermedades.<sup>94</sup>

Los principales aspectos de la definición operativa de los alimentos funcionales son:<sup>10</sup>

- La naturaleza alimentaria del alimento funcional se basa en que no es un comprimido, ni una cápsula, ni ninguna otra forma de suplemento alimenticio.
- La demostración de sus efectos debe satisfacer las exigencias de la comunidad científica.
- Debe producir efectos beneficiosos sobre las funciones orgánicas, apropiados para mejorar la salud y el bienestar reduciendo el riesgo de enfermedad.
- Deben consumirse como parte de un régimen normal.

La vitamina C y otros componentes que aporta el Sancayo, como el potasio, calcio, y demás minerales lo convierten en un alimento ideal para favorecer el metabolismo energético volviéndolo en un alimento funcional recomendable para el consumo humano.<sup>10</sup>

### 1.3.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los métodos para la determinación de la actividad antioxidante se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inducido o reducido en presencia de un antioxidante. La inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra, sin embargo hay otros ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo.<sup>6</sup> Además de los antioxidantes dietéticos comunes (vitaminas C y E), los compuestos fenólicos son considerados como potentes antioxidantes en los sistemas biológicos *in vitro*.<sup>32</sup>

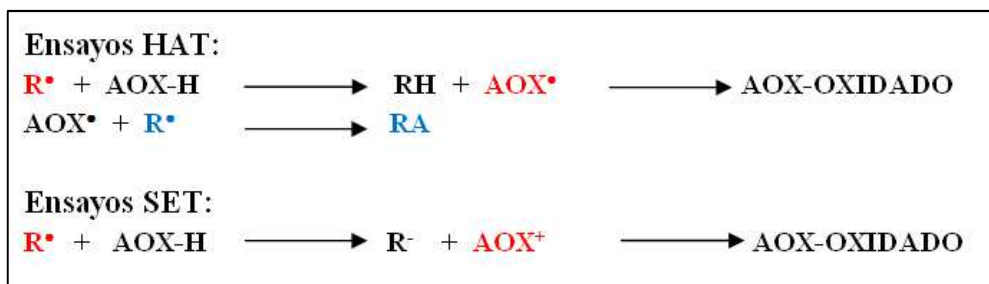
La actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado. En la medición de una muestra oxidante, pueden usarse intermediarios o productos finales para valorar al antioxidante. En la práctica se realizan muchos modelos de test in vitro (Ver Tabla N° 5) para evaluar la actividad antioxidante de la muestra de interés.

**TABLA N° 5.: Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción SET o HAT.** Extraído de *Huang D., et all, 2005.*

ENSAYO	CATEGORIA
Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS <sup>•+</sup> )	Ensayos basados en la transferencia de un solo electrón (SET)
2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH <sup>•</sup> )	
Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP)	
N,N- dimetil-p-fenilendiamina (DMPD)	
Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)
Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)	
Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP)	
Inhibición de la oxidación del ácido linoléico	
Inhibición de la oxidación de los lípido de baja densidad (LDL)	

Con base a las reacciones químicas, la gran mayoría de los ensayos para determinar de actividad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías:<sup>42</sup>

1. Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (**HAT**). Los HAT aplican un esquema de reacción competitiva en la cual el antioxidante y el sustrato compiten por un radical peroxilo. Como se muestra en la Figura N° 4, el antioxidante (**AOX-H**) reacciona con un radical libre (**R<sup>•</sup>**) generando una especie no radicalaria (**RH**), y un nuevo radical libre (**AOX<sup>•</sup>**). Por su parte en la segunda reacción, se muestra como el antioxidante (**AOX<sup>•</sup>**) neutraliza al radical libre (**R<sup>•</sup>**) uniéndose a él y formando un compuesto no reactivo (**RA**).<sup>29</sup>
2. Ensayos basados en la reacción por transferencia de un solo electrón (**SET**). Los SET se basan en la medida de la capacidad de un compuesto en reducir un oxidante, que cambia de color cuando se reduce. Como se aprecia en la Figura N° 4, el antioxidante (**AOX-H**) reduce a un radical libre (**R<sup>•</sup>**), y lo convierte en un oxidante reducido (**R<sup>-</sup>**) al donarle un electrón, dejando al antioxidante en estado oxidado (**AOX<sup>+</sup>**).<sup>29</sup>



**FIGURA N° 4.: Mecanismos de reacción por transferencia de un solo electrón y transferencia de átomos de hidrógeno.** Extraído de *Huang D., et all, 2005.*

Los ensayos basados en HAT y SET fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra. En la Figura N° 4 se muestran las reacciones específicas para los ensayos basados en la transferencia de electrones y en la transferencia de átomos de hidrógeno.

**a. Ensayos que utilizan el mecanismo SET:**

En general estos métodos utilizan radicales libre estables por lo que no es necesario generarlos en el medio:

- **Método ABTS** (azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico): mide la capacidad de un compuesto de reducir el radical catiónico  $ABTS^{\bullet+}$  evaluando la disminución en la absorbancia a 734 nm. El ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobulina), o también electroquímica. Es soluble tanto en medio acuoso como orgánico y permite la evaluación de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos.<sup>51</sup>
- **Método del radical DPPH** (2,2-difenil-1-picril-hidraziloi): se basa en la reacción del radical reducido ( $DPPH^\bullet$ ) con un donador de hidrógenos y la generación de su forma reducida (DPPH). Se cuantifica midiendo la disminución de absorbancia a 515 nm. Se emplea sobre todo para determinar la eficacia antiradicalaria de compuestos fenólicos. Es soluble solamente en medio orgánico.<sup>51</sup>
- **Ensayo CUPRAC** (*Cupric reducing antioxidant capacity*, Capacidad reductora antioxidante de cobre): se basa en la absorbancia medida del quelato  $Cu(I)$ -neocuproína (Nc)  $[Cu(Nc)_2^+]$  formado como resultado de la reacción redox de los antioxidantes rompe-cadenas con el

agente CUPRAC, Cu(II)-Nc, donde la absorbancia es medida a una longitud de onda de 450.<sup>7</sup>

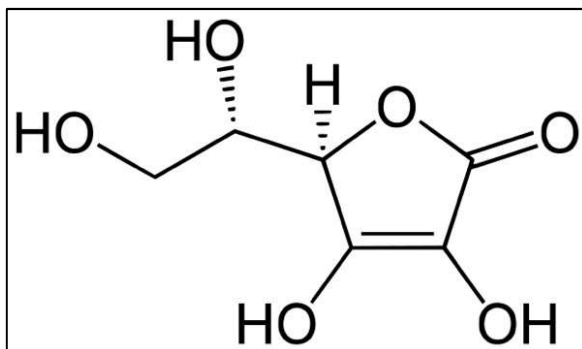
**b. Ensayos que utiliza el mecanismo HAT:**

- **Ensayo TRAP** (total radical-trapping parameter): se desarrolló para medir el estado antioxidante del plasma humano. Los radicales peroxilo oxidan antioxidantes del plasma y la oxidación y su inhibición se miden por absorción de oxígeno. Como antioxidante de referencia se usa el Trolox (derivado sintético de la Vitamina E).<sup>51</sup>
- **Ensayo ORAC** (oxygen radical absorbance capacity): mide la degradación oxidativa de una molécula fluorescente, como la fluoresceína, sometida a un flujo constante de radicales peroxilo generados por el AAPH (2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidrocloruro). La protección ejercida por los antioxidantes se cuantifica a través de la fluorescencia.<sup>51</sup>

#### 1.4. ÁCIDO ASCÓRBICO

El ácido ascórbico, o también conocida como vitamina C, es un antioxidante hidrosoluble sensible al calor que es un nutriente esencial requerido para un cierto número de reacciones metabólicas en todos los animales y plantas y que es sintetizada internamente por algunos organismos, a excepción de los humanos, primates, cobayos, peces aves e insectos. Algunos animales la sintetizan a partir de la glucosa mediante la vía del ácido glucurónico; los que no la pueden sintetizar es porque carecen de la enzima que cataliza la etapa final de oxidación, lo que estos deben ingerirla a través de la alimentación.<sup>73</sup>

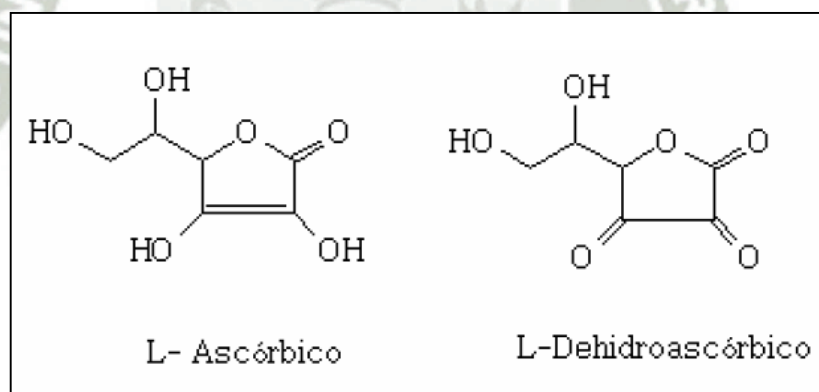
Contiene varios elementos estructurales que contribuyen a su comportamiento químico: la estructura de la lactona y dos grupos hidroxilos enólicos, así como un grupo alcohol primario y secundario (Ver Figura N° 5). Es termolábil y se oxida en el aire con facilidad, además que actúa como cofactor en numerosas enzimas implicadas en la biosíntesis de colágeno, carnitina y algunos neurotransmisores, atrapando una gran variedad de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en medios acuosos.<sup>73</sup>



**FIGURA N° 5.: Estructura química del ácido ascórbico.** Extraído de *Ramírez T., et all, 2005.*

#### 1.4.1 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ÁCIDO ASCÓRBICO

El ácido ascórbico es un donante de electrones, convirtiéndolo en un potente antioxidante soluble en agua. Su actividad antioxidante deriva del desplazamiento de ácido L-ascórbico a su forma oxidada L-dehidroascórbico (Ver Figura N° 6) esto también habilita a la molécula para combatir radicales oxidativos ( $\bullet\text{O}_2^-$  y  $\bullet\text{OH}$ ) y radicales acuosos como el oxígeno singlete.<sup>96</sup>



**FIGURA N° 6.: Formas moleculares en equilibrio de la vitamina C.** Extraído de *Fennema O., 1976.*

El ácido ascórbico es el antioxidante más eficaz para evitar la peroxidación lipídica en cualquier tipo de membrana celular, pero este es muy sensible a la presencia de hierro disuelto el cual puede degradarlo. El proceso de oxidación de ácido ascórbico depende de la presencia de metales como el cobre o el hierro que lo conducen a su degradación. Entre otros factores fisicoquímicos se incluye la temperatura, la concentración de sales y los azúcares. El pH es muy importante en este caso, además de la presencia de oxígeno, enzimas,

catalizadores metálicos, aminoácidos, oxidantes y reductores inorgánicos que influyen en su degradación.<sup>12</sup>

A pesar del importante poder antioxidante de la vitamina C, a determinadas dosis y en determinadas situaciones fisiológicas se ha encontrado un efecto prooxidante. Dicha capacidad prooxidante se debe a la potente acción reductora que presenta, capaz de reducir  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{+}$ , respectivamente. Estos metales reducidos pueden generar, en presencia de oxígeno, un gran estrés oxidativo. Es importante que se requiere de bajas concentraciones de ascorbato (ácido ascórbico sin un hidrogeno) para actuar como prooxidante si la concentración de metales en el medio es alta.<sup>73</sup>

#### 1.4.2 BENEFICIOS DEL ÁCIDO ASCÓRBICO

Es ácido ascórbico posee muchas propiedades benéficas tanto a celular, como a nivel industrial, entre ellas podemos mencionar:<sup>73</sup>

- Esencial para la formación de huesos, dientes y reforzamiento de paredes capilares.
- Útil para inhibir la inflamación de las encías, anemia, deficiencia en la cicatrización de heridas y susceptibilidad a las infecciones.
- Importante en el metabolismo de carbohidratos y en controlar procesos infecciosos.
- Aumenta la absorción de hierro, porque lo convierte a una forma absorbible para el cuerpo.
- Afecta al sistema inmune, haciendo los tejidos menos permeables a bacterias u otras sustancias tóxicas. Ayuda a los leucocitos en su funcionamiento.
- Regenerador de la vitamina E.
- Suele ser usado como aditivo antioxidante de los alimentos.
- Utilizado, junto con sus derivados, en productos cárnicos, conservas vegetales, bebidas refrescantes, productos de repostería y en la producción de cerveza. Este contribuye a evitar el oscurecimiento de la futa cortada en trozos y la corrosión de los envases metálicos.
- En la fabricación de plásticos, para ensamblar cadenas moleculares más rápidamente y con menos residuos que con los métodos de síntesis tradicionales.

## 1.5. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se sintetizan como metabolitos secundarios con funciones de defensa y son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia y el flavor (sabor y aroma) de los vegetales. Se encuentran en las verduras y frutas. Su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres.<sup>10</sup>

Los fenoles son un grupo de compuestos orgánicos que presentan en su estructura un grupo funcional hidroxilo unido a un radical arilo. Por lo tanto, la fórmula general para un fenol se escribe como Ar – OH. Los fenoles se nombran, generalmente, como derivados del miembro más sencillo de la familia que es el fenol o hidroxibenceno.<sup>10</sup>

Las características generales de los compuestos fenólicos son:<sup>10</sup>

- Contienen un anillo aromático con un grupo -OH (fenol).
- Suelen ser ácidos, solubles en agua, y pueden formar puentes de hidrogeno.
- Pueden establecer interacciones con un grupo peptídico (taninos).
- Los fenoles con grupo catecol pueden quelar metales.
- Son muy susceptibles a oxidación (antioxidantes).
- La mayoría son derivados fenilpropanoides.
- Un grupo numeroso e importante entre ellos son los flavonoides.
- Sus estructuras pueden ser monoméricas, diméricas (lignan) y poliméricas (lignina y taninos).

### 1.5.1 CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos comprenden una amplia variedad de moléculas que tienen una estructura polifenol (es decir, varios grupos hidroxilo en el anillo aromático), también moléculas con fenol en el anillo tales como ácidos fenólicos.<sup>77</sup>

Los polifenoles se dividen en varias clases de acuerdo a su diversidad estructural (Ver Figura N° 7). Según su estructura química tenemos 2 grandes grupos:<sup>77</sup>

#### a. No Flavonoides

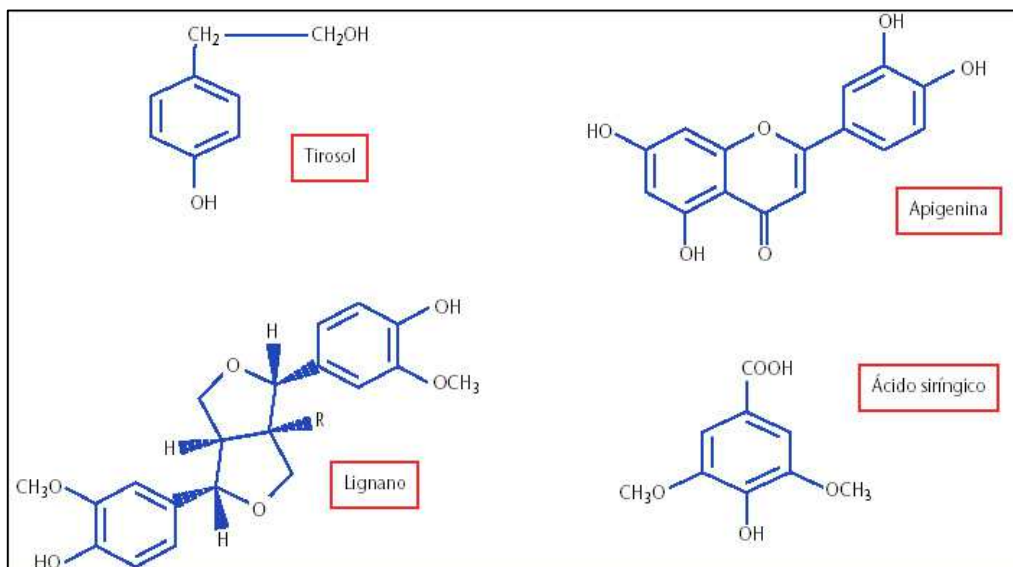
Entre ellos hay dos subgrupos:<sup>77</sup>

- Fenoles no carboxílicos: C6, C6-C1, C6-C3.
- Ácidos fenoles: derivados del ácido benzoico C6-C1 y derivados del ácido cinámico C6-C3.

**b. Flavonoides**

Formados por 2 grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado.  
Subgrupos:<sup>77</sup>

- Antocianos.
- Flaconas, flavononas, flavanoles y flavanonoles.
- Taninos condensados y lignanos.



**FIGURA N° 7.: Estructura de algunos compuestos fenólicos.** Extraído de [http://www.jano.es/farma/ctl\\_servlet?\\_f=37&id=13063508](http://www.jano.es/farma/ctl_servlet?_f=37&id=13063508)

**1.5.2 FUNCIONES DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS**

Desde el punto de vista de su actividad biológica muchos polifenoles tienen propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere actividad antioxidante, que podría estar relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer.<sup>91</sup>

Los flavonoides, uno de los grupos pertenecientes a los compuestos fenólicos, además de poseer una gran actividad antioxidante, presentan otras propiedades a nivel celular que incluyen: la estimulación de la comunicación intercelular a través de las uniones en hendidura, el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación.<sup>53</sup>

Existen también sustancias con actividad estrogénica (fitoestrógenos), como las isoflavonas, los lignanos y el estilbeno resveratrol, mientras que otros, como los

taninos, son capaces de fijar metales y proteínas, lo que afecta a la biodisponibilidad de éstos y puede estar en el origen de algunos efectos inespecíficos (por ejemplo, antimicrobianos), o prevención de enfermedades neurodegenerativas.<sup>90</sup>

Muchos compuestos fenólicos son en parte responsables de las propiedades organolépticas de los alimentos de origen vegetal y por tanto tienen importancia en la calidad de los mismos. Así, entre éstos hay pigmentos como las antocianinas, responsables de los tonos rojos, azules y violáceos característicos de muchas frutas (fresas, ciruelas, uvas, etc.), hortalizas (berenjena, lombarda, rábano, etc.) y del vino tinto, o los flavonoles, de tonalidad crema-amarillenta, que están presentes principalmente en las partes externas de frutas y hortalizas (3). Hay polifenoles que tienen sabor amargo, como determinadas flavanonas de los cítricos (naringina de los pomelos, neohesperidina de las naranjas amargas) o la oleuropeína presente en aceitunas. Las proantocianidinas (taninos condensados) y los taninos hidrolizables confieren astringencia a los frutos y algunos fenoles sencillos tienen importancia en el aroma de determinadas frutas como el eugenol en los plátanos.<sup>91</sup>

Las principales funciones de los compuestos fenólicos se centra en los beneficios que posee a nivel del área de la salud, otorgándole así sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales, anticancerígenas y principalmente su función en el sistema nervioso, pues se ha visto una relación de protección en enfermedades neurodegenerativas.<sup>26</sup>

### **1.5.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS FENOLICOS**

Además de los antioxidantes dietéticos comunes (vitaminas C y E), los compuestos fenólicos son considerados como potentes antioxidantes en los sistemas biológicos *in vitro*. La actividad antioxidante de los flavonoides es mucho más fuerte que la de las vitaminas C y E. Los efectos protectores se han atribuido a su capacidad de transferir electrones a los radicales libres, la quelación de catalizadores metálicos, activar enzimas antioxidantes, inhibir oxidasas, reducir los radicales de la  $\alpha$ -tocoferol, mitigar el estrés oxidativo causado por el óxido nítrico y aumentar los niveles de ácido úrico.

#### **1.5.3.1 MECANISMO DE ACCION**

Los polifenoles tienen la característica de ser fuertes antioxidantes por mecanismo de captación de radicales libres, que puede neutralizar los radicales libres donando átomos de hidrógeno y formando productos más estables ó

también a través de la quelación de metales de transición, reduciendo o inhibiendo la formación de radicales libres.

**a. Como captadores de radicales libres:**

Cuando estos antioxidantes, por ejemplo flavonoides (FI-OH), están presentes en cantidades traza, pueden retardar o inhibir el paso de iniciación al reaccionar con un radical y como consecuencia reducir los radicales ( $R\bullet$ ) a un no-producto radical (RH), convirtiéndose ellos mismo en un radical oxidado (FI-O $\bullet$ ).<sup>32</sup>

El radical formado debe tener baja reactividad y, por tanto, ser incapaz de reaccionar con los componentes biológicos. De esta manera, los radicales libres formados a partir del antioxidante (FI-O $\bullet$ ) se puede conectar a otros radicales más reactivos ( $R\bullet$ ), adquiriendo una estructura quinona estable, es decir, un complejo estable no radical, FI-quinona, deteniendo así las reacciones en cadena. Con más frecuencia actúan como atrapadores de radicales directos de las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica.<sup>32</sup>

**b. Como quelantes de metales:**

Los polifenoles son conocidos como quelantes de metales. Los polifenoles pueden actuar por un mecanismo secundario (prevención), al disminuir la velocidad de oxidación de la etapa de iniciación. La quelación de metales de transición tales como  $Fe^{2+}$  directamente puede reducir o inhibir las formaciones de radicales libres a través de la reacción de Fenton, evitando su efecto catalizador en la formación de EROs, así como la oxidación causada por radicales hidroxilo altamente reactivos.<sup>32</sup>

Se ha encontrado que los polifenoles en realidad pueden funcionar como un co-antioxidante (sinergista), y estar implicados en la regeneración de las vitaminas esenciales. Como un ejemplo, ácido cafeico y p-cumárico puede regenerar la vitamina E mediante la reducción de los radicales  $\alpha$  – tocoferilo.<sup>32</sup>

La actividad antioxidante de los polifenoles está relacionada con su estructura y una serie de importantes factores determinantes. En el caso de los ácidos fenólicos la actividad antioxidante depende de los números y las posiciones de los grupos hidroxilo en relación con el grupo carboxilo funcional.<sup>32</sup>

## 1.6. GENOTOXICIDAD

La genotoxicidad es descrita como la capacidad que tienen los agentes físicos o químicos para dañar la información genética dentro de una célula, causando mutaciones que pueden conducir al cáncer. La alteración puede tener efectos

directos, como al ADN provocando mutaciones, o indirectos, como la inducción de mutaciones por activación de eventos a destiempo sobre el ADN. Los cambios permanentes y hereditarios pueden afectar tanto a las células somáticas de las células del organismo o germen, que se pasarán a las generaciones futuras.<sup>34</sup>

La genotoxicidad es el resultado nocivo de la interacción de agentes químicos o físicos con el aparato hereditario de la célula, y se manifiesta como alteraciones genéticas y/o cambios en el número o estructura de los cromosomas causando mutaciones.<sup>17</sup> La determinación genotóxica ya sea en agua, aire, alimentos, contaminantes y compuestos naturales con fines terapéuticos, resultan una herramienta útil para la identificación de riesgos a la salud humana y poder desarrollar medidas de prevención y control. Las mutaciones que alteran la expresión génica se consideran como un rasgo común de todos los cánceres por lo que los estudios de genotoxicidad son de importancia.<sup>22</sup>

Existen una gran variedad de bioensayos útiles para evaluar la genotoxicidad, entre ellos se encuentra la electroforesis unicelular en gel, llamado comúnmente ensayo cometa, el cual es un método microscópico rápido y sensible que permite examinar el daño al ADN en células de forma individual.<sup>39</sup>

## 1.7. LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

La utilización de muestras de sangre ha sido una herramienta muy eficaz en la evaluación de la genotoxicidad de un sin número de agentes, empleando principalmente linfocitos aislados, tanto frescos como congelados. Al estar estos en circulación, se puede considerar que su estado celular, nuclear y metabólico (incluyendo su DNA) refleja la exposición global del organismo. Los linfocitos aislados, son considerados muy sensibles para el análisis del potencial genotóxico de un agente y son por ello, utilizados en sistemas *in vitro*.<sup>25</sup>

Los linfocitos son parte de la línea linfóide del sistema inmune y se encuentran principalmente en los órganos linfoides y, en menor cantidad (aproximadamente el 3%) se encuentra circulando por el torrente sanguíneo a través del cual llegan a todos los órganos y tejidos del organismo.<sup>103</sup>

Los linfocitos son células mononucleares las cuales se originan en la médula ósea o el timo, los ganglios linfáticos, o el bazo. En todo momento alrededor del 70% de los linfocitos transportados por la sangre son recirculantes, es decir, viajan hacia los órganos linfoides o desde ellos; mientras que, el 30% restante está constituido por linfocitos T inmaduros de vida corta que permanecen en el espacio intravascular o se

eliminan. La dotación de linfocitos circulantes está conformada por linfocitos T (60 al 70 %), linfocitos B (10 al 20 %) y el resto de linfocitos NK y nulos (null).<sup>97</sup>

En particular, los linfocitos de sangre periférica representan un sistema muy favorable para realizar estudios de genotoxicidad, siendo sus principales ventajas las siguientes:<sup>103</sup>

- Son fáciles de obtener
- Son circulantes y están en contacto con las genotoxinas
- Constituyen una población celular sincrónica.
- Se encuentran en fase G<sub>0</sub> por lo que no se dividen y la tasa de reparación es baja.
- Presentan un ciclo celular corto y bien establecido.
- Poseen un cariotipo estable y bien caracterizado.
- Se dispone de mucha información sobre los mismos, ya que son biomarcadores muy utilizados desde hace varias décadas.
- Se dispone de técnicas estandarizadas y económicas para su manejo.
- Son un sistema sensible para la evaluación de una gran variedad de daño genético a través de numerosas técnicas.

Sin embargo, también existen algunas desventajas, tales como:<sup>103</sup>

- Presenta una capacidad metabólica limitada.
- Al no ser una población homogénea, las subpoblaciones de linfocitos no solo difieren en sus funciones, sus características físicas, tamaño y permeabilidad de membrana; sino también, en la sensibilidad frente a los determinados agentes, tanto físicos como químicos.
- El establecimiento de cultivos supone la necesidad de ir obteniendo nuevas muestras de sangre.

## 1.8. ENSAYO COMETA

El fundamento del ensayo cometa se basa en la detección de daños al ADN producidos por un rompimiento simple o doble en la cadena, daño oxidativo inducido y entrecruzamiento de ADN-ADN/ADN-proteína, por la fragilidad que poseen los sitios dañados al ser sometidos a un pH superior a trece y su comportamiento en una electroforesis.<sup>39</sup>

Los fragmentos de ADN, producto de la acción de la sustancia a probar y afectados por el pH alcalino, durante la electroforesis migran fuera del núcleo celular hacia el

ánodo y forman una cauda o cola que al ser observada con el microscopio de Fluorescencia o con un microscopio de campo claro, tiene la apariencia de un cometa.<sup>39</sup>

Entre más larga sea esta porción de la cola, mayor será el daño ocasionado al ADN. La magnitud del daño es evaluada de acuerdo al número de células afectadas y a la longitud de la cola.<sup>39</sup>

### 1.8.1 METODOLOGÍA Y CONSIDERACIONES TECNICAS

En la actualidad se están realizando numerosas versiones del ensayo cometa, tomando mayormente en cuenta la versión alcalina ( $\text{pH} \geq 13$ ) debido a que es superior en cuanto al espectro de lesiones que reconoce del ADN y en su mayor sensibilidad para la detección de bajos niveles de daño, en comparación a la neutra ( $\text{pH} = 9,5$ ) o la medianamente alcalina ( $\text{pH} = 12,3$ ).<sup>103</sup>

Después de la obtención de las células de interés, los pasos básicos en el ensayo cometa incluyen la preparación de los portaobjetos pre cubiertos con las células a evaluar embebidas en agarosa, la lisis de las membranas para liberar el DNA, la electroforesis, la neutralización de la alcalinidad, la tinción y la visualización.

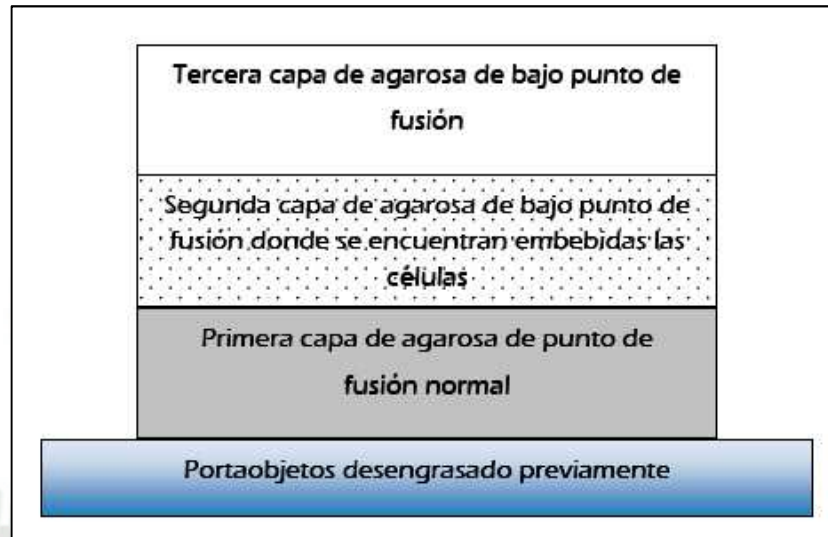
#### a. Preparación de los portaobjetos

Para la preparación de las capas de agarosa, se debe asegurar un soporte estable para la manipulación de las células a evaluar durante todo el proceso. Generalmente se preparan las capas de agarosa en forma de sándwich, en cuya capa central se encuentra las células. (Ver Figura N° 8). Las células suspendidas en agarosa de bajo punto de fusión. (LMP), generalmente se preparan a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se depositan sobre un primera capa de agarosa de punto de fusión normal (NMP) que cubre el portaobjeto.<sup>103</sup>

La primera capa es para asegurar una buena adherencia de la capa celular al portaobjeto. Se observó además una notable mejoría en la preparación de los portaobjetos al deshidratar la primera capa de agarosa y ser incubada entre  $40$  y  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ .<sup>82</sup> La concentración de esta varía desde  $0,75$  y  $1\%$  hasta el  $1,5\%$ .<sup>60,1,76</sup>

La segunda capa contiene a las células que serán analizadas, para ello se necesitan cerca de  $10'000$  y  $50'000$  células suspendidas en medio PBS o medio de cultivo, las cuales son mezcladas con agarosa LMP, preparada previamente a una concentración entre  $0,5$  y  $1\%$  en una proporción de  $1:10$  aproximadamente.<sup>103</sup>

La tercera capa cumple solo un papel protector, por lo cual muchos laboratorios deciden prescindir de ella, ya que además que los resultados no se ven afectados, la ausencia de la capa puede facilitar la neutralización del tratamiento alcalino.<sup>49</sup>



**FIGURA N° 8. Esquema típico de un portaobjetos con las capas de agarosa dispuestas tipo sándwich.** Extraído de Zúñiga V., 2009.

### b. Lisis Celular

Se utilizan soluciones de lisis neutra y alcalina para la detección de roturas de cadena doble (DSB) y roturas de cadena simple (SSB), respectivamente. La selección del pH de la solución dependerá de los objetivos de estudio. La lisis alcalina es mucho más utilizada en comparación de la lisis neutra, ya que la anterior detecta un amplia gama de daños que son más comúnmente producidos por los agentes genotóxicos; consiste en someter las células ya embebidas en una solución con una alta concentración de sales y detergentes a un pH entre 10 y >12 durante al menos 1 hora, como mínimo y no mayor a 24 horas. La solución de lisis debe estar refrigerada antes de su uso para lograr una máxima estabilidad de los geles de agarosa.<sup>39,60</sup>

### c. Desnaturalización y Electroforesis

Antes de la electroforesis, las preparaciones son incubadas durante un tiempo en la solución electroforesis alcalina (pH > 13, baja concentración de sales y sin detergentes), con lo que se consigue la separación de la doble cadena de DNA y con esto, la producción de SSB y la expresión de sitios álcali-lábiles (ALS) como SSB y SSB transitorias relativas al proceso de reparación. La solución de

electroforesis de acuerdo con *Singh et al (1988)* consiste en 1 mM de EDTA y 300 mM de hidróxido de sodio a un pH = 13,0. <sup>84</sup>

La electroforesis en el ensayo cometa es diferente de una electroforesis convencional, ya que el DNA necesita migrar solo una fracción de milímetros para obtener una significativa movilización del DNA, y con ello la formación de cometas. Esto se consigue con un tiempo de electroforesis de 30 min aprox. y unas condiciones, según *Singh*, de 25 V y 300 mA. <sup>84</sup>

#### **d. Neutralización**

Después de la electroforesis se neutraliza la alcalinidad de las preparaciones mediante lavados con un tampón a pH de 7,5. Comúnmente esta solución está compuesta de Tris, pero además puede usarse en su lugar PBS 1X disuelto en agua bidestilada, conservando el mismo pH neutro. <sup>103</sup>

Luego de la neutralización, las preparaciones pueden ser teñidas para poder visualizar los cometas. Alternativamente los geles pueden ser deshidratados al ser sumergidos dos veces en etanol absoluto por 5 minutos cada vez y así las preparaciones pueden ser almacenadas y evaluadas cuando se estime conveniente. <sup>84</sup>

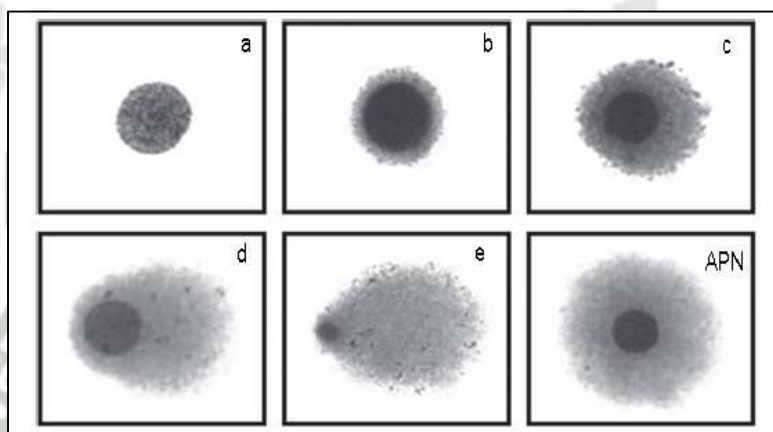
#### **e. Tinción**

Las tinciones utilizadas para ensayo cometa son muchas, entre ellas podemos mencionar al bromuro de etidio (EB), 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y yoduro de propidio (PI), las cuales son probablemente las más utilizadas, Otros autores han presentado alternativas de tinción tales como YOYO-1, SybrGold, y SybrGreen, así como de técnicas no fluorescentes para la visualización de los cometas, basados en Nitrato de Plata. <sup>103</sup>

### **1.8.2 EVALUACION**

La evaluación del ensayo cometa, cuenta con una gran variedad de métodos para la evaluación y cuantificación de los patrones de formación de los cometas. Una aproximación de la evaluación de daño que ha marcado el desarrollo de los parámetros en el ensayo cometa, fue descrita por *Olive et al. (1999)*, quienes utilizaron el concepto de momento de cola para describir la migración del DNA, conocida hoy como momento de cola Olive. (OTM). Este parámetro se considera útil para describir la heterogeneidad de la respuesta dentro de una población celular, ya que su cálculo considera las variaciones de la distribución del DNA dentro de la cola. <sup>63</sup>

Otro sistema de evaluación más simple, fue el desarrollado por *Collins et al.* (1995), los cual se basan en la clasificación visual de los cometas. Este método resulta útil, en los laboratorios que no cuentan con experiencia previa en el ensayo del cometa ya que no requiere, necesariamente, de sistemas o programas sofisticados. El método consiste en clasificar el nivel de daño en 5 categorías que van de 0 (DNA sin migración) a 4 (casi todo el DNA en la cola), mostrando una muy buena resolución. (Ver Figura N° 9). Una vez realizado el conteo, y su posterior clasificación entre un rango entre 0 y 4, se hallará el conteo total de la muestra (TCS) el cual estará expresado en unidades arbitrarias (UA) entre un valor de 0 y 400.<sup>21</sup>



**FIGURA N° 9.: Clasificación visual por análisis visual, observadas en el microscopio luego de una tinción con nitrato de plata. (a) Grado cero o sin daño, (b) Grado 1, (c) Grado 2, (d) Grado 3, (e) Grado 4, (APN) células apoptóticas. Extraído de *Collins A., et all, 1997.***

Este método, denominado conteo visual, se ha descrito como una aproximación rápida, simple y no requiere de costosos sistemas de análisis, por lo que su uso ha sido ampliamente recomendado y utilizado.

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### 2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Investigación del Proyecto Mercurio Pabellón H-202, de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

#### 2.2. MATERIALES

##### 2.2.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado fue adquirido en el Mercado “Andrés Avelino Cáceres” ubicado en el departamento de Arequipa, distrito Arequipa. Dichas muestras provinieron de la provincia de Caylloma, departamento de Arequipa. Se adquirió 1,5 kg de *Corryocactus brevistylus* (sancayo), los cuales fueron almacenados a 17 °C hasta antes de su liofilización

##### 2.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO

##### A. REACTIVOS QUÍMICOS

- Reactivo Trolox P.A. (CALBIOCHEM)
- Reactivo DPPH P.A. (CALBIOCHEM)
- Alcohol metílico calidad P.A. (CH<sub>4</sub>O)(Merck)
- Reactivo de Follin –Ciocateau P.A. (Merck)
- Ácido gálico P.A. (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>) (Sigma)
- Carbonato de sodio P.A. (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Merck)
- Reactivo ABTS P.A (Sigma)
- Persulfato de potasio P.A. (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)(Merck)
- Neocuproína P.A. (Merck)
- Cloruro de cobre II P.A. (CuCl<sub>2</sub>) (Merck)
- Acetato de Amonio P.A. (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>) (Merck)
- Agua Ultrapura (18.2 mΩ) / destilada
- Alcohol etílico 96°
- Agarosa de Bajo Punto de Fusión (Merck)
- Agarosa de Punto de Fusión Normal (Merck)
- Ficoll-Paque PREMIUM (GE Healthcare)
- Azul de Tripan (Sigma)

- Buffer Fosfato Salino (PBS libre de  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{Mg}^+$ ) (Merck)
- Cloruro de sodio (NaCl) P.A. (Merck)
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) P.A. (Merck)
- Tris base P.A. ( $(\text{CH}_2\text{OH})_3 \text{CNH}_2$ ) (Merck)
- Hidróxido de Sodio (NaOH) (Merck)
- Tritón X-100 (Sigma)
- Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma)
- Ácido tricloroacético ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) (J.T. Baker)
- Sulfato de zinc P.A. ( $\text{ZnSO}_4$ ) (Fisher)
- Glicerol 98% P.A. (Merck)
- Nitrato de Amonio P.A. ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) (Fisher)
- Nitrato de Plata P.A. ( $\text{AgNO}_3$ ) (Fisher)
- Ácido Silícico Tungstico P.A. (Sigma)
- Formaldehido 40% (Fisher)
- Acetato de sodio ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ ) (Merck)
- Ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ) (Merck)

## B. MATERIAL DE LABORATORIO

- Fiolas (5,10, 25, 100, 250 ml)
- Beakers (50, 100, 250, 1000 ml)
- Matraz (25 ml)
- Tubos de ensayo
- Pipeta Pasteur
- Micropipetas de 10 – 20, 40 – 200 ul, 100 – 1000 ul, 1 – 10 ml
- Tubos Eppendorf (1.5 ml)
- Tubos Falcon (15 ml)
- Probeta (50 ml)
- Celdas espectrofotométricas
- Placas Petri
- Laminas Portaobjetos
- Vasos de precipitado
- Pipetas graduadas (2, 5, 10 ml)
- Cubreobjetos
- Frascos Ámbar de 100, 250, 1000 ml
- Viales de vidrio
- Cámara de Neubauer
- Mortero

### C. EQUIPOS:

- Balanza Analítica (Ohaus Pioneer PA 214)
- Sonicador (Branson 2510 – E)
- Centrifuga (Hettich zentrifugen EBA20)
- Microcentrifugadora (Thermo IEC – Centra CL2)
- Agitador Vortex (Analog mixer)
- Refrigerador
- pH metro (Metrohn 825pHlab)
- Agitador Magnético
- Espectrofotómetro (CARY60 UV – VIS, Agilent Technologies)
- Microscopio binocular (PrimoStar Zeiss)
- Cámara Digital Panasonic DMC – FS3
- Cámara de electroforesis
- Fuente de Poder
- Liofilizador (LABCONCO)
- Shaker (P Selecta® Rotaterm)
- Vortex (VWR Analog Vortex Mixer)
- Estufa (Mettler)
- Voltámetro (Metrohn, 757 VA Computrace)

### D. OTROS:

- Algodón
- Porta láminas
- Gradilla para tubos de ensayo
- Jeringas
- Filtros anotop
- Tips para micropipetas
- Guates descartables
- Mascarilla
- Plumón marcador
- Papel de Filtro
- Cámara de Newbauer
- Hielo
- Papel Aluminio

## 2.3. MÉTODOS

### 2.3.1 OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

Se obtuvo aproximadamente 1,5 kg de *Corryocactus brevistylus* del mercado “Andrés Avelino Cáceres” los cuales provinieron de la provincia de Caylloma, departamento de Arequipa. Los frutos fueron lavados cuidadosamente y conservados en el congelador. Posteriormente se procedió a pelar y picar los frutos en trozos medianos para guardarlos en el congelador y luego realizar el proceso de liofilización de la muestra en el liofilizador LABCONCO (de 2,5 L) en el laboratorio de la Facultad de Ing. Alimentarias de la Universidad Nacional San Agustín. Las muestras fueron liofilizadas a una temperatura de  $-42\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una presión de 0,250 mbar, para luego ser colocadas en bolsas herméticas y almacenadas en un refrigerador a una temperatura de  $17\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La muestra fue conservada en una bolsa de polipropileno debidamente sellada y almacenada en un ambiente libre de humedad y protegido de la luz como se muestra en la Figura N° 10.



**FIGURA N° 10.: Liofilizado de la muestra y su almacenamiento.**

Debido a que la especie *Corryocactus brevistylus* no es muy comercial, por su producción limitada a ciertas temporadas del año, ni fácil de obtener, por el hábitat pedregoso en el que se suele encontrar, es que se consideró pertinente almacenar la muestra en estado liofilizado, manteniendo así todas sus propiedades activas y poder prescindir de una misma muestra para la realización de todos los análisis establecidos.

La liofilización es un sistema de secado por vacío el cual ha resultado ser muy eficiente a la hora de preservar las características de un fruto inicial, y en el que el secado se produce por el cambio de estado de líquido - sólido - gas (sublimación). Es una forma de secar un producto químico a temperaturas bajísimas sin el deterioro que produciría el recalentamiento.<sup>126, 127</sup>

### 2.3.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se trituró la muestra liofilizada previamente antes de realizar el análisis, posteriormente se homogenizó 100 mg de muestra liofilizada con 1 ml de metanol calidad P.A. en un tubo eppendorf. Se procedió a su sonicación por 2 min y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min, se separó el sobrenadante en otro tubo de plástico y se repitió este proceso por 3 veces para juntar después los 3 sobrenadantes y enrasarlos finalmente en una fiola de 5 ml con metanol. Se guardó la fiola a -4 °C hasta el momento de su análisis.

## 2.4. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Para la determinación de ácido ascórbico se utilizó el método voltamétrico por polarografía.

### 2.4.1 MÉTODO VOLTAMÉTRICO

La voltimetría es una técnica electroquímica en la cual la corriente es medida con un electrodo como una función del potencial aplicado a través de la celda electrolítica. Mediante el control del voltaje aplicado a una celda electroquímica, que contiene las trazas a analizar, se puede hacer que ocurran de manera consecutiva varias oxidaciones y reducciones. La corriente que surge de estas oxidaciones o reducciones es una medida de la concentración de la traza de material presente.<sup>104, 105</sup>

Utilizando un electrodo de gota de mercurio, como electrodo de trabajo, se puede trazar la curva intensidad-potencial cuya altura, después de ser medida y comparada con una recta de calibrado por ser proporcional a la concentración de la sustancia que la produce, es empleada para conocer su concentración en solución. Esta técnica es conocida como voltimetría de barrido lineal o también denominada polarografía.<sup>104</sup>

El voltámetro tiene 3 electrodos. El electrodo de trabajo de gota de mercurio, el electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl) y el electrodo auxiliar de platino.

La polarografía se emplea en medios reductores, ya que la oxidabilidad del mercurio impide la aplicación en medios oxidantes. El empleo de la polarografía es posible gracias a un hecho fundamental: la sobretensión de reducción de los iones  $H^+$  sobre el cátodo de mercurio, así es posible aplicarla sobre numerosos oxidantes inorgánicos como cetonas, quinonas, aldehídos, etc.<sup>104</sup>

Como el oxígeno se puede reducir en el electrodo de mercurio, enmascarando la señal de interés, es de vital importancia burbujear la solución con un gas inerte, antes de realizar cada corrida para remover el oxígeno presente.

#### 2.4.2 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO POR VOLTAMETRÍA

Se preparó un buffer acetato de sodio 0.1 N de pH 4,7. Así mismo se hizo una solución estándar de ácido ascórbico pesando 0,01 g y diluyéndolo con agua ultrapura y enrasándola en una fiola de 10 ml.

La muestra a medir se preparó de acuerdo al ítem 2.3.2 solo en que en lugar de utilizar metanol se utilizó agua destilada y se midió en el voltámetro Metrohn (Ver Figura N° 11)



**FIGURA N° 11.: Voltámetro Metrohn, 757 VA Computrace**

Se colocó en la celda polarográfica 10 ml de la solución blanco (Buffer acetato de sodio pH 4,7) y 0,5 ml de la muestra previamente preparada, para luego registrarla en el voltámetro usando la ventana de trabajo del software para el voltámetro Metrohn 757 VA Computrace. Luego de darse la fase de purga, en la cual se burbujea gas inerte para la eliminación de oxígeno existente en la celda, y la medición de la muestra, se coloca 0,2 ml de la solución estándar de ácido

ascórbico en la celda y se registra en el voltámetro para volver a agregar nuevamente el estándar.

Se realizó un polarograma de la muestra de ácido ascórbico y de los estándares de ácido ascórbico con el fin de localizar el potencial de pico de oxidación. Se hizo el análisis por triplicado siguiendo el mismo procedimiento.

### 2.4.3 CÁLCULOS

El contenido del ácido ascórbico obtenido por el software fue expresado como mg A. A./L de muestra y se cambio a mg A. A./g de liofilizado de sancayo.

## 2.5. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Para la determinación de polifenoles totales, se utilizó el ensayo Follin-Ciocalteu.

### 2.5.1 MÉTODO DE FOLLIN-CIOCALTEU

El método que se utiliza actualmente es una modificación realizada por *Singleton y Rossi* (1965). Se basa en que los compuestos polifenólicos de la muestra tienden a oxidarse por el reactivo Folin-Ciocalteu (unión de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico) y que posteriormente se reducen por acción de los polifenoles. Posteriormente se llega a formar un cromóforo azul constituido por un complejo fosfotúngstico-fosfomolibdico, donde la máxima absorción del cromóforo depende de la solución alcalina la cual presenta una máxima absorción a 714 nm, y que se puede llegar a cuantificar por espectrofotometría utilizando como base una curva de calibración de ácido gálico o catequinas.<sup>75,12</sup>

### 2.5.2 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Se preparó una solución madre de ácido gálico de 1000 ppm. Para ello se pesó 0,005 g de ácido gálico y se transfirió a una fiola de 5 ml, se disolvió y diluyó con agua ultrapura hasta su disolución completa para su enrase posterior. A partir de la solución madre, se preparó 5 diluciones de diferentes concentraciones en un rango entre 4 - 8 ppm siguiendo la ecuación de dilución, como se observa a continuación:

$$Cx V = C`xV`$$

$$1000 \frac{mg}{L} \times V = 4 \frac{mg}{L} \times 0.01L$$

$$V = 0.00004 L = 0.04mL = 40 \mu L$$

**TABLA N° 6.: Preparación de la tabla de calibración.**

N° patrón	Concentración de Ac. Gálico (mg/L)	Sol. Patrón de Ácido Gálico 1000 ppm (uL)	Agua destilada	Reactivo Follin-Ciocalteu	Carbonato de Sodio (al 20%)
Blanco	0	0			
4	4	40			
5	5	50			
6	6	60	4 mL	0.25 mL	2 mL
7	7	70			
8	8	80			
Muestra	0.2 ml muestra				

En la Tabla N° 6 se muestran los volúmenes a utilizar para la preparación de la curva de calibración, todos fueron enrasados en una fiola de 10 ml con agua ultrapura. Esta mezcla se homogenizó y se dejó reaccionar por 2 horas en la oscuridad. Se preparó un blanco el cual sirvió para ajustar la absorbancia a cero.

**Carbonato de sodio al 20%:** Se pesó 5 g de carbonato de sodio anhidro, se disolvió en agua ultrapura y se enrasó en una fiola de 25 ml.



**FIGURA N° 12.: Espectrofotómetro CARY 60 UV – VIS, Agilent Technologies**

Las absorbancias se midieron a 714 nm en el espectrofotómetro de UV como se muestra en la Figura N° 12. Para la obtención de la curva estándar se trazó la absorbancia vs la concentración.

Para la determinación de la concentración de polifenoles en la muestra, se procedió de la misma manera que los estándares utilizando para ello 0,5 ml del extracto previamente preparado como se describe en el punto 2.3.2.

### 2.5.3 CÁLCULOS

El contenido de los polifenoles totales fueron expresados como mg GAE/g de liofilizado de sancayo, utilizando los datos de la curva estándar obtenida y la siguiente ecuación:

$$\frac{mgGAE}{g} = \frac{\left[ \left( \frac{Abs - b}{m} \right) / 1000 \right] \times V \times Fd}{Wma} = E$$

**Donde:**

b = intercepto

m = pendiente

Abs= Absorbancia de la muestra

Fd = Factor de dilución

V= volumen del extracto de la muestra (5 ml)

Wma= peso de muestra de sancayo (g)

GAE = Equivalente a ácido gálico

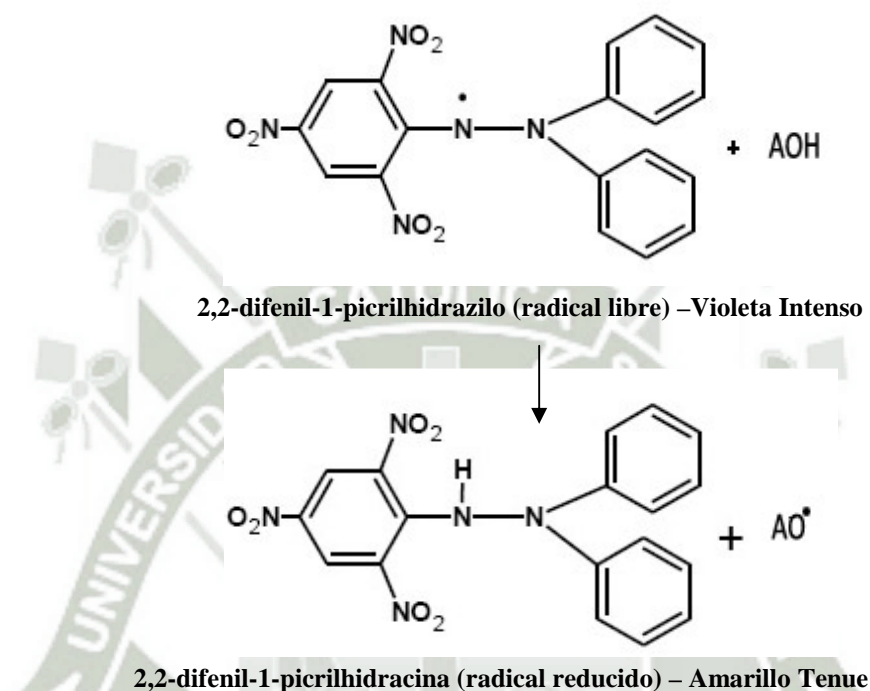
## 2.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL *Corryocactus brevistylus*

Para la determinación de la actividad antioxidante del *Corryocactus brevistylus*, se utilizaron 3 métodos colorimétricos: DPPH, ABTS y CUPRAC.

### 2.6.1 MÉTODO DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL). BRAND- WILLIAMS ET AL. 1995.

Este método, desarrollado por *Brand-Williams et al.* 1995, se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrylhidrazil), compuesto por moléculas de radicales libres estables, y los antioxidantes en un medio metanólico. En este método se utiliza el radical libre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) en cual se reduce en DPPH (2,2-difenil-1-

picrilhidracina) por la acción antioxidante de los compuestos que contienen grupos  $-OH$  que decoloran el reactivo DPPH de un color violeta intenso a un amarillo tenue. (Ver Figura N° 13) El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes.<sup>23</sup>



**FIGURA N° 13.: Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.** Extraído de Nur A., et al, 2012.

El radical A puede contribuir de este modo a la formación de moléculas estables a través de la interacción radical-radical (Figura N° 13). Entre las ventajas de usar este método es que es sensible, simple y rápido. Este método no es específico a un antioxidante en particular por lo tanto aplica para evaluar una actividad antioxidante total.<sup>56</sup>

La concentración de DPPH• en el medio de reacción se calcula a partir de una curva de calibrado obtenida por regresión lineal. Los resultados se suelen expresar mayormente en % de inhibición, pero también pueden expresarse en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox ( $\mu\text{mol TE/g}$  de muestra peso).

• **Determinación de actividad antioxidante por espectrofotometría**

**a. Preparación del radical DPPH•**

Se preparó una solución madre de DPPH• a una concentración 2,1 mmol en metanol p.a., para ello se necesitó 4,14 mg del reactivo y 5 ml de metanol. El reactivo preparado se conservó en refrigeración protegido de la luz, debido a que es altamente inestable, hasta su uso en el día.

**b. Preparación de la solución Stock de Trolox**

Se elaboró una curva de calibración, utilizando una solución madre de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) de concentración 1 mmol/L en 10 ml de metanol, a partir de la cual se preparó otra de 0,2 mmol/L.

**c. Preparación de la curva de calibración**

A partir de la solución de Trolox 0,2 mmol/L, se realizaron diferentes concentraciones entre un rango de 0,02 – 0,04 mmol/L. Se utilizaron fioles de 5 ml en las cuales se agregó 250 ul de DPPH 2,1 mmol/L y también distintos volúmenes de la solución de Trolox 0,2 mmol/L ajustando finalmente con metanol al 80% hasta la medida indicada dándonos distintas concentraciones finales de Trolox como se observa en la Tabla N° 7.

Las mezclas homogenizadas son dejadas reaccionando en oscuridad por espacio de 10 min, pasado dicho tiempo estas reaccionan y cambian de color como se muestra en la Figura N° 14. Se preparó un blanco el cual sirvió para ajustar la absorbancia a cero y también una solución sin el reactivo Trolox para posteriores cálculos.

**TABLA N° 7.: Preparación de la curva de calibración con DPPH**

N° Patrón	Blanco	Blanco 2	ST <sub>1</sub>	ST <sub>2</sub>	ST <sub>3</sub>	ST <sub>4</sub>	ST <sub>5</sub>
<b>DPPH 2.1</b>							
mmol/L (ul)	–	250	250	250	250	250	250
<b>MetOH 80%</b>							
(ul)	5000	4750	4250	4125	4000	3875	3750
<b>Trolox 0.2</b>							
mmol/L (ul)	–	–	500	625	750	875	1000
<b>Concentración</b>							
mmol/L	–	–	0,02	0,025	0,03	0,035	0,04

Las absorbancias se midieron a 515 nm en el espectrofotómetro de UV-VIS. Para la obtención de la curva estándar se graficó la concentración de Trolox en mmol/L vs el % de inhibición de cada patrón. Se determinó la actividad antioxidante de la muestra, utilizando 0,08 ml del extracto previamente preparado como se describe en el punto 2.3.2.



**FIGURA N° 14.: Estándares para la curva de calibración del reactivo DPPH de menor a mayor concentración de Trolox.**

### 2.6.2 CÁLCULOS

La actividad antioxidante se expresa como  $\mu\text{mol TE/g}$  de muestra seca, para lo cual se tuvo que determinar primero el porcentaje de inhibición, o porcentaje de captación de radical libre correspondiente a la cantidad de DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibicion} = \frac{(Abs_{Blanco} - Abs_{Muestra}) \times 100}{Abs_{Blanco}}$$

**Donde:**

$Abs_{Blanco}$  = Absorbancia del Blanco

$Abs_{Muestra}$  = Absorbancia de la Muestra

De acuerdo a la ecuación lineal obtenida en la curva de calibración, y los datos de la muestra, se obtuvo los  $\mu\text{mol TE/g}$  de muestra seca utilizando la siguiente ecuación:

$$\mu\text{mol TE/g} = \left[ \left( \frac{\% \text{inhibición} - b}{m} \right) \times V \times Fd \right] \div Wma$$

**Donde:**

b = intercepto

m = pendiente

V= volumen del extracto de la muestra (5 ml)

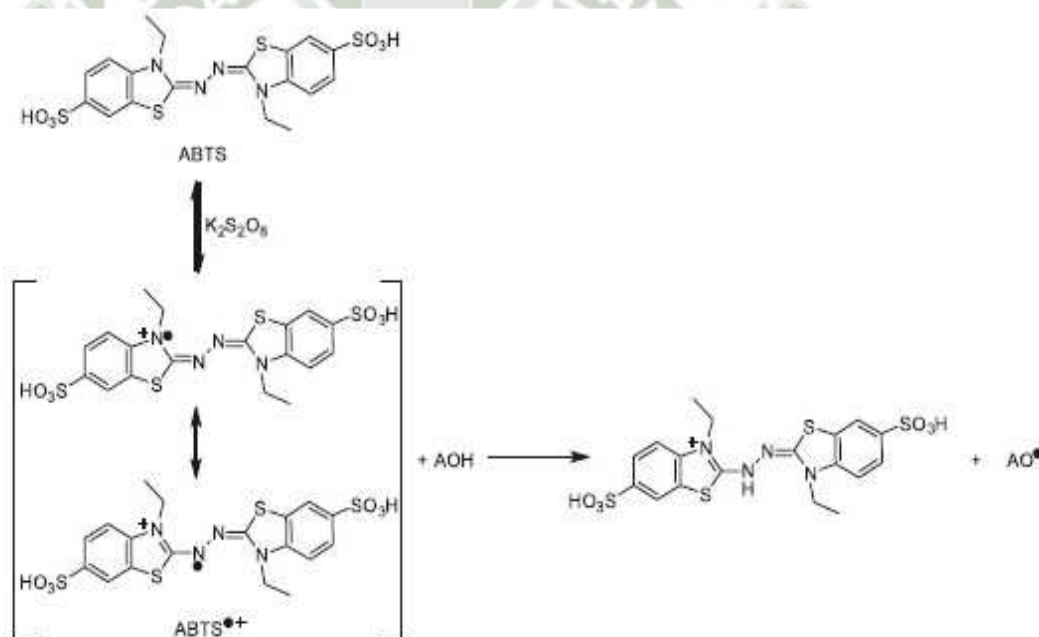
Fd = Factor de dilución

Wma= Peso de la muestra de sancayo (g)

TE = Equivalente a Trolox

**2.6.3 MÉTODO ABTS (ÁCIDO 2,2'-AZINO-BIS-3-ETILBENZO TIAZOLIN -6-SULFONICO). MILLER Y RICE -EVANS, 1997.**

Es un método desarrollado por *Miller y Rice - Evans*, 1997, cuyo fundamento explica que el radical catiónico ABTS ( $ABTS^{\bullet+}$ ), el cual posee una coloración verde-azulada y una absorción espectrofotométrica a 734 nm, es decolorado al reaccionar con un antioxidante.

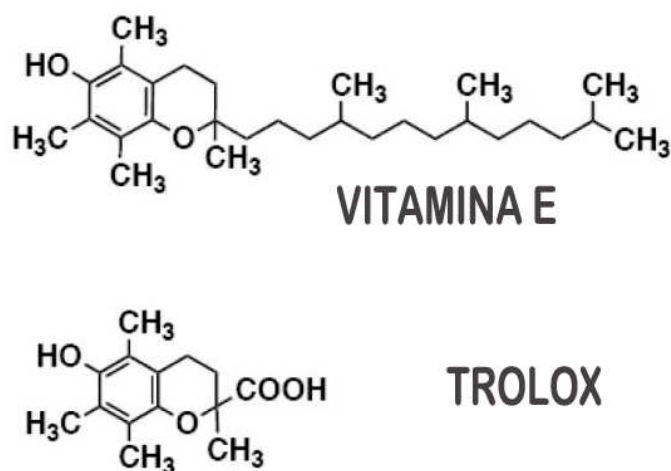


**FIGURA N° 15.: Estructura del  $ABTS^{\bullet+}$  antes y después de la reacción con el antioxidante.** Extraído de *Re R., et all, 1999.*

La técnica para la generación del radical catión  $ABTS^{\bullet+}$ , implica la producción directa del cromóforo  $ABTS^{\bullet+}$  verde-azul a través de la oxidación del ABTS por el persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ). Este presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS, como se observa en la

Figura N° 15, de esta manera el grado de decoloración del radical catión  $ABTS^{\bullet+}$  está determinado en función de la concentración, el tiempo, y del valor correspondiente del Trolox como estándar.<sup>102</sup>

El patrón que suele utilizarse es el ácido-6-hidroxi-2, 5, 7, 8 tetrametilcromano-2-carboxílico o conocido como Trolox, el cual es un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E como se observa en la Figura N° 16, por ello los resultados se suelen expresar en TEAC, o actividad equivalente a Trolox ( $\mu\text{molTE/g}$  de muestra peso seco).



**FIGURA N° 16.: Estructura de la vitamina E y Trolox.** Extraído de *Debbie J. M., et all, 2010.*

Entre las propiedades que presenta usar el ABTS, es que es soluble en solventes acuoso y orgánico, lo cual lo hace que el método sea capaz de determinar la actividad antioxidante hidrofílica y lipofílica de extractos y fluidos biológicos.

La concentración de ABTS en el medio de reacción se calcula usando la curva de calibración obtenida por regresión lineal. Los resultados suelen ser mayormente expresados en TEAC o actividad equivalente a Trolox ( $\mu\text{mol TE/g}$  de muestra peso).

### • **Determinación de actividad antioxidante por espectrofotometría**

#### **a. Preparación de la solución madre $ABTS^{\bullet+}$**

Se preparó una solución de ABTS, al que llamaremos reactivos A, pesando 78,4 mg de ABTS y llevándolo a un volumen de 10 ml con agua destilada. Así mismo se preparó una solución de persulfato de potasio, el que recibirá el nombre de reactivo B, por pesó 13,2 mg de persulfato de potasio y se

diluyó en una fiola con 10 ml de agua destilada. Ambas soluciones se almacenaron en frascos ámbar bajo condiciones de refrigeración y oscuridad.

La solución madre de ABTS<sup>•+</sup> se preparó mezclando volúmenes iguales de los reactivos A y B (relación 1:1) mezcla que se dejó reaccionar a temperatura ambiente y en oscuridad por 18 horas antes de ser usada.

A partir de la solución madre de ABTS<sup>•+</sup> se preparó una solución diluida de ABTS<sup>•+</sup>, para ello se colocó en un frasco de color ámbar 1 ml de la solución madre de ABTS<sup>•+</sup> y 62 ml de metanol aproximadamente, hasta obtener una absorbancia de 1.1 +/- 0,02 a 734 nm, corrigiendo la lectura con metanol o solución madre de ABTS<sup>•+</sup> según sea el caso.

#### **b. Preparación de la solución Stock de Trolox**

Se preparó una curva estándar a partir de una solución madre de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) 1 mmol/L. Para eso se pesó 2,5 mg de Trolox y se diluyó con 10 ml de metanol.

#### **c. Preparación de la curva de calibración**

A partir de la solución de Trolox 1 mmol/L, se prepararon diferentes concentraciones del reactivo en un rango de 0,02 a 0,2 mmol/L en fiolas de 5 ml con metanol (Ver Tabla N° 8.). A partir de dichas concentraciones, se tomó 250 ul de cada solución de Trolox y se le adicionó 4750 ul de la solución madre de ABTS<sup>•+</sup>. Se homogenizó cada mezcla, y se dejó reaccionar por 7 minutos en oscuridad.

**TABLA N° 8.: Preparación de la curva de calibración con ABTS<sup>•+</sup>.**

N° Patrón	Blanco	ST <sub>1</sub>	ST <sub>2</sub>	ST <sub>3</sub>	ST <sub>4</sub>	ST <sub>5</sub>
<b>Trolox 1 mmol/L</b>						
<b>(ul)</b>	–	100	250	500	750	1000
<b>MetOH (ul)</b>	5000	4900	4750	4500	4250	4000
<b>Concentración</b>						
<b>mmol/L</b>	0	0,02	0,05	0,1	0,15	0,2
<b>HOMOGENIZAR</b>						
<b>Tomar (ul)</b>	5000	250	250	250	250	250
<b>ABTS sol. Madre</b>						
<b>(ul)</b>	–	4750	4750	4750	4750	4750

Pasados los 7 minutos, cada estándar es leído en el espectrofotómetro a 734 nm. Se puede apreciar la reacción del radical  $ABTS^{\bullet+}$  con el Trolox, por la atenuación del color verde azulado, como se ve en la Figura N° 17.

Para la obtención de la curva de calibración, se graficó la concentración de Trolox en mmol/L vs la absorbancia de cada patrón. Se determinó la concentración de la actividad antioxidante en la muestra, empleando 0,15 ml del extracto previamente preparado en el punto 2.3.2.



**FIGURA N° 17.: Estándares para la curva de calibración del reactivo  $ABTS^{\bullet+}$  de menor a mayor concentración de Trolox.**

#### 2.6.4 CÁLCULOS

La actividad antioxidante se expresó como  $\mu\text{mol TE/g}$  de muestra seca, de acuerdo a las curvas obtenidas y la siguiente ecuación:

$$\mu\text{mol TE/g} = \left[ \left( \frac{\Delta\text{Abs} - b}{m} \right) \times V \times Fd \right] \div Wma$$

**Donde:**

b = intercepto

m = pendiente

$\Delta\text{Abs}$  = Absorbancia del Blanco – Absorbancia de la muestra (a 734 nm)

V= volumen del extracto de la muestra (5 ml)

Fd = Factor de dilución

Wma= Peso de la muestra de sancayo (g)

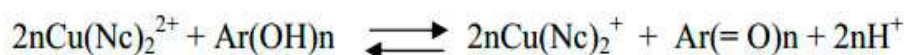
TE = Equivalente a Trolox

### 2.6.5 ENSAYO CUPRAC (CAPACIDAD ANTIOXIDANTE REDUCTOR DE ION CÚPRICO). APAK ET. AL. 2004.

El método espectrofotométrico CUPRAC fue desarrollado por *Apak* para determinar la capacidad total de antioxidantes en alimentos. Se basa en la medida de la absorbancia del quelato Cobre(I)-Neocuproína [Cu(Nc)<sub>2</sub><sup>+</sup>] formado como resultado de la reacción redox de los antioxidantes con cadenas rotas junto con el reactivo Cobre(II)-Neocuproína (CUPRAC), donde la absorbancia se mide a una longitud de onda de 450 nm.<sup>8</sup>

El método comprende en mezclar la solución antioxidante con cloruro de cobre (II), neocuproína diluida en metanol y acetato de amonio acuoso a un pH 7, y medir subsecuentemente la absorbancia a 450 nm después de 30 min de reacción.

La reacción que tiene lugar se encuentra en la Figura N° 18.



**FIGURA N° 18.: Reacción del reactivo CUPRAC con un agente antioxidante.** Extraído de *Apak R., et al., 2011.*

Los protones liberados pueden neutralizarse con la solución acetato amónico. En la reacción de la Figura N° 18, los polifenoles (-OH) se oxidan a las correspondientes formas quinónicas (= O) y el Cu(II)-Nc es reducido a Cu(I)-Nc que corresponde a una coloración amarillo intenso cuando la concentración del agente antioxidante es mayor.

La actividad antioxidante de la muestra se calcula con la ecuación lineal obtenida de la curva de calibración. Los resultados normalmente se expresan en TEAC o actividad equivalente a Trolox (μmol TE/g de muestra peso).

- **Determinación de actividad antioxidante por espectrofotometría**

**a. Preparación de las soluciones reaccionantes**

Se preparó una solución metanólica de cloruro de cobre (II) 12 mM en una fiola de 10 ml y una solución de neocuproína 75 mM también con un solvente metanólico a un volumen final de 10 ml. Además, se preparó una solución buffer de acetato de amonio 1 M ajustado a un pH 7. Cada solución se preparó el mismo día de realizar la lectura espectrofotométrica.

**b. Preparación de la solución Stock de Trolox**

Se hizo una curva estándar utilizando como agente antioxidante una solución de Trolox 1 mmol/L en un solvente metanólico. Para ello se pesó 2,5 mg de Trolox y se diluyó con 10 ml de metanol.

**TABLA N° 9.: Preparación de la curva de calibración para el ensayo CUPRAC**

N° de Patrón	Blanco	ST 1	ST 2	ST 3	ST 4	ST 5
<b>Cloruro de cobre (II) 12 mmol, ml</b>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<b>Neocuproína 75 mmol, ml</b>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<b>Acetato de Amonio 1mol pH 7, ml</b>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<b>Trolox 1mmol , ul</b>	–	50	100	150	200	250
<b>Agua destilada</b>	2,0	1,95	1,9	1,85	1,8	1,75
<b>Concentración Final, mmol/L</b>	–	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05

**c. Preparación de la curva de calibración**

Se elaboró diferentes concentraciones del reactivo Trolox 1 mmol/L en un rango de 0,01 a 0,05 mmol/L en fiolas de 5 ml, a las cuales se agregó 1 ml de cada solvente preparado y se enrasó con agua destilada como se muestra en la Tabla N° 9. Se homogenizó cada mezcla, y se dejó reaccionar por 30 minutos en oscuridad, para finalmente leer su absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro.



**FIGURA N° 19.: Estándares para la curva de calibración del Método CUPRAC de una menor a mayor concentración de Trolox.**

Se puede apreciar y medir la formación del complejo Cobre(I)-Neocuproína [Cu(Nc)<sub>2</sub><sup>+</sup>] por la formación de un color amarillo intenso a una mayor concentración de agente antioxidante como se aprecia en la Figura N° 19.

Para la obtención de la curva de calibración se graficó la concentración de Trolox en mmol/L vs la absorbancia de cada patrón. Se determinó la concentración de la actividad antioxidante en la muestra, utilizando 0,1 ml del extracto previamente preparado en el punto 2.3.2.

#### 2.6.6 CÁLCULOS

La actividad antioxidante se expresó en  $\mu\text{mol TE/g}$  muestra seca, y la ecuación utilizada fue la misma que la del punto 2.5.4.

### 2.7 DETERMINACION DE LA GENOTOXICIDAD DEL *Corryocactus brevistylus* POR EL ENSAYO COMETA

Para la determinación de la genotoxicidad del sancayo, se realizó el ensayo cometa utilizando células mononucleares de sangre periférica.

#### 2.7.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE *Corryocactus brevistylus* (SANCAYO)

Se prepararon extractos acuosos de sancayo a partir de la pulpa previamente liofilizada de acuerdo al punto 2.3.1 antes mencionado. Para la preparación de dichas concentraciones, se pesó 0,2 g de sancayo liofilizado y se colocó en un tubo eppendorf al cual se le agregó 1 ml de agua destilada. Se procedió a sonicar

por 2 min, se centrifugó a 4000 rpm por 5 min y luego se separó el sobrenadante en otro tubo eppendorf. El sobrenadante recuperado fue filtrado, primero en papel filtro delgado y luego en filtros anotop en una fiola de 5 ml. Se realizó el proceso de extracción tres veces por muestra y luego el extracto fue enrasado con solución PBS 1X. La concentración obtenida fue del 4% a partir del cual se preparó una concentración del 2% y de 0,1%. (ANEXO 1, Figura N° 34. a-g)

## 2.7.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó la extracción de células mononucleares a partir de sangre periférica, y luego se evaluó la genotoxicidad del extracto del fruto de *Corryocactus brevistylus* utilizando el ensayo cometa según el método desarrollado por Singh *et al.* (1988) con ciertas variaciones.

### a. Extracción de células mononucleares a partir de sangre humana

- Se extrajo cerca de 10 ml de sangre periférica por punción venosa en un frasco limpio con anticoagulante y se diluyó con suero fisiológico en una proporción 1:1. (ANEXO 1, Figura N° 35. a)
- Se procedió a separar las células usando Ficoll-Paque Premium de la siguiente manera:  
Se colocó en la base del tubo Falcon, 4 ml de Ficoll y encima 7,5 ml de sangre diluida. (ANEXO 1, Figura N° 36. a)
- Se llevó a centrifugar a 2000 rpm por 30 min. hasta recuperar las células mononucleares las cuales fueron trasvasadas a otro tubo Falcon y se completó con medio RPMI hasta 3 ml. Esto fue centrifugado a 4000 rpm por 10 min. Se repitió el lavado dos veces con medio RPMI (ANEXO 1, Figura N° 36. b)
- Se procedió a hacer la prueba de viabilidad utilizando la técnica de exclusión con azul de Tripan 0,4%, utilizando una cámara de Neubauer considerando las células con un % de viabilidad mayor al 90%. Las células viables eran aquellas que tenían una coloración transparente y las no viables aquellas que tenían una coloración azul. (ANEXO 1, Figura N° 36. c)

### b. Grupos experimentales

Se establecieron 5 grupos experimentales de aproximadamente  $2 \times 10^5$  células para cada tratamiento como se muestra en la Tabla N° 10.

**TABLA N° 10. : Grupos experimentales para el Ensayo Cometa.**

Grupos Experimentales	Concentración
<b>Grupo I:</b> Extracto acuoso de fruto <i>Corryocactus brevistylus</i>	2%
<b>Grupo II:</b> Extracto acuoso de fruto <i>Corryocactus brevistylus</i>	0,2%
<b>Grupo III:</b> Extracto acuoso de fruto <i>Corryocactus brevistylus</i>	0,02%
<b>Grupo Control positivo:</b> Peróxido de hidrógeno	150 umol
<b>Grupo Control negativo:</b> medio RPMI 1640	–

**c. Preparación de los tratamientos**

Los tratamientos se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 1,5 ml de volumen. Cada tubo eppendorf contenían la cantidad de células mononucleares suspendidas en un volumen de 250 ul de medio RPMI 1640 a los cuales se agregó las diferentes cantidades del extracto de sancayo, preparado el mismo día del ensayo, necesarias para llegar a las concentraciones establecidas en cada tratamiento, como se aprecia en la Tabla N° 11.

**TABLA N° 11. : Preparación de cada uno de los tratamientos para el Ensayo Cometa.**

Grupos Experimentales	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo C. Negat.	Grupo C. Posit.
<b>2 x 10<sup>5</sup> Células mononucleares suspendidas en medio RPMI 1640, ul</b>	250 ul	250 ul	250 ul	250 ul	250 ul
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2000 umol</b>	–	–	–	–	37,5 ul
<b>Extracto de Sancayo 4 %, ul</b>	250 ul	–	–	–	–
<b>Extracto de Sancayo 2%, ul</b>	–	50 ul	–	–	–
<b>Extracto de Sancayo 0,1 %, ul</b>	–	–	100 ul	–	–
<b>PBS 1X</b>	–	200 ul	150 ul	250 ul	212,5
<b>CONCENTRACION FINAL</b>	2%	0,2%	0,02%	–	150 umol

Una vez preparados los tratamientos, estos fueron llevados a 37°C en oscuridad por espacio de 30 min. (ANEXO 1, Figura N° 36. d) Pasado el tiempo de incubación, los tubos eppendorf fueron llevados a la centrifugadora a una velocidad de 4000 rpm por 10 min., se mantuvo solo el precipitado y este fue lavado con PBS 1X. Se realizó un segundo lavado y se obtuvieron los linfocitos como precipitado.

Las células tratadas fueron resuspendidas en 50 ul de PBS 1X hasta el momento de su fijación.

#### d. Preparación de soluciones:

- **Lavado del Material: Mezcla sulfocrómica**

Para el lavado del material se preparó una mezcla sulfocrómica utilizando los siguientes reactivos:

Reactivo	Volumen de 50 ml
Dicromato de potasio, $K_2Cr_2O_7$	1,5 g
Ácido sulfúrico, 96%	50 ml

Se pesó y disolvió el dicromato de potasio en 50 ml de ácido sulfúrico al 96%, en un frasco de vidrio de color ámbar. Para asegurar una mejor disolución se dejó la mezcla sulfocrómica por unos minutos en el sonicador y se agitó manualmente hasta que la mezcla se encuentre completamente disuelta. Los portaobjetos, previamente esmerilados, y cubreobjetos, se sumergieron en la mezcla sulfocrómica por al menos 12 h. antes de su uso.

- **Viabilidad Celular: Azul de Tripan al 0,4%**

Se disolvió 0,004 g del reactivo Azul de Tripan en 1 ml de PBS 1X.

- **Solución de PBS 1X: pH 7.4**

Reactivo	Volumen de 250 ml
NaCl	2 g
KCl	0,05 g
$Na_2HPO_4$	0,36 g
$KH_2PO_4$	0,06 g

Se mezcló todos los reactivos con 200 ml de agua destilada con agitación constante hasta su disolución. Se ajustó el pH con HCl o NaOH hasta un pH de 7,4. Se enrasó con agua destilada en una fiola de 250 ml.

- **Solución de Agarosa de Punto de Fusión Normal al 1,5 %**

Se preparó 4 ml de agarosa, pesando 0,06 g y diluyéndolo con 4 ml de PBS 1X.

- **Solución de Agarosa de Punto Fusión Bajo al 0,75 %**

Se preparó la solución utilizando 0,0263 g de agarosa en 3,5 ml de PBS 1X.

- **Solución madre de Lisis: pH 10.0**

Reactivo	Volumen de 250 ml
NaCl, 2,5 M	14,61 g
Tris, 10 mM	0,3 g
EDTA, 100 mM	9,3 g
NaOH	2 g

Se disolvió todos los reactivos en 200 ml de agua destilada con ayuda de un agitador magnético. Se ajustó el pH a 10.0 con HCl o NaOH concentrado y luego se enrasó con agua destilada hasta 250 ml. La solución lisis madre tiene una duración máxima de hasta 2 semanas.

- **Solución de Lisis Final**

Reactivo	Volumen de 50 ml
Solución madre de lisis pH 10.0	44,5 ml
DMSO	10% = 5 ml
Tritón X-100	1% = 500 ul

Se mezcló todos los reactivos con cuidado y se enrasó en una fiola de 50 ml. Se llevó a refrigeración por lo menos 20 min. antes de su uso verificando de

antemano que el pH sea de 10. La preparación se hizo inmediatamente antes de su uso.

- **Solución Alcalina: Desenrollamiento y Electroforesis**

Reactivo	Volumen de 250 ml
NaOH, 10 N	7,5 ml
EDTA, 200mM (pH 10)	1,25 ml

Se midió los reactivos (7,5 ml de NaOH 10 N y 1,25 ml EDTA) y se aforaron con agua destilada fría hasta un volumen de 250 ml. Los reactivos por separado tienen una duración de hasta 2 semanas, mientras que la solución alcalina se preparó inmediatamente antes de su uso.

- **Solución de Tinción con Nitrato de Plata**

**Solución A:**

Reactivo	Concentración
Carbonato de Sodio	5%

**Solución B:**

Reactivo	Concentración
Nitrato de amonio	0.2 %
Nitrato de plata	0.2 %
Ácido silícico túngstico	0.5 %
Formaldehído	0.15 %

Las soluciones A y B luego de ser preparadas, el mismo día del ensayo, se almacenaron en envases por separado. Se mezcló 66% de la solución A junto con 34 % de la solución B en un frasco justo antes de ser utilizado.

- **Solución de Neutralización: pH 7.5**

Reactivo	Volumen de 250 ml
Tris – base, 0,4 M	12,125 g

Se disolvió el reactivo en 200 ml de agua destilada, ajustando el pH a 7,5 con HCl concentrado y luego se aforó en una fiola de 250 ml. La solución se almacenó a temperatura ambiente en frasco en frasco ámbar hasta por espacio máximo de 2 semanas.

- **Solución de Fijación**

Reactivo	Concentración
Ácido tricloroacético	15%
Sulfato de zinc	5%
Glicerol	5%

Se disolvió los reactivos en agua destilada, y una vez disueltos se enrazó en una fiola de 25 ml con agua destilada. La solución se preparó inmediatamente antes de ser usado.

- e. **Preparación de los portaobjetos:**

Se recubrió los portaobjetos con agarosa de punto de fusión normal al 1,5% utilizando 500 ul de agarosa NMP con ayuda de otro portaobjeto. Los portaobjetos ya preparados fueron llevados a una estufa a 37°C y se los dejó secar por 15 min para su deshidratación, posteriormente se los almacenó a 4°C hasta el momento de su uso. (ANEXO 1, Figura N° 37. a y b)

Otros autores como *Nandhakumar S. et al.* y *Alok D. et al.* reportan en sus trabajos una concentración del 0,75 % y 1 %, respectivamente, para la preparación de la agarosa de punto de fusión normal, sin embargo, se ha visto que al preparar concentraciones menores al 1% para la primera capa de agarosa, el gel tiende a separarse del portaobjeto e incluso romperse luego de la etapa de neutralización. Al aumentar la concentración de la agarosa NMP a 1,5 % se observó que existe una mejor resistencia y fijación de esta en el portaobjeto; esta concentración también fue considerada por *Rigonato J. et al.* al realizar el ensayo cometa en su trabajo de genotoxicidad con moluscos.<sup>60, 1, 76</sup>

Así mismo *Nandhakumar S. et al.* sugiere deshidratar la primera capa a 37 °C antes de ser utilizada. El tiempo de almacenamiento de los cubreobjetos a 4°C, se recomienda que no sea mayor que 12 horas, incluso si es posible es preferible prepararlos el mismo día de su uso.<sup>60</sup>

Las células mononucleares, una vez aisladas y expuestas a los tratamientos previamente establecidos, se mezclaron con la agarosa de bajo punto de

fusión (LMP) 0,75% a 37 °C en una proporción de 1:10. Se tomó 75 ul de la mezcla anterior y se la colocó encima de la primera capa del portaobjeto con agarosa NMP extendiéndola con ayuda de un cubreobjetos. Los portaobjetos preparados con las muestras se llevaron a 4°C por 5 min para su gelificación y posterior retiro del cubreobjeto. (ANEXO 1, Figura N° 37. c) La concentración de la agarosa LMP va desde 0,05 %, según el protocolo de trabajo de *Nandhakumar S. et al*, hasta 0,75 % el cual es una de las concentraciones también utilizadas.<sup>60</sup>

#### f. Lisis:

Después de la solidificación del gel de agarosa, se incubó las láminas en solución de lisis, pH 10,0 a una temperatura de 4 °C por 18 h en oscuridad. (ANEXO 1, Figura N° 38. a).

La solución de lisis utilizada en el ensayo de cometa, consiste en una solución acuosa altamente concentrada, que permite romper la membrana celular de las células. La sal acuosa de proteínas, altera los patrones de unión dentro de la célula, he irrumpe en el contenido de ARN. El detergente contenido en la solución de lisis, disuelve las membranas celulares haciendo que las células se destruyen y que todo todas las proteínas, ARN, membranas y componentes citoplasmáticos y nucleoplasmicos se interrumpen y se difunden en la matriz de agarosa. Sólo el ADN de la célula se mantiene, y se desenreda para llenar la cavidad en la agarosa que toda la célula anteriormente llena, esta nueva estructura se denomina nucleoide.<sup>122</sup>

El tiempo empleado para la solución varía entre 1 h., como los trabajos reportados por *Urbina C. et al*, y *Noroozi M. et al*, 2 h., como el trabajo de *Alok D. et al*, y hasta menos de 24 h. como lo reporta *Nandhakumar S. et al*.<sup>123, 61, 1, 60</sup>

Luego de haber realizado pruebas usando diferentes tiempos de lisis, se encontró que luego de las 18 h. de reacción las células mostraron mejores resultados, tanto en su control negativo como positivo, que cuando se las sometía a 1 h de lisis.

#### g. Exposición Alcalina:

Terminada la lisis, se incubaron las láminas en solución alcalina por espacio de 10 min, a un pH  $\geq$  13. (ANEXO 1, Figura N° 39. a)

En la exposición alcalina, se logra la separación de la doble cadena de DNA, la producción de roturas de cadena simple (SSB) y la expresión de sitios álcali-lábiles (ALS) relativas al proceso de reparación. El tiempo empleado según *Singh et al.* es de 20 min, pero otros investigadores se sugieren emplear un menor tiempo en esta etapa, y se consideró emplear 10 min. como el trabajo de *Sotil G., et al.*<sup>84, 124</sup>

#### **h. Corrida electroforética:**

Se realizó la corrida electroforética en una cubeta de electroforesis horizontal durante 20 minutos a 4 °C bajo condiciones alcalinas y oscuridad para producir cometas. Las condiciones electroforéticas fueron de 30 v y 246 mA. (ANEXO 1, Figura N° 39. b)

En la corrida electroforética, el tiempo empleado fue el mismo indicado por *Singh et al.* el cual además de él se ha indicado que 20 min es el tiempo idóneo para que los fragmentos de DNA se desplace lo suficiente en el gel de agarosa para que pueda luego ser contabilizado y medido.<sup>84</sup>

#### **i. Neutralización:**

Se lavó las láminas con agua destilada y se cubrieron con solución buffer de neutralización (pH 7,5) por 10 min. previamente almacenada a 4 °C. Luego de la neutralización se lavó las placas con agua destilada, y se las dejó secar por al menos 1 h. (ANEXO 1, Figura N° 40. a)

El lavado con una solución de neutralización nos permitirá neutralizar la alcalinidad de las muestras previamente incubadas con solución electroforéticas de  $\text{pH} \geq 13$ . Posterior a ello, se dejó secar las muestras por 1 h. a temperatura de ambiente, procedimiento realizado por *Nadin S., et al.*, para tener las muestras lo suficientemente secas para realizar el teñido con nitrato de plata de forma adecuada.<sup>125</sup>

#### **j. Tinción:**

La tinción se realizó con una solución de nitrato de plata, preparado al momento de la tinción, previo lavado de las muestras con solución de fijación.

**Fijación:** Se lavó los portaobjetos con las muestras con solución de fijación por 10 minutos a 4°C y en oscuridad. Luego se enjuagó las láminas con agua destilada. (ANEXO 1, Figura N° 41. a)

**Tinción propiamente dicha:**

- Se colocó las láminas en placas petri y se le agregó la solución de teñido, dejándolo en movimiento con ayuda de un shaker. (ANEXO 1, Figura N° 41. b)
- Para garantizar un buen teñido, se dejó las muestras en tinción por espacio de 30 min. y en oscuridad con ayuda de papel aluminio.
- Se detuvo el teñido con una solución STOP por 5 min. y se lavó las placas seguidamente con agua destilada.
- Se procede a ver los cometas en un microscopio de campo claro, una vez estos hayan secado. (ANEXO 1, Figura N° 41. c)

El procedimiento para la fijación y tinción con nitrato de plata fue realizado de acuerdo al trabajo realizado por *Nadin S., et al.* quien posee un artículo con datos detallados a cerca de la tinción con nitrato de plata y con los cuales se obtuvo buenos resultados luego de ponerlos en práctica. La única corrección realizada en base al trabajo de *Nadin S.*, fue el de no agregar el 5% de carbonato de sodio para la solución B, según indican en el artículo, ya que al agregarle esta cantidad extra no se pueden observar los cometas como se muestra en las imágenes del paper.<sup>125</sup>

**k. Análisis:**

Se realizó un análisis visual utilizando un microscopio óptico con un aumento de 40 X, en el cual se evaluaron y cuantificaron 50 cometas en el centro de cada gel por muestra. (ANEXO 1, Figura N° 42, a y Figura N° 43, a y b)

- ***Análisis por Unidades Arbitrarias***

Cada cometa fue clasificado de acorde a la categoría o grado de daño correspondiente en el ADN entre 0 y 4 (Ver Figura N° 9). La magnitud del daño al DNA fue expresado en Unidades Arbitrarias (UA).<sup>19</sup>

El procedimiento para el cálculo de (UA) se resume en la siguiente ecuación:<sup>19</sup>

$$UA = (0 \times TCG0) + (1 \times TCG1) + (2 \times TCG2) + (3 \times TCG3) + (4 \times TCG4)$$

Donde:

- TCG0 = Total de células grado 0 (células no dañadas)
- TCG1 = Total de células grado 1 (mínima frecuencia de lesiones en el ADN)

- TCG2 = Total de células grado 2 (daño bajo, baja lesiones en el DNA)
- TCG3 = Total de células grado 3 (daño alto, alta de lesiones en el DNA)
- TCG4 = Total de células grado 4 (células totalmente dañadas)

- **Análisis de acuerdo al porcentaje de ADN en la cola.**

Las células analizadas por unidades arbitrarias fueron utilizadas por el programa CaspLab y se clasificaron empleando una escala arbitraria de cinco categorías según la cantidad de ADN en la cola, en porcentaje, determinando el nivel de daño. (Ver Tabla N° 12)

**TABLA N° 12. : Interpretación de la cantidad de ADN en la cola.**

Extraído de *Noroozi M., et all, 1998.*

Grado	Grupos Experimentales	Porcentaje
0	Sin daño	≤5 %
1	Bajo Nivel de Daño	5 – 25 %
2	Daño Moderado	25 – 45 %
3	Daño Elevado	45 – 70 %
4	Daño Extremo	≥ 70 %

- **Análisis de acuerdo al valor obtenido en el momento de cola (TM) y momento de cola Olive (OTM)**

Se determinó y analizó el momento de cola (TM) y el momento de cola Olive (OTM), utilizando para ello los datos del cometa otorgados por el software CaspLab.

$$TM = \frac{TailDNA\% \times TailLength}{100}$$

TM = Momento de cola (Tail Moment).

Tail DNA % = Porcentaje de DNA en cola, pixeles.

Tail Length = Longitud de la cola, pixeles.

$$OTM = \frac{TailDNA\% \times (TailMeanX - HeadMeanX)}{100}$$

OTM = Momento de cola Olive (Olive Tail Moment).  
Tail DNA % = Porcentaje de DNA en cola, pixeles.  
Tail MeanX = Centro de gravedad del DNA en la cola, pixeles.  
Head MeanX = Centro de gravedad del DNA en la cabeza, pixeles.

## 2.8. FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES



# Obtención y almacenamiento del *Corryocactus brevistilus* (Sancayo)

Pelado, picado y liofilizado de la pulpa

Determinación del contenido de ácido ascórbico del *Corryocactus brevistilus* (Sancayo)

- Preparación del extracto acuoso de Sancayo
- Determinación Voltamétrica
- Buffer acetato de sodio pH 4,7, 10 mL
- MUESTRA: Extracto de Sancayo, 0,5 mL
- Solución estándar de ácido ascórbico, 0,2 mL

Determinación del contenido de polifenoles totales del *Corryocactus brevistilus* (Sancayo)

- Preparación del extracto metanólico de Sancayo
- Método Follin - Ciocalteu
- Curva de Calibración: 4 - 8 mg/L
- Ácido Gálico 1000 ppm
- Reactivo Follin - Ciocalteu, 0,25 mL
- Carbonato de sodio 20 %, 2 mL
- MUESTRA: Extracto de Sancayo, 0,5 mL

Evaluación de la capacidad antioxidante del *Corryocactus brevistilus* (Sancayo)

- Preparación del extracto metanólico de Sancayo
- Método DPPH
- Curva de Calibración: 0,02 - 0,04 mmol/L
- Preparación radical DPPH • 2,1 mmol/L
- Solución Stock Trolox 0,2 mmol/L
- MUESTRA: Extracto de Sancayo, 0,08 mL
- Método ABTS
- Curva de Calibración: 0,02 - 0,2 mmol/L
- Preparación de la solución madre: ABTS +: ABTS y Persulfato de potasio (1:1)
- Solución Stock Trolox 1 mmol/L
- MUESTRA: Extracto de Sancayo, 0,15 mL
- Método CUPRAC
- Curva de Calibración: 0,01 - 0,05 mmol/L
- Cloruro de cobre (II) 12 mmol/L
- Neocuproína 75 mmol/L
- Acetato de amonio 1 mol, pH 7
- Solución Stock Trolox 1 mmol/L
- MUESTRA: Extracto de Sancayo, 0,10 mL

Determinación de la genotoxicidad del *Corryocactus brevistilus* por el Ensayo Cometa (Sancayo)

- Preparación del extracto acuoso de Sancayo
- Extracción de células mononucleares
- Preparación de los grupos experimentales y tratamientos
- GRUPO I: Extracto acuoso de Sancayo al 2 %
- GRUPO II: Extracto acuoso de Sancayo al 0,2 %
- GRUPO III: Extracto acuoso de Sancayo al 0,02 %
- GRUPO IV: Control positivo, H2O2, 150 umol
- GRUPO V: Control negativo, medio RPMI 1640
- Ensayo Cometa
- Preparación de soluciones
- Portaobjetos con agarosa NMP 1,5 %
- Muestras con agarosa NMP 0,75 %
- Lisis: pH 10,0 x 18 h
- Exposición Alcalina: pH mayor a 13, 10 min
- Corrida electrofóretica: 300 V, 46 mA, 20 min
- Neutralización: pH 7, 10 min
- Fijación, 10 min y Tinción 30 min
- Vista en el microscopio
- Análisis e interpretación de resultados

Publicación de esta tesis en revistas científicas con fines académicos e investigativos o para referenciar esta tesis



## 2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los ensayos de determinación de ácido ascórbico y polifenoles totales se realizó el promedio de las mediciones realizadas, desviación estándar, mediana, coeficiente de variabilidad y valor mínimo y máximo de los resultados. A los ensayos de actividad antioxidante y ensayo cometa, se realizó también cálculos de promedio y desviación estándar, además de un Análisis de Varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ) para evaluar si existe variabilidad en al menos uno de los grupos analizados. Se hizo un Test de Tukey, para medir la variabilidad existente entre los métodos o tratamientos realizados y un diagrama de Caja de Bigotes para la comparación gráfica entre las medias de los métodos y/o tratamientos usados en el desarrollo de Actividad Antioxidante y Ensayo Cometa.



## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSION

En el presente estudio se evaluó el contenido de ácido ascórbico, polifenoles totales, la actividad antioxidante con el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) y CUPRAC (Capacidad antioxidante reductor de ion cúprico), además del efecto genotóxico del *Corryocactus brevistylus* (sancayo) en linfocitos de sangre periférica.

Los frutos de *Corryocactus brevistylus* (sancayo) fueron recolectadas en el mercado Andrés Avelino Cáceres y se almacenaron en refrigeración hasta el momento de su uso. Se pelaron y cortaron en trozos medianos para luego liofilizarlos en el Laboratorio de Ingeniería Alimentaria de la Universidad Nacional de San Agustín. Para la identificación de la especie *Corryocactus*, se envió una muestra del fruto al *Herbarium Arequipense* (HUNSA) perteneciente al departamento de académico de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín, donde se identificó que la especie corresponde al género *Corryocactus brevistylus*. En el ANEXO 7 se puede observar la constancia expedida por el herbario en el que se indica el género y la especie a la que corresponde el fruto estudiado.

Luego de liofilizar las muestras se almacenaron en bolsas de polipropileno con cierre hermético en un ambiente en un ambiente libre de humedad y protegidas del calor excesivo (Ver Figura N° 20).

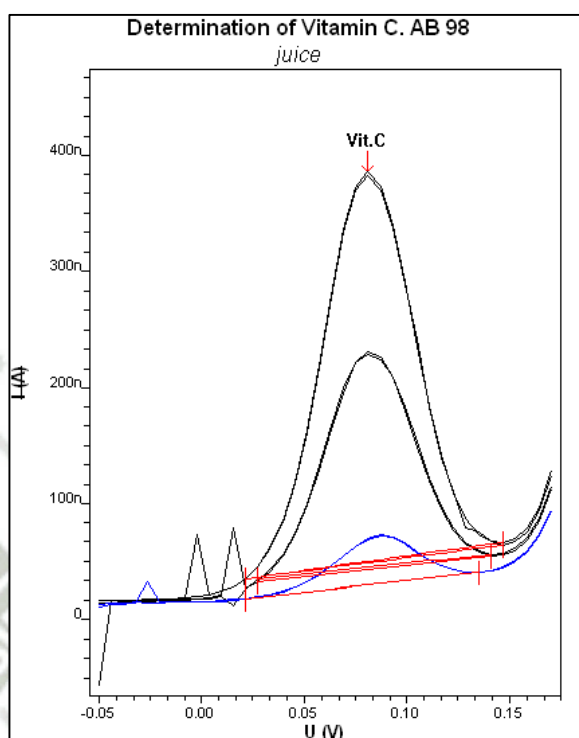


**FIGURA N° 20.: Liofilizado de *Corryocactus brevistylus* (Sancayo).**

#### 3.1. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO

De acuerdo al método voltamétrico se determinó la cantidad de ácido ascórbico existente en la muestra de *Corryocactus brevistylus* liofilizada. Para ello se utilizó

un voltámetro con electrodo de gota de mercurio (DME) conocido también como polarógrafo.



**FIGURA N° 21.: Curva polarográfica de la muestra de *Corryocactus brevistylus* para la determinación de ácido ascórbico.**

En el gráfico de la Figura N° 21 se aprecia la curva polarográfica para la muestra de *Corryocactus brevistylus* analizada por voltametría en la que se observan las curvas de intensidad obtenida para la muestra de sancayo y el estándar de ácido ascórbico.

En la Tabla N° 13 se puede ver la concentración de ácido ascórbico (A.A.) expresada como mg de ácido ascórbico/g de muestra liofilizada, además de su desviación estándar (D. E.) y coeficiente de variabilidad (C. V.).

**TABLA N° 13.: Contenido de ácido ascórbico en *Corryocactus brevistylus*.**

Muestra	Peso (g)	mg A.A./L	mg A.A./g	D. E.	C. V.
1	0,1003	28,376	1,4188	-	-
2	0,1005	28,902	1,4451	-	-
3	0,1004	27,844	1,3922	-	-
<b>PROMEDIO</b>			<b>1,4187</b>	<b>0,0265</b>	<b>1,86%</b>

La cantidad hallada de ácido ascórbico es comparada con la cantidad de ácido ascórbico reportada en la bibliografía el cual corresponde a 37,58 mg A.A./100 g. de muestra para la variedad de *C. brevistylus brevistylus* y 57,1 mg A.A./100 g. de muestra para la variedad de *C. brevistylus puquiensis*.<sup>106</sup>

La proporción de ácido ascórbico obtenida en la variedad de Caylloma mostró ser mayor que lo reportado en la bibliografía, 141,87 mg A.A./100 g., para una muestra liofilizada a comparación de las reportadas. Comparando además esta cantidad con el contenido de ácido ascórbico de otros frutos, como la naranja (50 mg A.A./100 g), el limón (45 – 50 mg A.A./ 100 g), la manzana ( 5 mg A.A./ 100 g) y la cereza (10 mg A.A./100 g) se puede ver que el sancayo presenta una mayor cantidad de vitamina C a excepción del camu camu, el cual posee una cantidad de 1445 mg A.A./ 100 g.<sup>113</sup>

### 3.2. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES.

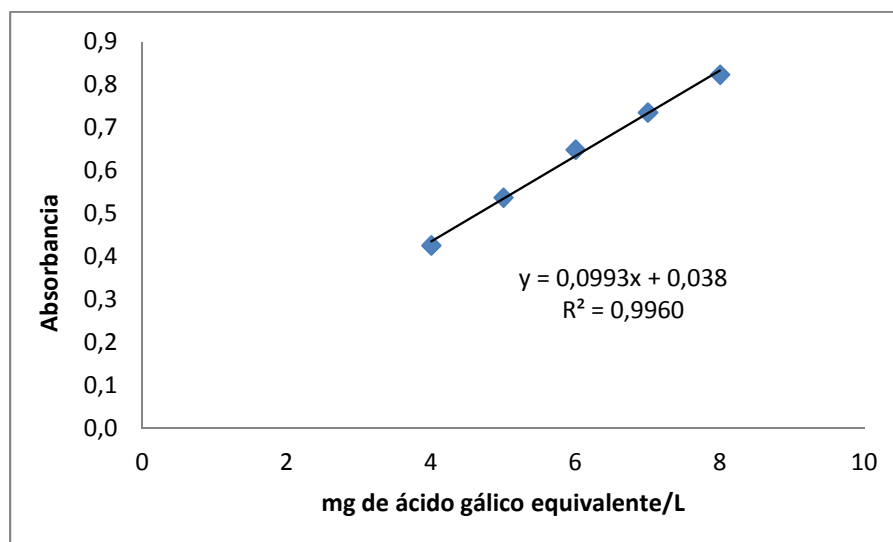
Para la determinación de polifenoles totales en las muestras de sancayo, se empleó el ensayo Follin-Ciocalteu. Este método es uno de los más usados actualmente para la determinación de polifenoles totales por medio del espectrofotómetro.

En la Tabla N° 14 se presentan los valores de absorbancia de la curva de calibración de ácido gálico a 714 nm realizadas por triplicado.

Los datos de la Tabla N° 14 fueron sometidos a un análisis de regresión lineal con el fin de obtener una curva de calibración del método y la ecuación que vincule la variable dependiente “y” (Absorbancia) con la variable independiente “x” (concentración de ácido gálico mg/L). El valor de  $R^2$  nos indica cuanta es la variabilidad en que la variable “y” puede ser explicada por la variable independiente “x”.

**TABLA N° 14.: Datos de la curva de calibración para polifenoles totales**

N°	Concentración (mg/L)	Absorbancia a 714 nm			Absorbancia Promedio	Desviación estándar
		1	2	3		
1	4	0,4125	0,4715	0,3924	0,4255	0,0411
2	5	0,5126	0,5726	0,5256	0,5369	0,0316
3	6	0,6322	0,6895	0,6229	0,6482	0,0361
4	7	0,7178	0,7957	0,6911	0,7349	0,0543
5	8	0,7941	0,9073	0,7674	0,8229	0,0743



**FIGURA N° 22.: Curva de calibración de ácido gálico.**

En el gráfico de la Figura N° 22 se presenta la recta promedio de regresión lineal obtenida de las diferentes concentraciones de ácido gálico y el valor promedio de las absorbancias medidas. Se obtuvo un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) igual a 0,996; una pendiente ( $m$ ) de 0,0993 y un intercepto ( $b$ ) de 0,038.

$$y = 0,0993x + 0,038$$

Se puede observar que la ecuación obtenida es de orden lineal, ya que se obtiene un coeficiente de determinación cercano a la unidad, indicando que existe una relación directa entre la concentración de compuestos fenólicos en *Corryocactus brevistylus* y su absorbancia.

La cantidad de polifenoles totales encontrados en la muestra se expresaron como mg GAE/g de liofilizado de *Corryocactus brevistylus*. En la Tabla N° 15 se muestran los resultados obtenidos de absorbancia y concentración de la muestra de sancayo por triplicado, el promedio de las mismas de 6,4083 mg GAE/g, una desviación estándar de 0,1318 y un coeficiente de variabilidad de 2,06 %.

**TABLA N° 15.: Contenido de polifenoles totales en *Corryocactus brevistylus*.**

Muestra	Peso (g)	Absorbancias	mg GAE/g	D. E.	C. V.
1	0,1006	0,6656	6,2825	-	-
2	0,1008	0,6783	6,3970	-	-
3	0,1011	0,6951	6,5453	-	-
<b>PROMEDIO</b>			<b>6,4083</b>	<b>0,1318</b>	<b>2,06%</b>

La cantidad obtenida de polifenoles totales es comparada con el estudio realizado en la variedad de *Corryocactus brevistylus* de Ayacucho, la cual para una muestra con solvente etanólico en proporción p/v 1:10, se obtuvo un valor de 10,12 mg GAE/g, que comparado con el valor obtenido en este trabajo (6,4083 mg GAE/ g) se encontró que la variedad de Caylloma, posee una menor cantidad de polifenoles totales que la variedad de Ayacucho. Esto puede ser debido a múltiples factores, desde el tratamiento de la muestra y condiciones de trabajo en el laboratorio, hasta las condiciones climáticas de la zona de origen.<sup>54</sup>

El uso del metanol como solvente de extracción para la determinación de fenoles totales en frutos con antecedentes de contener vitamina C y polifenoles, ha demostrado ser efectivos en productos tales como: guayaba, tomate, tuna, aguaymanto, papaya, etc. en los cuales usaban mezclas con etanol, como es el caso de la guayaba, o usaban simplemente el metanol para la preparación de extractos, como es el caso de las otras especies.<sup>74,78</sup>

Si comparamos el contenido de polifenoles totales encontrados en el fruto Sancayo, podemos ver que es mucho mayor (640,83 mg GAE/ 100 g) que otros frutos con antecedentes de poseer cantidades importantes de polifenoles totales como son: la mandarina (242,6 mg GAE/ 100 g), manzana (426,7 mg GAE/ 100 g) e incluso la ciruela (376,5 mg GAE/ 100 g), pero que al igual que el contenido en ácido ascórbico, el fruto camu camu posee una cantidad mucho mayor rondando un valor entre los 1188,573 y 1385,549 mg GAE/ 100 g.<sup>113</sup>

### **3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL *Corryocactus brevistylus***

Para la determinación de la actividad antioxidante del *Corryocactus brevistylus*, utilizando muestras del fruto de sancayo liofilizadas, se utilizaron los métodos colorimétricos DPPH, ABTS y CUPRAC.

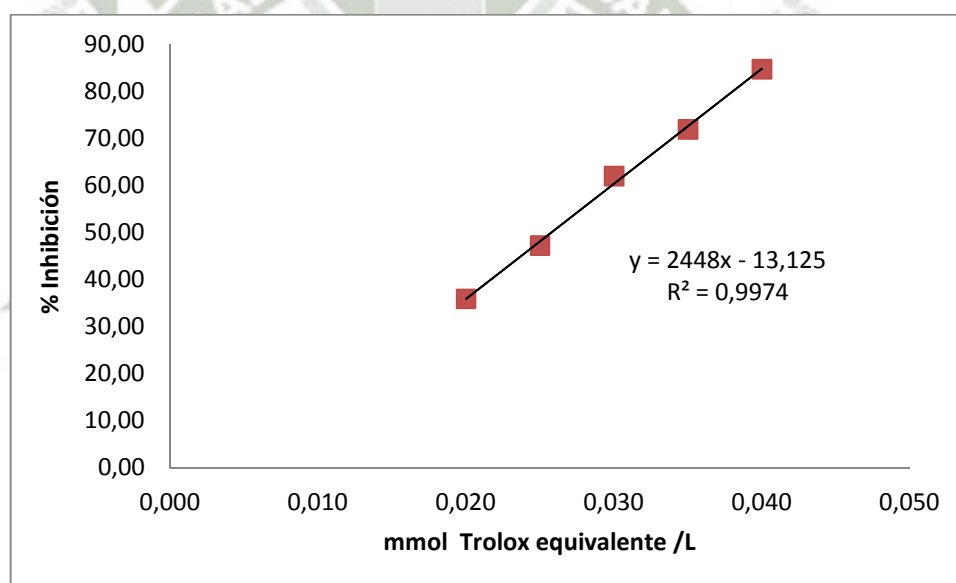
#### **3.3.1 MÉTODO DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL).**

De acuerdo al método desarrollado por DPPH (2.5.1), se obtuvieron los valores de las absorbancias para la curva estándar de Trolox a una longitud de onda de 515 nm que pueden ser apreciados en la Tabla N° 16.

**TABLA N° 16.: Datos de la curva de calibración para Trolox - DPPH**

Absorbancia a 515 nm				Absorbancia Blanco: 1,0814				
mmol/L	Absorbancia			%INHIBICION			PROMEDIO	Desviación estándar
	1	2	3	1	2	3		
0,020	0,7016	0,6987	0,6806	35,1211	35,3893	37,0631	35,8578	1,0523
0,025	0,5686	0,5700	0,5753	47,4200	47,2905	46,8004	47,1703	0,3268
0,030	0,4075	0,4127	0,4139	62,3174	61,8365	61,7255	61,9598	0,3146
0,035	0,3105	0,3016	0,2999	71,2872	72,1102	72,2674	71,8883	0,5264
0,040	0,1798	0,1559	0,1607	83,3734	85,5835	85,1396	84,6988	1,1691

Con los datos obtenidos se obtuvo el gráfico de la Figura N° 23 el cual corresponde a la curva de calibración de la concentración de Trolox expresada en mmol TE/L vs % de inhibición hallado de acuerdo a la ecuación existente en los cálculos del punto 2.5.2.



**FIGURA N° 23.: Representación de la curva de calibración de Trolox – DPPH.**

La Tabla N° 17 muestra el resumen de los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por el método DPPH de la muestra liofilizada de *Corryocactus brevistylus* tratada previamente según el punto 2.3.2.

**TABLA N° 17.: Actividad antioxidante del sancayo por DPPH.**

Muestra	Peso (g)	Absorbancia	% Inhibición	umol TE/ g	D. E.	C. V.
1	0,1007	0,4628	57,2036	89,1541	-	-
2	0,1012	0,4541	58,0081	89,7284	-	-
3	0,1005	0,4400	59,3120	92,0096	-	-
<b>PROMEDIO</b>			<b>58,1746</b>	<b>90,2974</b>	<b>1,5104</b>	<b>1,67%</b>

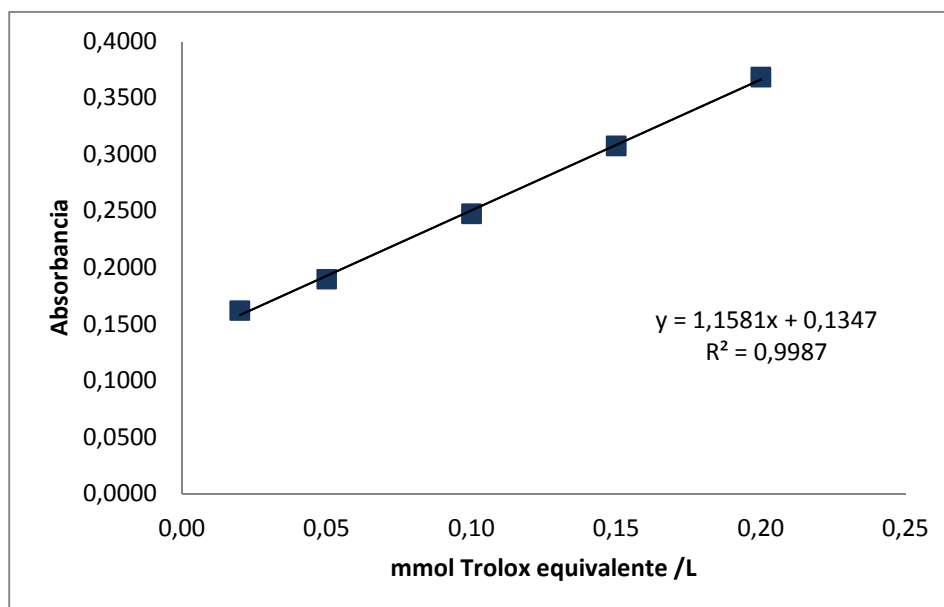
### 3.3.2 MÉTODO ABTS (ACIDO 2,2'-AZINO-BIS-3-ETILBENZOTIAZOLIN-6-SULFONICO).

Utilizando el método desarrollado por ABTS (2.5.3), se obtuvieron los datos que se pueden apreciar en la Tabla N° 18, en los cuales se observan las absorbancias de la curva estándar de Trolox medida a una longitud de onda de 734 nm.

**TABLA N° 18.: Datos de la curva de calibración para Trolox – ABTS.**

mmol/L	Absorbancia a 734 nm			Absorbancia Blanco : 1,1032				Desviación estándar
	1	2	3	1	2	3	PROMEDIO	
0,02	0,9424	0,9399	0,9413	0,1608	0,1633	0,1619	0,1620	0,001
0,05	0,9131	0,9139	0,9131	0,1901	0,1893	0,1901	0,1898	0,000
0,10	0,8529	0,8527	0,8609	0,2503	0,2505	0,2423	0,2477	0,005
0,15	0,7889	0,7957	0,8016	0,3143	0,3075	0,3016	0,3078	0,006
0,20	0,7330	0,7301	0,7408	0,3702	0,3731	0,3624	0,3686	0,006

Con los valores de absorbancia y concentración de cada patrón de Trolox, se armó una curva de calibración como se muestra en el gráfico de la Figura N° 24. La figura muestra una curva correspondiente a las concentraciones de Trolox expresada como mmol TE/L vs la absorbancia de cada una.



**FIGURA N° 24.: Representación de la curva de calibración de Trolox – ABTS.**

En la Tabla N° 19 se observan los resultados obtenidos de actividad antioxidante por el método ABTS para la muestra de *Corryocactus brevistylus*.

**TABLA N° 19.: Actividad antioxidante del sancayo por ABTS**

Muestra	Peso (g)	Absorbancia	Absorbancia 2	umol TE/ g	D. E.	C. V.
1	0,1005	0,8620	0,2412	152,5058	-	-
2	0,1010	0,8597	0,2435	155,0280	-	-
3	0,1006	0,8601	0,2431	155,0722	-	-
<b>PROMEDIO</b>			<b>0,2426</b>	<b>154,2020</b>	<b>1,4692</b>	<b>0,95%</b>

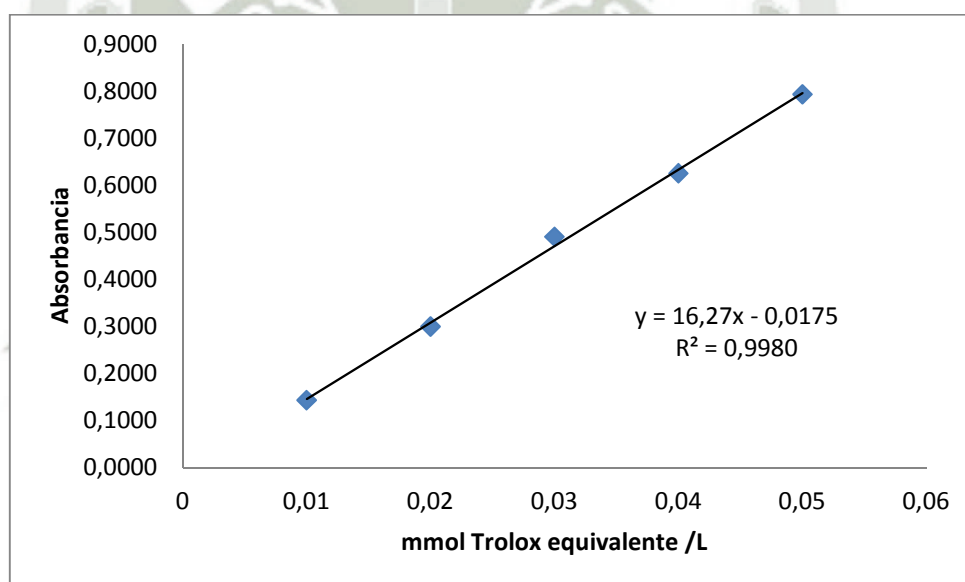
### 3.3.3 ENSAYO CUPRAC (CAPACIDAD ANTIOXIDANTE REDUCTOR DE ION CÚPRICO).

Luego de haberse realizado el ensayo CUPRAC (2.5.5) se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla N° 20, correspondientes a las concentraciones en umol/L, y las absorbancias de cada uno de los patrones que forman la curva estándar de Trolox, medida a una longitud de onda de 450 nm.

**TABLA N° 20.: Datos de la curva de calibración para Trolox – CUPRAC.**

Absorbancia a 450 nm			Absorbancia del Blanco: 0,1357		
mmol/L	1	2	3	Promedio	Desviación estándar
0,01	0,1429	0,1478	0,1389	0,1432	0,004
0,02	0,2753	0,3001	0,324	0,2998	0,024
0,03	0,4518	0,4774	0,5431	0,4908	0,047
0,04	0,5637	0,6406	0,6728	0,6257	0,056
0,05	0,7476	0,794	0,8396	0,7937	0,046

Se armó una curva de calibración de Trolox, con los datos de la Tabla anterior como se muestra en el gráfico de la Figura N° 25, donde se aprecia la curva en relación a mmol TE/L vs absorbancia de cada patrón.



**FIGURA N° 25.: Representación de la curva de calibración de Trolox – CUPRAC.**

En la Tabla N° 21 se pueden ver los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por el ensayo CUPRAC a partir de la muestra de sancayo.

**TABLA N° 21.: Actividad antioxidante del sancayo por CUPRAC.**

Muestra	Peso (g)	Absorbancia	umol TE/ g	D. E.	C. V.
1	0,1008	0,4707	74,4200	-	-
2	0,1009	0,4975	78,4275	-	-
3	0,1010	0,4912	77,3914	-	-
<b>PROMEDIO</b>			<b>76,7463</b>	<b>2,0802</b>	<b>2,71%</b>

### 3.3.4 COMPARACIÓN DE LOS TRES METODOS QUE DETERMINAN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL *Corryocactus brevistylus*.

La actividad antioxidante es determinada por la medición en moles equivalentes, de determinados radicales libres atrapados por un antioxidante existente en una muestra. Debido a que la capacidad antioxidante total de una muestra es determinada por la interacción sinérgica entre diferentes compuestos, así como por el modo de acción concreto de cada uno de ellos, es necesario combinar más de un método para evaluar de manera correcta la actividad antioxidante de una muestra.<sup>66</sup>

En la Tabla N° 22 se muestran los resultados de la actividad antioxidante del *Corryocactus brevistylus* a través de los métodos DPPH, ABTS y CUPRAC.

**TABLA N° 22.: Resultados de la actividad antioxidante a través de los métodos DPPH, ABTS y CUPRAC.**

ESTADISTICOS	METODOS		
	DPPH	ABTS	CUPRAC
Número de Muestras	3	3	3
Promedio +/- DS	90,2974	154,202	76,7463
Desviación Estándar	1,5104	1,4692	2,0802
Coefficiente Variabilidad	1,67%	0,95%	2,71%
T-Student	0,6545	0,3420	0,4666
Distribución T	0,5800	0,7650	0,6867

Se puede apreciar que con el método DPPH se obtuvo un promedio de 90,2974 umol TE/gr, con una desviación estándar de 1,5104 y una variabilidad del 1,67%, indicándonos una alta homogeneidad entre sus valores calculados. El método ABTS mostró un valor promedio de actividad antioxidante más alto que el anterior método, con un valor de 154,202 umol TE/gr, una desviación estándar de 1,4692 y un coeficiente de variabilidad determinado de 0,95% mostrando de igual manera la alta homogeneidad en sus valores encontrados. Finalmente, se observa que con el ensayo

CUPRAC se obtuvo el promedio más bajo en comparación con los otros métodos con un valor promedio de 76,7463 umol TE/gr, una desviación estándar de 2,0802 y un coeficiente de variabilidad del 2,71%.

Además, en la Tabla N° 22 se puede apreciar el valor del Test T- Student para cada uno de los grupos estudiados, encontrándose que para los tres métodos el valor de la distribución es mucho mayor que el valor 0,05, por lo que podemos decir que entre los valores del mismo grupo no existe diferencia estadísticamente significativa entre la media de la población (el promedio de las tres muestras para cada método) y el valor tomado como la mediana de la muestra (el mayor valor de las tres muestras de cada grupo)

Haciendo un test de ANOVA (Tabla N° 23), se observa que los métodos muestran diferencias altamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores de la actividad antioxidante obtenida con los tres métodos.

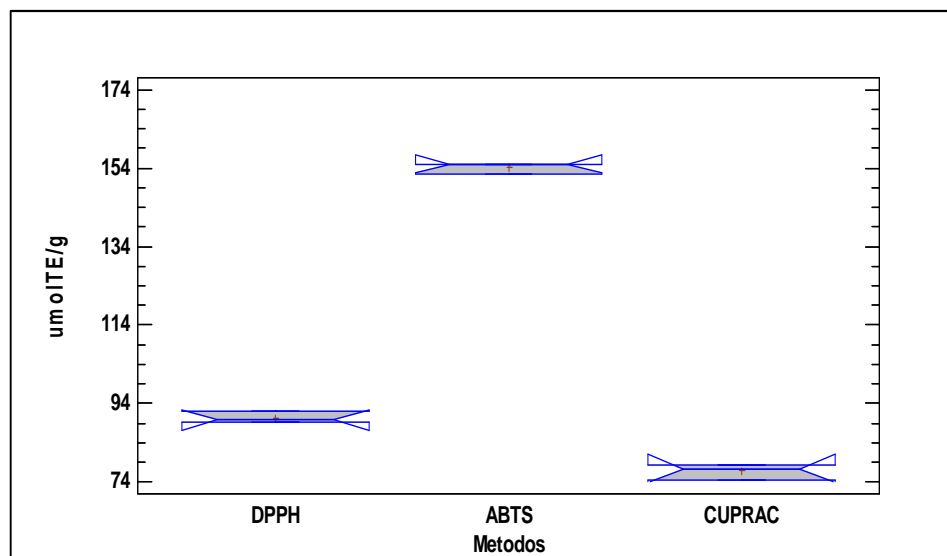
**TABLA N° 23.: ANOVA para la comparación de métodos sobre la actividad antioxidante.**

Fuentes de Variabilidad	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	P	F Teórico
Métodos	10266,8155	2	5133,4078	1756,6515	0,0000	5,1433
Error	17,5336	6	2,9223	—	—	—
Total	10284,3491	8	—	—	—	—

Se comparó las medias obtenidas usando el test de Tukey, cuyos resultados se muestran en la Tabla N° 24. Al respecto se demostró que las medias de los tres métodos muestran diferencia significativa entre sí. El método de ABTS, obtuvo los valores más elevados en umol TE/gr con un valor promedio de 154,202 umol TE/g, seguido por el método de DPPH cuyo promedio para la actividad antioxidante es 90,297 umol TE/gr y por último el ensayo CUPRAC con el cual se obtuvo el promedio más bajo de actividad antioxidante, 76.746 umol TE/gr.

**TABLA N° 24.: Test de Tukey para la comparación de métodos sobre la actividad antioxidante.**

Métodos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
CUPRAC	3	76,746	A
DPPH	3	90,297	B
ABTS	3	154,202	C



**FIGURA N° 26.: Gráfico de caja y bigotes de los métodos DPPH, ABTS y CUPRAC**

Estos resultados pueden ser evidenciados en gráfico de la Figura N° 26 a través de un gráfico de Caja y Bigotes, elaborado con el software Statgraphics en donde se aprecian los promedios y la mediana de cada valor obtenido por cada método.

De acuerdo al trabajo realizado por *Matos C. et al.*, en la variedad de Ayacucho de *Corryocactus brevistylus* se encontraron valores de actividad antioxidante entre 266,32 y 439,11  $\mu\text{g}$  Trolox/g muestra a través del método DPPH.<sup>54</sup>

Diversos trabajos han demostrado la variabilidad entre los resultados obtenidos por los diversos métodos para la determinación de la actividad antioxidante, siendo diferente el comportamiento del método de acuerdo a la muestra medida. *Repo et al.*, 2008, en su trabajo para la determinación de la actividad antioxidante de frutas nativas, trabajó con los métodos DPPH y ABTS usando diversos frutos como el aguaymanto, el cual mostró un valor de 1060,0 g TE/g utilizando el método ABTS, mientras que a través del método DPPH, obtuvo un valor de 729,0 g TE/g.<sup>74</sup>

De la misma forma, *Kuskoski et al.*, 2005, demostró que la actividad antioxidante medida con el método DPPH, 53,2  $\mu\text{mol TE/g}$  para la acerola, en diferentes muestras de pulpa de frutas, era ligeramente menor que la medida a través del método ABTS, 66,5  $\mu\text{mol TE/g}$  de acerola. Así mismo, en el trabajo realizado por *Li et al.*, 2008, se observó que los valores obtenidos para el ensayo CUPRAC, 1328,3  $\mu\text{mol TE/g}$ , fueron considerablemente mayores a comparación que los obtenidos por el método ABTS, 664,2  $\mu\text{mol TE/g}$ , para un estudio comparativo de actividad antioxidante de las semillas de *Vitis vinifera* (uva).<sup>48, 46</sup>

El mecanismo de acción antioxidante de los extractos fue por transferencia de electrones para los tres métodos, ya sea por reacción directa con radicales orgánicos o por reducción de iones (como en el ensayo CUPRAC que reduce el Cu (II) a Cu (I) por los oxidantes presentes).<sup>71</sup> El uso múltiple del ensayo ABTS, confiere múltiples ventajas como, el presentar varios máximos de absorción y una buena solubilidad, además de permitir el estudio de compuestos de naturaleza lipofílica e hidrofílica.<sup>46</sup>

### 3.3.5 INFLUENCIA DEL ÁCIDO ASCÓRBICO Y POLIFENOLES TOTALES EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL *Corryocactus brevistylus*.

Varios componentes de los alimentos como carotenoides, vitamina C, vitamina E, compuestos fenólicos y sus interacciones, contribuyen en diferente medida en la actividad antioxidante de los alimentos por lo que es difícil medir su poder antioxidante total por componentes activos individuales.<sup>108</sup> Debido a ello es que solo se puede ver la influencia de los diferentes componentes antioxidantes de un producto natural, a través de las características que este presenta en relación a su poder antioxidante.

Al comparar la cantidad de ácido ascórbico obtenida en la muestra liofilizada de *Corryocactus brevistylus* con la cantidad de polifenoles totales hallada, se encontró que existe una mayor cantidad de polifenoles totales, 6,4083 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de muestra, a comparación de la cantidad de ácido ascórbico hallada, 1,4187 mg ácido ascórbico/g de muestra. Esto nos puede dar a entender que, habiendo una mayor cantidad de polifenoles totales puede existir a su vez una mayor influencia de éste en la actividad antioxidante del Sancayo.

Para poder dar un mayor soporte a la actividad antioxidante del ácido ascórbico y los polifenoles totales, se reviso otros trabajos de investigación en los cuales se afirma de igual manera la influencia de los polifenoles totales en la actividad antioxidante. De acuerdo con el trabajo realizado por *Deighton et al.*, se ha reportado que hay una relación lineal entre la actividad antioxidante por el método FRAP y la cantidad de fenoles totales donde el contenido de ácido ascórbico contribuye mínimamente en el potencial antioxidante del género *Rubus* perteneciente a la zarzamora. De la misma manera, en el trabajo realizado por *Rekha et al.*, se demostró la actividad antioxidante de diferentes zumos de fruta, los cuales contenían un alto contenido en polifenoles totales a los que se les atribuyó su influencia, ya que a una mayor cantidad de polifenoles totales, había una mayor capacidad antioxidante. El estudio realizado por *Ghafar et al.*, 2010 demostró que existe una relación directa entre la actividad antioxidante de especies cítricas y contenidos fenólicos.<sup>107,109, 110</sup>

A pesar de todos estos trabajo que relacionan el contenido de polifenoles en la actividad antioxidante, el investigador *Rekha et al.* recomienda considerar de igual

manera la presencia del ácido ascórbico como contribuyente a los compuestos polifenólicos cuando se lo relaciona con la actividad antioxidante. <sup>109</sup>

### **3.4. DETERMINACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DEL *Corryocactus brevistylus* POR EL ENSAYO COMETA**

#### **3.4.1 VIABILIDAD CELULAR**

Luego de haber extraído las células mononucleares de la sangre periférica, se evaluó la viabilidad de las células por la técnica de exclusión con azul de Tripán 0,4% antes de someterlas al tratamiento con el extracto. De la prueba se obtuvo un valor promedio de 94,17 % con una desviación estándar de 2,0294, mostrándonos que las células se encuentran en su mayoría viables para el ensayo.

#### **3.4.2 CUANTIFICACION DEL DAÑO DE DNA**

Una vez realizado el ensayo cometa, se examinó las muestras preparadas por el ensayo cometa usando un microscopio óptico con un aumento de 40 X. Se analizaron 50 cometas al azar por cada muestra, en donde se les asignó un grado de daño de una escala de 0 a 4 de acuerdo al % de DNA existente en la cola de los cometas. Para validar este sistema, las medidas del DNA fueron analizadas con el software CaspLab.

- ***Análisis por Unidades Arbitrarias***

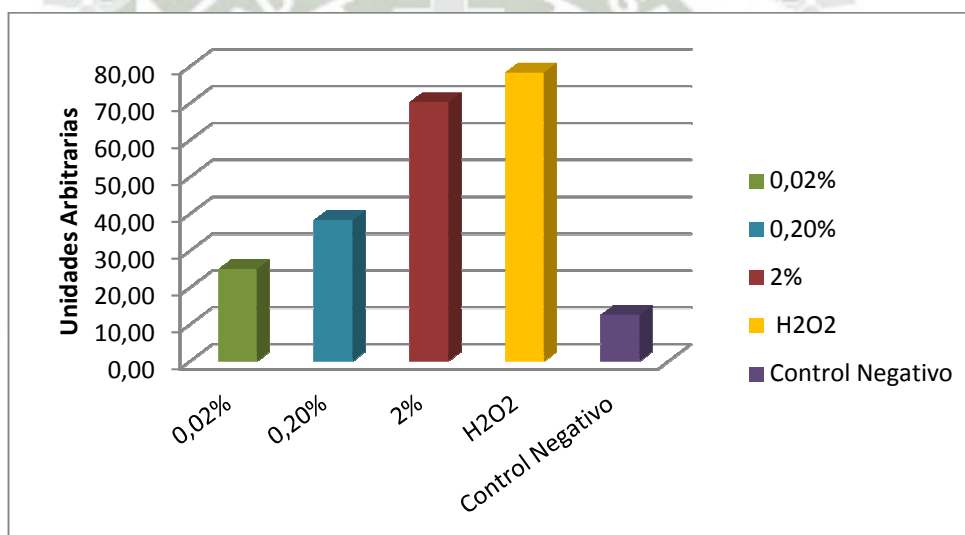
La Tabla N° 25 y la Figura N° 27 nos muestran los resultados en unidades arbitrarias, de las pruebas realizadas con diferentes concentraciones de *Corryocactus brevistylus* (sancayo), control negativo y control positivo (peróxido de hidrogeno, 100 umol).

En los ANEXOS 2, 3, 4, 5 y 6 se pueden apreciar los porcentajes de daño en el DNA de las células para cada uno de los tratamientos, siendo las pruebas realizadas por triplicado.

Se evidencia un incremento lineal en el promedio de las unidades arbitrarias en función a la concentración de *Corryocactus brevistylus* utilizada. (Tabla N° 25 y Figura N° 27). El efecto genotóxico de los dos primeros tratamientos es casi el doble ( $25,00 \pm 12,92$ ) y el triple ( $38,33 \pm 10,60$ ) con respecto al control negativo ( $12,67 \pm 18,48$ ). Sin embargo, con el tratamiento que contenía la concentración más alta, se observa que el efecto genotóxico es casi similar al control positivo con peróxido de hidrógeno 150 umol, ( $70,30 \pm 7,55$  vs  $78,33 \pm 9,70$ ).

**TABLA N° 25.: Efecto del *Corryocactus brevistylus* en linfocitos de sangre periférica.**

Tratamiento	Porcentaje del daño en el DNA					Total (UA)
	No dañadas (≤ 5%)	Nivel Bajo Daño (5-25%)	Nivel Medio Daño (25-45%)	Nivel Alto Daño (45-70%)	Nivel Muy Alto Daño (≥70%)	
0,02%	28,33 ± 0,58	19,00 ± 1,00	2,00 ± 1,00	0,67 ± 0,58	0,00 ± 0,00	<b>25,00 ± 12,92</b>
0,20%	21,67 ± 2,08	21,33 ± 1,53	4,67 ± 1,53	1,67 ± 0,58	0,67 ± 0,58	<b>38,33 ± 10,60</b>
2%	9,30 ± 1,15	18,00 ± 2,00	17,30 ± 2,08	3,70 ± 2,08	1,70 ± 1,15	<b>70,30 ± 7,55</b>
150 umol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4,33 ± 3,21	19,00 ± 4,36	22,00 ± 1,00	3,33 ± 1,53	1,33 ± 0,58	<b>78,33 ± 9,70</b>
Control Negativo	43,00 ± 1,73	3,33 ± 0,57	2,00 ± 1,00	1,33 ± 0,58	0,33 ± 0,58	<b>12,67 ± 18,48</b>



**FIGURA N° 27.: Unidades arbitrarias de genotoxicidad registrada en linfocitos de sangre periférica para los diferentes tratamientos con *Corryocactus brevistylus*.**

Para el control negativo, los leucocitos aislados fueron colocados en medio RPMI y luego fueron incubados con PBS 1X a 37°C. *Noroozi M., et al., 1998*, utilizó linfocitos de sangre periférica, los cuales fueron aislados e incubados con PBS 1X por 30 min a 37 °C, obteniendo como resultado valores entre  $16,0 \pm 2,5$  y  $7,5 \pm 1,2$  unidades arbitrarias. <sup>61</sup>

El grupo de células que recibió el mayor daño genotóxico, fue el grupo tratado con peróxido de hidrógeno ( $UA = 78,33 \pm 9,70$ ), sin embargo, comparando dicho resultado con el obtenido por *Noroozi et al.*, el cual también utilizó peróxido de hidrógeno 100  $\mu\text{mol}$ , se vio que este último obtuvo un daño genotóxico 3 veces mayor ( $243,6 \pm 12,7$ ), para un conteo de 100 células por tratamiento. En las pruebas realizadas en el presente trabajo se realizó un conteo de 50 células por muestra, razón a la que se le puede atribuir la diferencia entre los resultados obtenidos. El conteo de 50 células por muestra también fue realizado en el trabajo de *Wiklund et al.*, 2002, en el cual utiliza 5 animales por grupo de estudio, además de que es mencionado por *Gupta C. R.* en su libro titulado *Veterinary Toxicology* en el cual lo sitúa como la mínima cantidad a ser considerada para realizar un conteo por muestra, ya sea de forma manual o a través de un software.<sup>98,33</sup>

A pesar de que existen diferentes genotoxinas para las estudios del ensayo cometa *in vitro*, como es el caso del benzopireno, la metil-nitro-nitro-nitroso-guanidina (MNNG) y los rayos X, los cuales otorgan buenos resultados en cuanto a controles positivos se refiere, el uso de peróxido de hidrógeno es uno de los más utilizados y citados, por diversos investigadores en el área como *Kaur et al.*, 2009, *Holz et al.*, 1995, *Singh et al.*, 1988, entre otros, en los estudios de genotoxicidad con linfocitos.<sup>38,45,41,83</sup>

- ***Análisis de acuerdo al porcentaje de ADN en la cola.***

Para la medición del porcentaje del DNA en cola se utilizaron las mismas imágenes observadas para las unidades arbitrarias. En la Tabla N° 26 se detallan los resultados obtenidos mediante el programa CaspLab, para los tratamientos con el extracto acuoso de *Corryocactus brevistylus*, y su correspondiente control negativo y positivo.

De acuerdo a los datos, se presentó una diferencia significativa entre los porcentajes de ADN en cola del control negativo y los tratamientos al 0,02%, 0,2% y al 2%. Además, se encontró que el tratamiento al 2%, posee un porcentaje promedio de ADN en cola que ronda entre 27,1752 y 22,7929 los cuales son muy cercanos a los valores obtenidos con el control positivo (entre 26,0933 y 25,7807). (Ver Tabla N° 26).

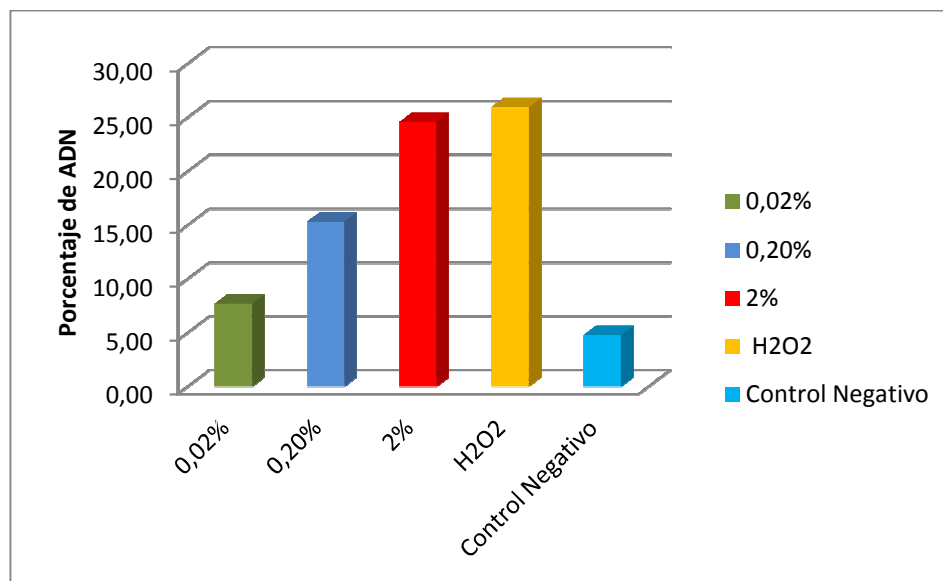
**TABLA N° 26. Porcentaje promedio de ADN en cola registrada en grupos de linfocitos de sangre periférica tratadas con diferentes concentraciones de *Corryocactus brevistylus* y su correspondiente control negativo y positivo.**

GRUPOS	TailDNA%			HeadDNA%			CometLength			TailLength		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
N° de ensayo por tratamiento												
<b>0,02%</b>	8,16	8,26	6,75	91,84	91,74	93,25	66,00	65,00	64,00	14,00	14,00	12,00
<b>0,20%</b>	17,06	13,95	14,97	82,94	86,05	85,03	77,00	74,00	75,00	30,00	25,00	26,00
<b>2%</b>	27,18	23,77	22,79	72,82	76,23	77,21	89,00	85,00	83,00	47,00	41,00	39,00
<b>Control Negativo</b>	5,08	5,15	4,17	94,92	94,85	95,83	63,00	60,00	62,00	10,00	7,00	7,00
<b>Control Positivo</b>	26,03	26,09	25,78	73,97	73,91	74,22	88,00	89,00	89,00	46,00	47,00	46,00

El efecto genotóxico de los tres tratamientos empleados muestra diferencias notables. El grupo control negativo, como se esperaba, no presenta efecto genotóxico ( $4,80 \pm 0,54$  y un nivel de daño = 0), mientras que el grupo tratado con peróxido de hidrogeno, control positivo, manifestó la mayor genotoxicidad ( $25,97 \pm 0,17$  y un nivel de daño = 2). Los tres grupos restantes, tratados con extractos acuosos crecientes de *Corryocactus brevistylus*, revelaron una dependencia directa del daño genético con el tratamiento administrado; sin embargo, a pesar del daño genético existe, este es considerado leve para las dos primeras dosis ( $7,72 \pm 0,85$  y  $15,32 \pm 1,59$  ambas con un nivel de daño = 1), siendo considerada únicamente el tercer tratamiento ( $24,58 \pm 2,30$  nivel de daño = 1) como genotóxico, igual que el control positivo ( $25,97 \pm 0,17$  nivel de daño = 2). En la Tabla N° 27 y la Figura N° 28 se muestra el porcentaje promedio global de los tres tratamientos con *Corryocactus brevistylus* y su correspondiente control negativo y positivo.

**TABLA N° 27.: Porcentaje de ADN en cola y nivel de daño registrados en linfocitos de sangre periférica de los tres tratamientos.**

Tratamiento	Promedio	Desviación Estándar	Nivel de Daño
0,02%	7,72	0,85	1
0,20%	15,32	1,59	1
2%	24,58	2,30	1
150 umol H2O2	25,97	0,17	2
Control Negativo	4,80	0,54	0



**FIGURA N° 28.: Porcentaje de ADN en cola registrada en linfocitos de sangre periférica expuesta a los tres tratamientos.**

La Tabla N° 28 muestra el análisis de varianza realizado en los promedio de DNA de cola para los tres tratamientos con *Corryocactus brevistylus* y los controles positivo y negativo. Se determinó que existen diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los 5 grupos, de acuerdo al valor F obtenido, 155,3919, y de acuerdo al valor de P, el cual fue mucho menor que el límite de 0,05, a un nivel de confianza del 95 %.

**TABLA N° 28.: Tabla ANOVA para los porcentajes de DNA en cola hallados en las concentración del 0,02%, 0,2% y 2%, y los controles positivo y negativo.**

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	P	F Teórico
Entre grupos	1100,6375	4	275,1594	155,3919	0,0000	3,4780
Dentro de los grupos	17,7074	10	1,7707	—	—	—
Total	1118,3450	14	—	—	—	—

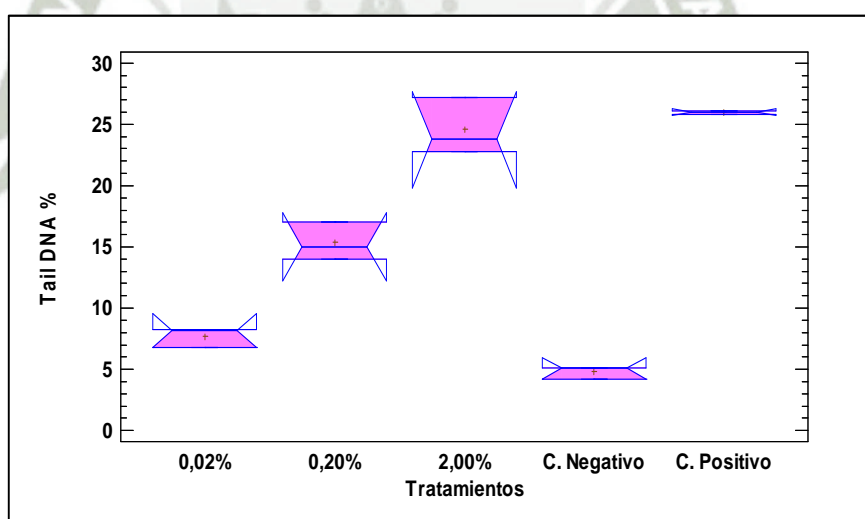
De acuerdo al resultado obtenido en el ANOVA (Tabla N° 28), se realizó un Test de Tukey en el cual se comparó las medias de cada tratamiento y se determinó cuales de ellas eran significativamente diferentes entre sí. En la Tabla N° 29 se observa que se han identificado tres grupos homogéneos para este test, en las cuales se muestra que

no existe diferencia estadísticamente significativa entre aquellos niveles que compartan un mismo grupo, como es el caso del control negativo y el tratamiento al 0,02%, además del tratamiento al 2% y el control positivo.

**TABLA N° 29.: Test de Tukey para la comparación de los tratamientos con *Corryocactus brevistylus* y los controles negativo y positivo.**

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C. Negativo	3	4,7986	A
0,02%	3	7,7227	A
0,20%	3	15,3239	B
2,00%	3	24,5788	C
C. Positivo	3	25,9678	C

Los resultados obtenidos pueden ser evidenciados la Figura N° 29 a través de un gráfico de caja y bigotes elaborado con el software Statgraphics, en donde se aprecian los promedios y la mediana de los porcentajes de DNA en cola (Tail DNA %) de cada tratamiento.



**FIGURA N° 29.: Gráfico de caja y bigotes para el porcentaje de ADN en cola registrada en linfocitos de sangre periférica expuesta a los tres tratamientos.**

Existen números trabajos en los cuales se representa los resultados obtenidos en el ensayo cometa a través del porcentaje de DNA entre los cuales podemos mencionar al trabajo de *Vela R.*, en el que se determina el potencial genotóxico de las nanopartículas de plata por diversos estudios incluido el ensayo cometa, en el cual se expresa sus resultados de acuerdo al % de DNA presente en la cola de los

cometas analizados para las diversas concentraciones de su muestra y los controles positivo y negativo.<sup>93</sup>

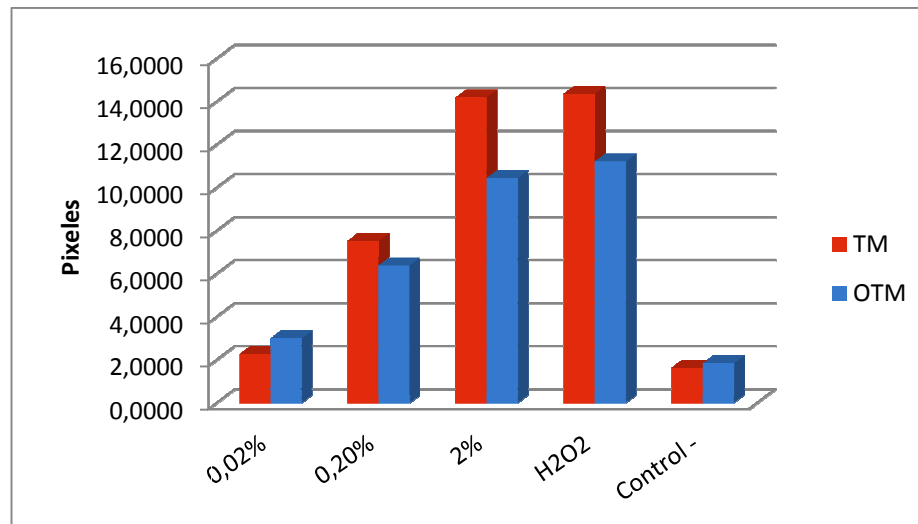
- *Análisis de acuerdo al valor obtenido en el momento de cola (TM) y momento de cola Olive (OTM)*

Se realizó la medición del momento de cola (TM) y el momento de cola Olive (OTM) para los cometas de cada tratamiento con el software CaspLab y se analizó la relación existente entre ellos con respecto a cada tratamiento. (Ver Tabla N° 30).

Se realizó la comparación del efecto genotóxico del extracto acuoso de *Corryocactus brevistylus* al 0,02%, 0,2% y 2% y su correspondiente control positivo y negativo. En el gráfico de la Figura N° 30 se puede apreciar la relación existente entre los resultados obtenidos en el momento de cola (Tail Moment - TM) y el momento de cola Olive (Olive Tail Moment - OTM) para los tres tratamientos con sancayo.

**TABLA N° 30.: Promedios globales del momento de cola (TM) y momento de cola Olive (OTM) registradas en los cometas analizados por el software CaspLab.**

GRUPOS	Tail Moment - TM				Olive Tail Moment - OTM			
	1	2	3	Promedio	1	2	3	Promedio
N° de ensayo por tratamiento								
0,02%	2,13	2,55	2,14	2,27 ± 0,24	3,02	3,47	2,53	3,01 ± 0,47
0,20%	8,82	6,98	6,80	7,53 ± 1,12	7,18	5,65	6,32	6,38 ± 0,76
2%	18,52	12,64	11,43	14,20 ± 3,80	11,44	10,20	9,71	10,45 ± 0,89
Control Negativo	2,40	1,14	1,40	1,65 ± 0,66	2,12	1,88	1,55	1,85 ± 0,29
H2O2, 150 umol	15,74	13,61	13,78	14,37 ± 1,18	11,30	11,23	11,13	11,22 ± 0,08



**FIGURA N° 30.: Efecto genotóxico del extracto acuoso de *Corryocactus brevistylus* al 0,02%, 0,2% y 2% en células mononucleares mediante el momento de cola (TM) y momento de cola Olive (OTM).**

Los valores de TM son mayores que los valores obtenidos en OTM para los grupos que obtuvieron los valores más altos en los tratamientos, como al 0,2%, 2% y el control positivo, mientras que para los que obtuvieron valores bajos, como 0,02% y el control negativo, poseen valores de OTM ligeramente mayores que los valores de TM.

**TABLA N° 31.: Tabla ANOVA para los tratamientos al 0,02%, 0,2% y 2%, y sus controles positivo y negativo usando el momento de cola (TM) hallados con el software CaspLab.**

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	P	F Teórico
Entre grupos	457,2343	4	114,3086	32,5444	0,0000	3,4780
Dentro de los grupos	35,1239	10	3,5124	-	-	-
Total	492,3582	14	-	-	-	-

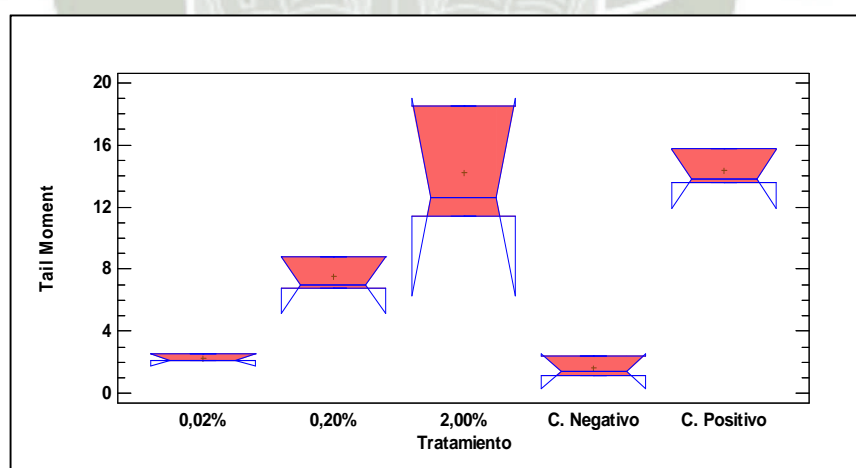
En la Tabla N° 31, se observa el análisis de varianza (ANOVA) entre los promedios de momento de cola (TM) de los tres tratamientos y los controles negativo y positivo. En dicha tabla se puede ver que existe diferencia significativa en por lo menos una de la media de los cinco grupos, de acuerdo al análisis del valor F, el cual es menor que el F teórico y el valor de P que es menor que el límite 0,05, a un nivel de confianza del 95%.

Se realizó una comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras a través del Test Tukey. Se identificaron tres grupos homogéneos, entre los tratamientos que la componen, pero con diferencias estadísticamente significativas entre ellos, como se aprecia en la Tabla N° 32. Estos están formados por: el control negativo y el tratamiento al 0,02% perteneciente al grupo A, el tratamiento al 2% y el control positivo (peróxido de hidrogeno a 100 umol) perteneciente al grupo C, y por último el tratamiento al 0,2%, perteneciente al grupo B.

**TABLA N° 32.: Test de Tukey para los tratamientos al 0,02%, 0,2% y 2%, y sus controles positivo y negativo de acuerdo a las medias del momento de cola (TM) hallados con el software CaspLab.**

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C. Negativo	3	1,647	A
0,02%	3	2,2717	A
0,20%	3	7,5346	B
2,00%	3	14,195	C
C. Positivo	3	14,375	C

En el gráfico de la Figura N° 31 se muestra la distribución de las medias de los valores obtenidos para el momento de cola (TM) entre el tratamiento al 0,02%, 0,2% y al 2% y los controles positivo y negativo, a través de un gráfico de caja y bigotes elaborado con el software Statgraphics.



**FIGURA N° 31.: Gráfico de caja y bigotes para las medias del momento de cola (Tail Moment) obtenidos en los tratamientos al 0,02%, 0,2% y 2% además de los controles negativo y positivo.**

Así mismo se hizo un análisis de varianza para los valores de OTM de los cometas analizados con el software CaspLab para los 5 tratamientos (Ver Tabla N° 33). Se demuestra que hay diferencia estadísticamente significativa entre al menos una de las medias de los 5 tratamientos analizados de acuerdo al valor-P hallado, el cual es menor al 0,05, y al valor de F, el cual muestra ser mayor que el F teórico con un nivel de confianza del 95%.

**TABLA N° 33: Tabla ANOVA para los tratamientos al 0,02%, 0,2% y 2%, y sus controles positivo y negativo usando el momento de cola olive (OTM) hallados con el software CaspLab.**

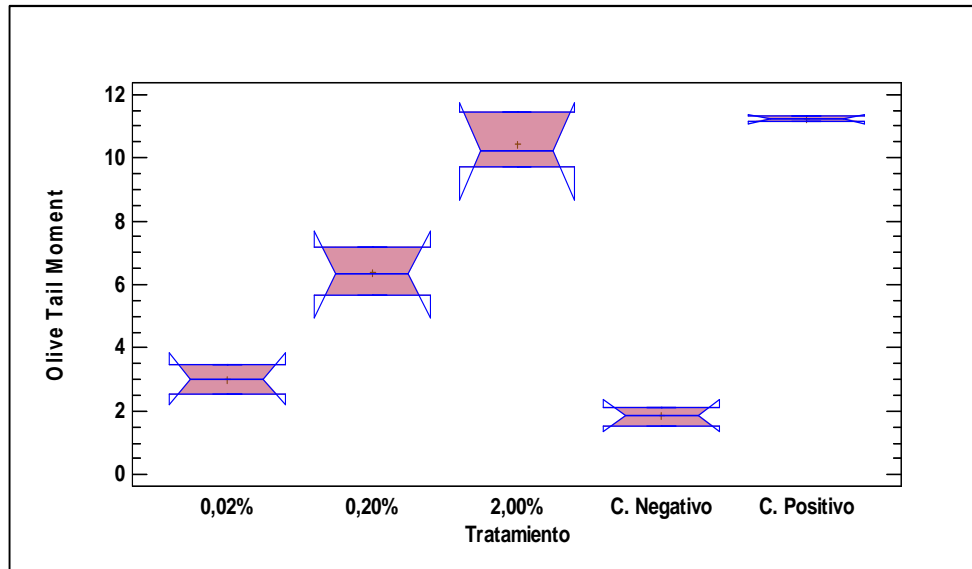
Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	P	F Teórico
Entre grupos	215,0351	4	53,7588	159,5011	0,0000	3,4780
Dentro de los grupos	3,3704	10	0,3370	—	—	—
Total	218,4055	14	—	—	—	—

En la Tabla N° 34 se observa el Test de Tukey realizado con las medias de los valores obtenidos para el momento de cola olive (OTM) de los 5 tratamientos. Al igual que las medias correspondientes al momento de cola (TM) de los mismos tratamientos, se identificó tres grupos homogéneos los cuales no muestran diferencia estadísticamente significativa entre los que la componen, pero sí entre otros grupos.

**TABLA N° 34.: Test de Tukey para los tratamientos al 0,02%, 0,2% y 2%, y sus controles positivo y negativo de acuerdo a las medias del momento de cola Olive (OTM) hallados con el software CaspLab.**

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C. Negativo	3	1,8486	A
0,02%	3	3,0066	A
0,20%	3	6,3838	B
2,00%	3	10,4487	C
C. Positivo	3	11,2188	C

En el gráfico de la Figura N° 32 se muestra la distribución de las medias de los valores obtenidos para el momento de cola olive (OTM) entre el tratamiento al 0,02%, 0,2% y al 2% y los controles positivo y negativo, a través de un gráfico de caja y bigotes elaborado con el software Statgraphics.

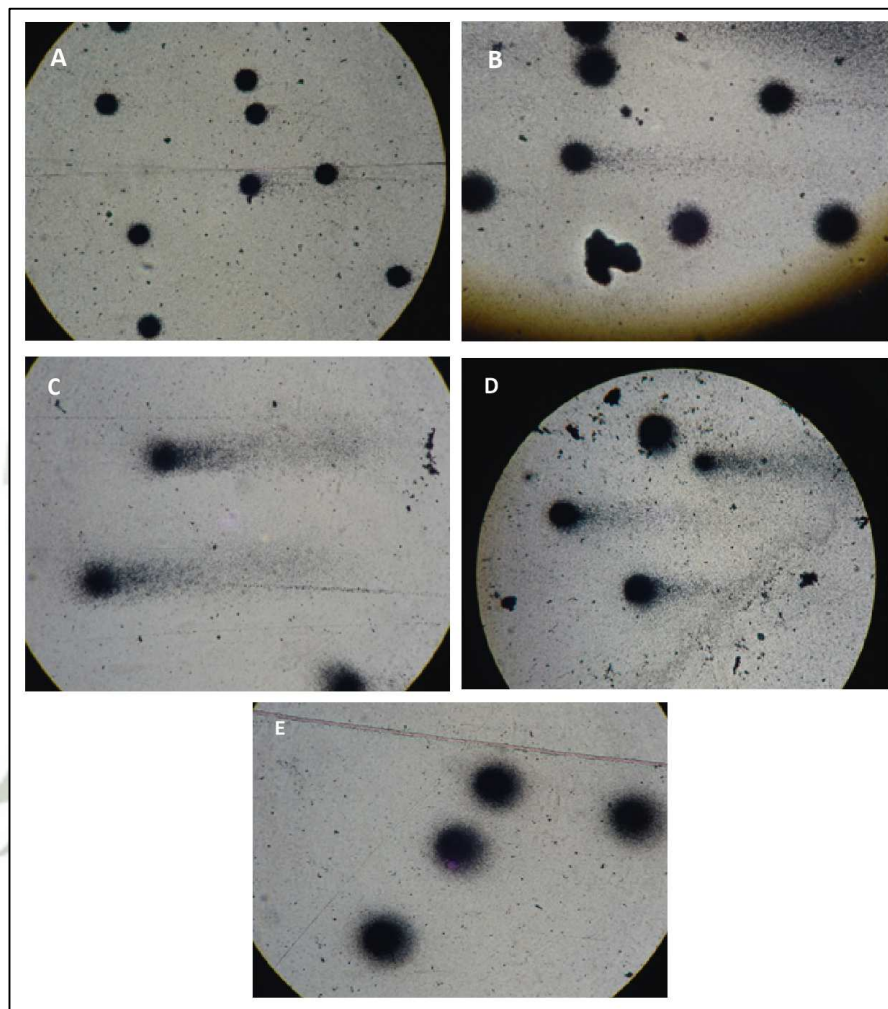


**FIGURA N° 32.: Gráfico de caja y bigotes para las medias del momento de cola Olive (Olive Tail Moment) obtenidos en los tratamientos al 0,02%, 0,2% y 2% además de los controles negativo y positivo.**

Al igual que el gráfico de la Figura N° 31, se observa en la Figura N° 32 que a un mayor valor del momento de cola Olive (OTM), y por ende también un mayor valor de momento de cola (TM), existirá una mayor genotoxicidad por parte del extracto de *Corryocactus brevistylus* sobre los grupos de linfocitos a las cuales fueron expuestas. En el gráfico también se observa que se necesita de una concentración del 2% de extracto acuoso de sancayo para producir un daño genotóxico similar al del peróxido de hidrógeno 100  $\mu\text{mol}$ , al contrario del extracto al 0,02% el cual no produce daño genotóxico y muestra una gran aproximación al control negativo, el cual está formado por el medio RPMI y PBS 1X.

En el presente trabajo, se mostró que existe una relación entre los resultados obtenidos con los tres tipos de análisis efectuados para el ensayo cometa. Los resultados obtenidos mostraron ser proporcionales entre sí, algo muy parecido al trabajo realizado por Arif *et al.*, 2008, en el cual luego de un estudio de genotoxicidad del plomo en glóbulos blancos de ratas, se observó proporcionalidad entre sus resultados expresados por medio de los valores obtenidos en el momento de cola Olive (Olive Tail Moment), el porcentaje de DNA en cola, longitud del cometa, y longitud de la cola de los cometas medidas por grupo tratado. El autor expresa que ante un mayor valor en el OTM de las muestras, existe una mayor genotoxicidad por parte de la muestra utilizada.<sup>9</sup>

El ensayo cometa es un método simple, sensible y rápido que puede ser utilizado para estimar el daño en el DNA en células individuales a través de la ruptura de hebras, sitios de reparación abierta, enlaces cruzados y sitios álcali lábiles causados por el estrés oxidativo.<sup>89</sup>



**FIGURA N° 33.: Comparación del efecto genotóxico del extracto acuoso de *Corryocactus brevistylus* (sancayo), donde: A: 0,02%, B: 0,2%, C: 2%, D: Control positivo, E: Control negativo.**

En este estudio se encontró que los linfocitos de sangre periférica del grupo control negativo, tenían fuertemente comprimido el DNA y mantuvieron la forma circular del núcleo normal con poca o ninguna evidencia de formación de cometas (Figura N° 33 E). En contraste, las células tratadas con las diferentes concentraciones de *Corryocactus brevistylus*, en especial la concentración al 2% y el control positivo con peróxido de hidrógeno, aparecen alterados en apariencia (Figura N° 33 B-D). La base de esta apariencia alterada se debe a que durante el desenrollamiento alcalino (a pH 13.0) el ADN bicatenario superenrollado es desenrollado y

desnaturalizado. Como resultado, la doble cadena de ADN se convierte en una cadena simple y relajada donde los fragmentos de DNA (con carga negativa) la hacen migrar hacia el ánodo dejando el DNA intacto en la región de la cabeza. Si el núcleo contiene ADN más dañado, una gran cantidad de los trozos de DNA (que son pequeñas en comparación a la molécula intacta de ADN) migraran a la región de la cola. De esa manera los cometas se formaran como es evidente en la Figura N° 33, en donde la intensidad de la cola del cometa respecto a la cabeza, refleja el número de rupturas en el ADN. Las células que contienen un mayor nivel de roturas de ADN generan cometas con mayor intensidad en las “colas”.<sup>9</sup>

### 3.4.3 INFLUENCIA DEL ÁCIDO ASCÓRBICO Y POLIFENOLES TOTALES EN LA GENOTOXICIDAD DEL *Corryocactus brevistylus*.

Los resultados obtenidos en genotoxicidad sugieren que los tratamientos con *Corryocactus brevistylus*, en especial los tratamientos al 0,2% y 2%, están asociados con el efecto pro oxidante del ácido ascórbico presente en las muestras. Como ejemplo tenemos el trabajo realizado por *Szeto et al.*, 2006, en cuyo estudio sobre el efecto de diferentes frutas y vegetales en el DNA de linfocitos humanos, no encontró protección conferida por las frutas y vegetales utilizadas en el estudio, entre los cuales se encontraba el limón, brócoli, naranja, fresa entre otros, por lo que se le consideró perjudicial para el estudio a los que consideraron como un efecto pro oxidante debido a que las altas concentraciones contrapesan a su poder protector.<sup>88</sup>

Se puede aludir entonces que las altas concentraciones del extracto con *Corryocactus brevistylus*, 2%, otorgan genotoxicidad en el grupo de células mononucleares con las que se trató, como se aprecia en los diversos gráficos de caja y bigotes de los análisis visuales efectuados. En otros trabajos, como los citados por *Green et al.*, 1994, y *Shi M. et al.*, 2005, se encontró un efecto pro oxidante en ensayos *in vitro* con linfocitos y ácido ascórbico, usando como método el ensayo cometa, y también en pruebas realizadas con *Prevotella melaninogenica*, bacteria gram negativa anaerobia, en la que se encontró un efecto pro oxidante y antioxidante de la vitamina C.<sup>30,80</sup>

La formación de compuestos prooxidantes en frutos ha sido vista también en la especie *Myrciaria dubia* (camu camu), cuando es administrada en altas dosis, especialmente cuando está en presencia de elevadas cantidades de metales de transición, generando radicales hidroxilo.<sup>31</sup> De la misma forma en la especie *Psidium guajava L.* (guayaba) se observó que este fruto posee propiedades pro oxidantes en las variedades verde y amarilla en las que se sugiere que probablemente el ascorbato, constituyente importante de la guayaba, participe

directamente en las reacciones que generan radicales hidroxilo, lo que se ha evidenciado por los resultados obtenidos en su estudio.<sup>65</sup>

Otros trabajos como el de *Péres T.*, han demostrado que, además que el ácido ascórbico, los flavonoides también confieren propiedades prooxidantes causando mutagenicidad y genotoxicidad en sistemas experimentales bacterianos como mamíferos, esto debido a algunos mecanismos a través de los cuales los flavonoides ejercen sus acciones prooxidantes como la reducción de Cu (II) a Cu (I), la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs), etc.<sup>67</sup>



## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES

**Primera:** Se concluyó que el contenido de ácido ascórbico encontrado en el fruto de *Corryocactus brevistylus* “Sancayo”, por el método voltamétrico, es de una cantidad considerable a comparación de otros frutos con antecedentes de poseer ácido ascórbico, como la naranja y el limón, a excepción del camu camu.

**Segunda:** Luego de la cuantificación de polifenoles totales, utilizando el método de Follin- Ciocalteu, se determinó que la muestra de *Corryocactus brevistylus* posee una cantidad importante de polifenoles, pero que comparada con la misma especie originaria de Ayacucho, esta última posee una mayor cantidad de polifenoles que la perteneciente a la localidad de Caylloma, Arequipa. Comparando la cantidad existente con otras especies, como: la mandarina, manzana o ciruela, se encontró que el sancayo posee mayores niveles de polifenoles totales, pero menores que el fruto camu camu.

**Tercera:** Al evaluar la actividad antioxidante de los frutos de *Corryocactus brevistylus* se concluye que se obtiene un mayor valor por equivalente de Trolox (TEAC) y un menor coeficiente de variabilidad utilizando el método ABTS, considerándosele como el método más recomendado para la determinación de actividad antioxidante. La influencia a la actividad antioxidante del sancayo se le atribuye en su mayoría al contenido de polifenoles totales presentes en la muestra por la influencia del mismo como antioxidante y por su cantidad encontrada en el fruto.

**Cuarta:** Se evaluó el efecto genotóxico del extracto acuoso de sancayo por medio del ensayo cometa en linfocitos de sangre periférica, concluyéndose que los extractos al 0,02% y 0,2% no causan lesión al DNA en linfocitos, en comparación del extracto al 2% considerándosele medianamente genotóxico. La influencia de la genotoxicidad del *Corryocactus brevistylus*, se infiere que puede ser atribuida al ácido ascórbico presente en la muestra, el cual tiene efectos prooxidantes a ciertas condiciones.

## RECOMENDACIONES

- Realizar más pruebas para la determinación de la actividad antioxidante del *Corryocactus brevistylus* utilizando otras variedades del fruto las cuales aun no ha sido estudiadas.
- Realizar las pruebas de ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante con extractos de sancayo preparados y almacenados en un mismo lapso de tiempo para los diferentes métodos, de esa manera se tendrán resultados más verídicos con un proceso sistemático de medición.
- Preparar los reactivos de DPPH, ABTS, Neocuproína (CUPRAC) y Trolox el mismo día del ensayo y seguir usándolos por un período máximo de 2 días. Pasado dicho lapso los reactivos tienden a degradarse y dar resultados no fiables.
- Se recomienda preparar los extractos de *Corryocactus brevistylus* para las pruebas de genotoxicidad el mismo día de realizarse la prueba, para evitar la degradación de los componentes de la muestra.
- Es importante considerar el uso de otras técnicas de coloración, para el teñido de los cometas. El teñido con otras tinciones, como DAPI, yoduro de propidio (PI), y tinciones fluorescentes como SybrGold, y SybrGreen, permiten obtener cometas los cuales pueden ser fácilmente analizados por los diversos software de libre acceso por internet, aunque su viabilidad visual es de un tiempo más corto.
- Se recomienda estandarizar la técnica del ensayo cometa antes de desarrollar el análisis de una muestra o un estudio relacionado con genotoxicidad. Uno de los mayores problemas a tener en cuenta es, mantener los geles de agarosa fijos en el portaobjetos para evitar dañar el gel y con él la muestra a analizar.

## REFERENCIAS

1. **ALOK D., MAHIMA B., ALOK K. P., DEVENDRA P.** “Protocol for the Single Cell Gel electrophoresis / Comet assay for rapid genotoxicity assessment”. Developmental Toxicology Division. Industrial Toxicology Research Centre. U.P., India
2. **ALVIS R., PINO J., GONZÁLES J., FRANCIA J., Y BETTY S.** “Efecto citoprotector del camu-camu *Myrciaria dubia* en tres líneas celulares de ratón expuestos in vivo a bromato de potasio”. Revista Perú. biol. 17(3): 389 – 392. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. Lima, Perú. 2010.
3. **AMES B. N.** “Food Constituents as a Source of Mutagens, Carcinogens, and Anticarcinogens.” In: Genetic Toxicology of the Diet, I. Knudsen, ed. (Alan R. Liss, Inc., New York, NY), pp. 3-32. (1986).
4. **AMES B. N., SHIGENAGA M. K., HAGEN T. M.,** “Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging.” Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 90, 7915- 7922. 1993.
5. **ANDERSON EDWARD F.** “The Cactus Family”. Timber Press, Inc. Portland, Oregon. U.S.A., 2001.
6. **ANTOLOVICH M., PRENZLER P.D., PATSALIDES E., MCDONALD S., ROBARDS K.** “Methods for testing antioxidant activity.” Analyst 2002; 127: 183-198.
7. **APAK R., GÜÇLÜ K., ÖZYÜREK M., TÜTEM E., BAŞKAN K. S., ERÇAĞ E., ÇELİK E. S., BAKI S., YILDIZ L., KARAMAN S.** “A comprehensive review of CUPRAC methodology”. Anal. Methods, 3, 2439-2453. 2011.
8. **APAK R., GÜÇLÜ K., OZYÜREK M., KARADEMİR S. E.** “Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method.” J Agric Food Chem. Dec 29;52(26):7970-81. 2004.
9. **ARIF M., KABIR Y., HASSAN F., ZAVED W., HOQUE M. E., RAHMAN S.** “Increased DNA damage in blood cells of rat treated with lead as assessed by comet assay.” Bangladesh J Pharmacol 2008; 3: 97-101.

10. **ASHWELL M.** “Conceptos sobre alimentos funcionales”. ILSI Press Europe. International Life Sciences Institute. 2002
11. **BALSANO C, ALISI A.** “Antioxidant effects of natural bioactive compounds.” *Curr. Pharm Des.*; 15(26):3063-73. 2009.
12. **BLAINSKI A., LOPES G. C., AND PALAZZO DE MELLO J. C.** “Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense L.*”. *Molecules*,18, 6852-6865, 2013.
13. **BRAKO L., ZARUCCHI J. L.** “Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru”. *Monog. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 45: i–xl, 1–1286. 1993
14. **BRITTON N. L. ROSE J. N..** “Cactaceae 2: 1–241”. The Carnegie Institution of Washington. Washington, D.C. 1920.
15. **CÁCERES F., GARCÍA A., PONCE E., Y ANDRADE R.** “El Sancayo”. *Corryocactus brevistylus (Schumann ex vaupel) Britton y Rose.* *Revista Quepo (14):* 24-27. 2000
16. **CAMPOS D. Y COL.** “Bioquímica del Estrés Oxidativo”. Lulu.com, 2010.
17. **CLAYSON, D.B. Y GRANT, D.L.** “The assessment of mutagenicity. Health protection branch mutagenicity guidelines”. *Enviromental and Molecular Mutagenesis: Vol. 21:*15-37. 1992.
18. **COIRINI H.** “Toxicidad del Oxígeno y Radicales Libres”. Argentina.
19. **COLLINS A. R.** “The Comet Assay for Damage and Repair. Principles. *Molecular. Biotechnical,* 26: 249-26. 2004”
20. **COLLINS A. R., DUSINSKA A., FRANKLIN M., SOMOROVSKA M., PETROVSKA H., DUTHIE S., FILLION L., PANAYPOTIDIS M., RASLOVA K., VAUGHAN N.** “Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications.” *Mutagen* 30:139-146. 1997.
21. **COLLINS A. R., MA A. G., DUTHIE S. J.** “The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells”. *Mutat Res.* 336:69-77. 1995.

22. **CORTINAS, N.C. Y AGUIRRE, E.J.** “Cáncer y ambiente, bases epidemiológicas para su investigación y control”. Modulo Carcinogénesis. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Programa de Salud Ambiental, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de La Salud. México. 33-43. 1990.
  
23. **COTTELE N, J L BERNIER, J P CATTEAU, P POMMERY, J C WALLET, E M GAYDOU** (1996) “Antioxidants properties of hydroxyl-flavones.” Free Radical Biol. Med. 20:35-43.
  
24. **DABROWSKA CRIADO C., MOYA MIR M.** “Vitaminas y antioxidantes”. Saned y ediciones S.L, 2009
  
25. **ELHAJOUJI A., SANTOS A. P., VAN HUMMELEN P., KIRSCH-VOLDER M.** “Metabolic differences between whole blood and lymphocytes cultures micronucleus (MN) induction by cyclophosphamide and ben[ $\alpha$ ]pyrene.” Mutagenesis, 9:307-313. 1994.
  
26. **ESCAMILLA JIMÉNEZ C.I, CUEVAS MARTÍNEZ E.Y, GUEVARA FONSECA J.** “Flavonoides y sus acciones antioxidantes”. Vol. 22 N° 2, México, Marzo-Abril, 2009, pág. 73-75.
  
27. **FORMAN H. J., TORRES M.** “Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling.” Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166, S4-8. 2002.
  
28. **GOBIERNO REGIONAL DE HUANCAMELICA.** “Recuperación del Sector Ambiental a través de la especie *Corryocactus brevistylus* (Sanky) en las provincias de Castovirreyna y Huaytara, región Huancavelica” Proyecto de Inversión Pública.
  
29. **GÓMEZ CARAVACA, A.; GÓMEZ ROMERO, M.; MARRAEZ ROMÁN, D.; SEGURA CARRETERO, A. Y FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, A.** “Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41: p. 1220-1234. 2006.
  
30. **GREEN M. H., LOWE J. E., WAUGH A. P., ALDRIDGE K. E., COLE J., ARLETT C. F.** “Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells.” Mutat. Res.,316, 91–102 (1994).

31. **GUIJA E., TRONCOSO L.** “Radicales libres y envejecimiento.” *Bol Soc Quim Perú.* 2000;46:33-55.
32. **GUISADO R., GUISADO B., BORDES GONZÁLEZ, GARCÍA MORALES MC, FERNÁNDEZ T.,** “Oxidación y producción de radicales libres.” Universidad de Granada.
33. **GUPTA C. R.** “Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles”. Academic Press. 1454 p. Elsevier Inc. Chennai, India.
34. **GUTIERREZ DE AGUAS R.,** “Técnicas para la evaluación genotóxica en organismos expuestos a contaminantes ambientales”. Congreso Nacional de Ciencias Biológicas de la universidad del Norte, Colombia, 2007.
35. **HALLIWELL B.** “Oxidative stress and neurodegeneration; where are we now?” *Journal of Neurochem.* 97, 1634-1658. 2006.
36. **HALLIWELL B. AND WHITEMA M.** “Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?” *British Journal of Pharmacology* 142, 231–255. 2004.
37. **HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. M. C.** “The definition and measurement of antioxidants in biological systems.” *Free Radic Biol Med* 18(1), 125-126. 1995.
38. **HENDERSON L., WOLFREYS A., FEDYK J., BOURNER C., WINDEBANK S.** “The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins.” *Mutagenesis* vol.13 no. 1 pp.89-94, 1998.
39. **HERNÁNDEZ-GUEVARA Y COL.,** “Electroforesis unicelular (Ensayo Cometa) como Bioindicador de Antigenotoxicidad inducida por *Amphipterygium Adstringens*”. 2º Congreso Nacional de Química Médica.
40. **HOFFMANN A., WALTER H.** “Cactáceas en la flora silvestre de Chile”. Segunda edición. Ediciones Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile. 2004
41. **HOLZ O., JORRES R., KASTNER A., MAGNUSSEN H.** “Differences in basal and induced DNA single-strand breaks between human peripheral monocytes and lymphocytes.” *Mutat. Res.,* 332, 55-62, 1995.

- 42. HUANG D., OU B., PRIOR R.L.** “The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53: 1841–1856. 2005.
- 43. INTERNATIONAL FOOD INFORMATION COUNCIL FOUNDATION.** Potassium and heart health . 2011
- 44. KASAI H., OKADA Y., NISHIMURA S., RAO M. S., REDDY J. K.** “Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following long-term exposure to a peroxisome proliferator.” *Cancer Res.* 49, 2603–2605. (1989).
- 45. KAUR P., WALIA A., KUMAR S., KAUR S.** “Antigenotoxic Activity of Polyphenolic Rich Extracts from *Aegle marmelos* (L.) Correa in Human Blood Lymphocytes and *E. coli* PQ 37.” *Rec. Nat. Prod.* 3:1 (2009) 68-75.
- 46. KUSKOSKI E., ASUERO A., TRONCOSO A. MANCINI F., FETT R.,** “Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos.” *Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 25(4): 726-732, out.-dez. 2005.
- 47. LEE J. W., KOO N., MIN D. B.** “Reactive oxygen especies, aging, and antioxidative nutraceuticals.” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 3:21-33. 2004
- 48. LI H., WANG X., LI P., LI Y., WANG H.** “Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods.” *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 16, N°. 6. 2008.
- 49. LIAO W., MCNUTT M. A., ZHU W. G.** “The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells.” *Methods*, 48: 46-53.
- 50. LOBO V., PATIL A., PHATAK A., AND CHANDRA N.** “Free radicals, antioxidants and functional food: Impact on human health”. *Pharmacogn Rev.* 4(8): 118–126, 2010.
- 51. MAGALHAES L. M., SEGUNDO M. A., REIS S., LIMA J. L.** “Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties.” *Anal Chim Acta* 613, 1-19. 2008.
- 52. MALDONADO SAAVEDRA O., JIMÉNEZ VÁZQUEZ E., BERNABÉ GUAPILLO M., CEBALLOS REYES G., MÉNDEZ BOLAINA E.**

- “Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas”. .  
Rev Med UV, Julio – Diciembre. Facultad de Ciencias Químicas,  
Universidad Veracruzana. México. 2010.
- 53. MARTÍNEZ-FLÓREZ S., GONZÁLEZ-GALLEGO J., CULEBRAS J. M. TUÑÓN M. J..** “Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes.”  
Nutr. Hosp. XVII (6) 271-278. 2002.
- 54. MATOS C. A., PAREDES G. L., GONZALES R. L.,** “Determinación de la  
Capacidad Antioxidante de los Compuestos Fenólicos del Sancayo  
(*Corryocactus brevistylus*).” Rev. Investig. Cienci. Tecnol. Aliment. Vol. 1,  
Nº 1, 2010.
- 55. MEDINA J., MORENO-OTERO R.** “Pathophysiological basis for  
antioxidant therapy in chronic liver disease.” *Drugs* 2005; 65 (17):2445–61.  
2005.
- 56. MONTALVO P.** “Evaluación de las Propiedades Antioxidantes de Extractos  
de Pápalo (*Porophyllum Ruderale*), Huazontle (*Chenopodiaceae  
Cheopodium*) y Guaje Rojo (*Leucaena Esculenta*).” Universidad de las  
Américas, Puebla. 2006.
- 57. MONTERO E.** “Los radicales libres y las defensas antioxidantes.” *An  
FacMed (Perú)* (1996); 57 (4):278- 81. 1996.
- 58. MRUK, D. D., SILVESTRINI B., ET AL.** “Antioxidant superoxide  
dismutase a review: its function, regulation in the testis, and role in male  
fertility.” *Contraception* 65(4): 305-11. 2002.
- 59. MURLEY J. S., KATAOKA Y., HALLAHAN D. E., ROBERTS J. C.,  
GRDINA D. J.** “Activation of NFkB and MnSOD gene expression by free  
radical scavenger in human microvascular endothelial cells.” *Free Radic Biol  
Med* 2001; 30 (12): 1426-39. 2001.
- 60. NANDHAKUMAR S., PARASURAMAN S., SHANMUGAM K.,  
RAMACHANDRA R., PARKASH C., VISHNU B.** “Evaluation of DNA  
damage using single-cells gel electrophoresis (Comet assay)”. *J Pharmacol  
Pharmacother.* 2011 Apr-Jun; 2(2): 107–111.
- 61. NOROOZI M., ANGERSON W. J., EJ LEAN M.** “Effects of flavonoids  
and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes”. *Am J  
Clin Nutr* 1998; 67:1210–8.

- 62. NUR A. M., JAHAN B. N., RAFIQUZZAMAN M.** “Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity.” *Saudi Pharmaceutical Journal*; 21: 143-152. 2012.
- 63. OLIVE P. L., BANÁTH J. P., DURAND R. E.** “Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay”. *Radiat Res.*, 22:86-94. 1990.
- 64. OSTOLAZA NANO, C.** “101 Cactus del Perú”. Edición Ministerio del Ambiente. Pag. 96. 253. Perú. 2011.
- 65. PALOMINO P. M.** “Propiedades antioxidantes y prooxidantes de *Psidium guajava* L. “guayaba”.” Tesis para optar el grado en Magister en Bormatología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú. 2006.
- 66. PEREZ J., SAURA F.** “Metodología para la evaluación de Capacidad Antioxidante en frutas y hortalizas”. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. Instituto del Frio, CSIC. Madrid, España. 2007.
- 67. PÉREZ TRUEBA G.** “Los Flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes.” *Rev. Cubana Invest Biomed* 2003;22(1):48-57.
- 68. PINTO BAHAMONDE R., KIRBERG BENAVIDES A.** “Cactus del extremo norte de Chile”. Edit. Raquel Pinto Bahamonde, 2009.
- 69. POLI G., PAROLA M.** “Oxidative damage and fibrogenesis.” *Free Radical Biology & Medicine* 1997; 22 (1-2):287–305. 1997.
- 70. POWERS S, LENNON S.** “Analysis of cellular responses to free radicals: focus o exercise and skeletal muscle. *Proceed Nutr Soc* (1999); 58:1025-1033. 1999.
- 71. PREEDY V. R.** “Processing and Impact on Antioxidants in Beverages.” Editorial Elsevier. Inc. Oxford. UK. 2014.
- 72. PRINSZE C., DUBBELMAN T., VANSTEVENICK J.** “Protein damage, induced by small amounts of photodynamically generated singlet oxygen or hydroxyl radicals.” *Biochim Bhiophys Acta* 1990; 1038: 152-7. 1990.

- 73. RAMIREZ TORTOSA M.C., QUILES MORALES J. L.** “Tratado de Nutrición. TOMO 1: Vitamina C, vitamina E y otros antioxidantes de origen alimentario”. Editorial Acción Médica. Junio 2005.
- 74. REPO CARRASCO R., ENCINA ZELADA C. R.** “Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas.” Rev. Soc. Quím. Perú v.74 N°2. Lima. 2008.
- 75. RICE-EVANS C. A., MILLER N. J. AND PAPAGANDA G.** “Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids”. Free Radical Biol. Med., 20, 933-956, 1996.
- 76. RIGONATO J., MANTOVANI M. S., JORDÃO B. Q.** “Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity”. Genet. Mol. Biol. vol.28 no.3 São Paulo July/Sept. 2005.
- 77. ROBARDS K., PRENZLER P. D., TUCKER G., SWATSITANG P., GLOVER W.** “Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits.” Food Chem 1999;66:401-36. 1999.
- 78. ROJAS BARQUERA D., NARVÁEZ CUENCA C. E.** “Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas en Colombia.” Quím. Nova vol.32 N°9. São Paulo. 2009.
- 79. SASAKI Y.** “Does oxidative stress participate in the development of hepatocellular carcinoma.” Journal of Gastroenterology 2006; 41 (12):1135–48. 2006.
- 80. SHI M., XU B., AZAKAMI K., MORIKAWA T., WATANABE K., MORIMOTO K., KOMATSU M., AOYAMA K., AND TAKEUCHI T.** “Dual role of vitamin C in an oxygensensitive system: discrepancy between DNA damage and cell death.” Free Radic. Res.,39, 213–220 (2005).
- 81. SIES H.** “Oxidative stress: introduction remarks”. In: Sies H, Editor Oxidative stress. London: Academic Press; p 1-8. 1985.
- 82. SINGH N. P., KHAN A.** “Acetaldehyde genotoxicity and cytotoxicity in human lymphocytes”. Mutat Res, 337: 9-17. 1995.

- 83. SINGH N. P., MCCOY M. T., TICE R. R., SCHNEIDER E. L.** “A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.” *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191. 1988.
- 84. SINGH N. P., STEPHENS R. E., SCHNEIDER E. L.** “Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int J Radiat Biol*, 66:23-28. 1994.
- 85. SORIA M., G., AGUILAR H. C. Y LLANCARI O., A.** “Sanky: Cactácea andina de alto valor antioxidante”. *Gaceta Molinera Universidad Nacional Agraria La Molina*. **Septiembre, 2006.**
- 86. SPITELLER G.** “Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases.” *Exp Gerontol* 36, 1425-1457. 2001.
- 87. STRAHLER A. N.** “Geología Física”. Editorial Omega. Barcelona. España. 1992.
- 88. SZETO Y. T., CHU W. K., BENZIE I.F.** “Antioxidants in Fruits and Vegetables: a Study of Cellular Availability and Direct Effects on Human DNA.” *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2006 Oct;70 (10):2551-5. 2006.
- 89. TICE R., AGURELL E, ANDERSON D, BURLINSON B, HARTMANN A, KOBAYASHI H, MIYAMAE Y., ROJAS E, RYU J., SASAKI Y.** “Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing.” *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35: 206-21.
- 90. TOMÁS-BARBERÁN F. A., ESPÍN J. C.** “Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables.” *J Sci Food Agric* 2001; 81: 853-76.
- 91. TOMÁS-BARBERÁN F. A., FERRERES F., GIL M.I.** “Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing.” En: Atta-ur.Rahman ed. *Studies in Natural products Chemistry*. Amsterdam: Elsevier 2000; 23: 739-95.
- 92. UGARTONDO CASADEVALL V.** “Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares.” *Facultat de Farmàcia Departament de Fisiologia*. España. 2009.

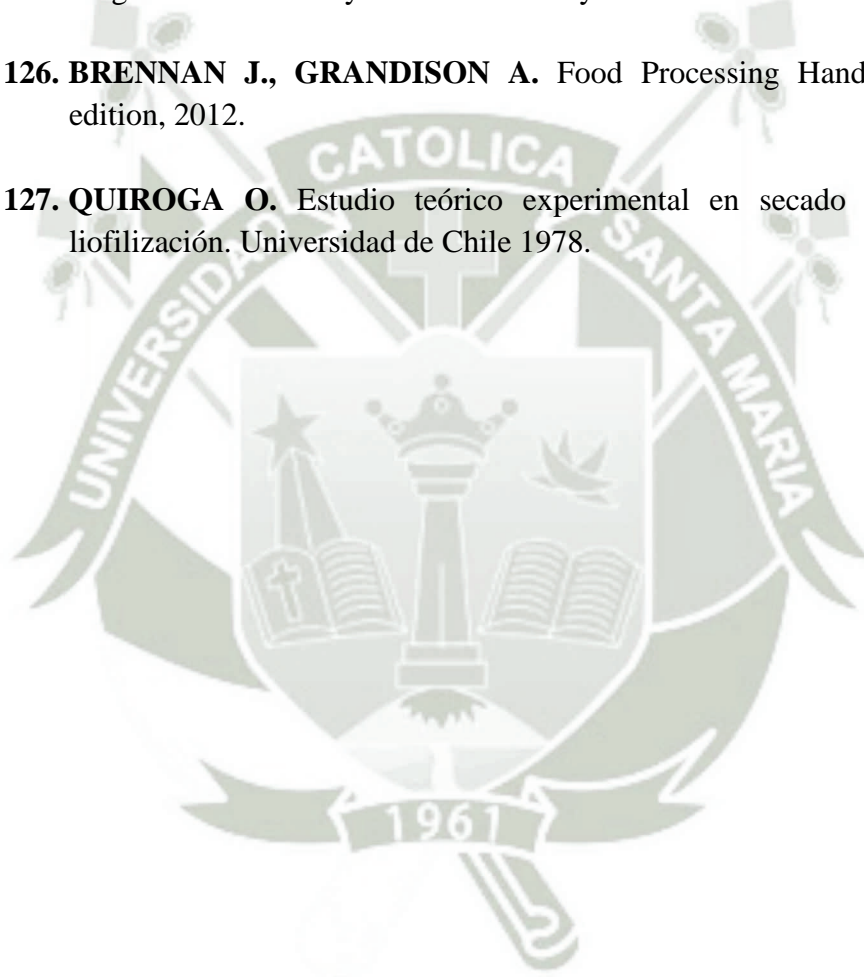
- 93. VELA ROMERO L.** “Determinación del potencial genotóxico de las nanopartículas de plata mediante el análisis del ciclo celular, la apoptosis y el ensayo del cometa en la línea celular BEAS-2B.” Trabajo realizado para optar el grado de Máster en Genética Avanzada. Universitat Autònoma de Barcelona. España. 2012.
- 94. VIDAL CAROU M. C.** “Alimentos Funcionales: Algunas reflexiones en torno a su necesidad, seguridad y eficacia y a como declarar sus efectos sobre la salud.” Rev. HUMANITAS, Humanidades Médicas, Tema del mes on-line N° 24, febrero, 2008.
- 95. WARD J. F.** “Biochemistry of DNA lesions.” *Radiat Res* 1985; 104: S103-11. 1985.
- 96. WAYNER, D. D. M., BURTON, G. W. E INGOLD, K. U.** “The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration dependent”. *Biochim. Biophys. Acta* **884**, 119-123. 1986.
- 97. WEIN A., KAVOUSSI L., NOVICK A., PARTIN A.** “Campbell-Walsh Urología/ Campbell-Walsh Urology.” 476 p.- 1127 p. Ed. Médica Panamericana. 2008.
- 98. WIKLUND S. J., AGURELL E.** “Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay.” *Mutagenesis*, submitted for publication. 2002.
- 99. WINK D. A., FELLISCH M., VODOVOTZ Y., ET AL.** “Reactive Oxygen Species in Biological Systems”. . In. Gilbert DL, Coton CA, eds. New York: Kluwer. Academic/Plenum Publishers:245–91. 1999.
- 100. ZAMORA J. D.** “Antioxidants: micronutrients fighting for health.” *Rev Chil Nutr* 2007; 34: 1-11. 2007.
- 101. ZANGAR R. C., DAVYDOV D. R., VERMA S.** “Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450.” *Toxicol Appl Pharmacol* 199, 316- 331. 2004.
- 102. ZULETA A., ESTEVE M., FRIGOLA A.** “ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products.” *Food Chemistry*; 114: 310-316. 2009.
- 103. ZUÑIGA VENEGAS L. A.** “Optimizaciones metodológicas del Ensayo del Cometa y su aplicación en Biomonitorización Humana.” Universitat

Autónoma de Barcelona. Departament de Genética i de Microbiologia. Tesis Doctoral. 2009.

104. **ORTÍZ R. R., MARTÍNEZ Y., HERNÁNDEZ R.** “Técnicas electroquímicas. Parte II – Voltamperometría.” Laboratorio de Análisis Instrumental. Universidad de los Andes. Mérida. 2006.
105. **CRUZ J. O., DÍAZ R., FORERO N.** “La Polarografía en los Fenómenos fisicoquímicos como Método de Análisis Electroquímico.” Revista Colombiana de Física, Vol. 33, N°. 2. 2001.
106. **CÉSPEDES S., CARY A.** “Liofilización, determinación del contenido de vitamina C y yodo e índice de consumo de dos variedades de sanqui (*Corryocactus brevistylus ypuquiensis*.)” Tesis para Optar el título profesional de Licenciada en Nutrición Humana. UNSA. Arequipa. Perú. 1998.
107. **DEIGHTON N., BRENNAN R., FINN C., DAVIES H. V.** “Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species.” Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 1307–1313.2000.
108. **PINELO M., RUBILAR M., SINEIRO J. NÚÑEZ, J. M.** “Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*.)” Food Chemistry, 85, 267-273. 2004.
109. **REKHA C., POORNIMA G., MANASA M, ABHIPSA V., DEVI J. P., KUMAR V., KEKUDA P.** “Ascorbic Acid, Total Phenol Content and Antioxidant Activity of Fresh Juices of Four Ripe and Unripe Citrus Fruits.” Chem Sci Trans., 2012, 1(2), 303-310.
110. **GHAFFAR M. F., PRASAD K. N., WENG K. K., ISMAIL A.,** “Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species.” Afr J Biotechnol., 2010, 9(3), 326-330
111. **DEBBIE J. M., SCOTT W. L., MARET G. T.** “ $\alpha$ -Tocopherol  $\beta$ -oxidation localized to rat liver mitochondria.” Free Radic Biol Med., jan 1; 2010, 48 :73.
112. **FENNEMA O.** “Principles of Food Science.” Marcel Dekker, Inc., New York – USA. 1976.
113. **GEIGY D.** “Tablas Científicas.” Ed. Sadagcolor. 7 Ed. Barcelona 1975.

- 114. IMÁN CORREA S., BRAVO ZAMUDIO L., SOTERO SOLÍS V., OLIVA CRUZ C.,** “Contenido de vitamina C en frutos de camu camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh, en cuatro estados de maduración, procedentes de la Colección de Germoplasma del INIA Loreto, Perú.” *Scientia Agropecuaria* 2(2011) 123 – 130.
- 115. MELICHÁČOVÁ S., TIMORACKA M., BYSTRICKÁ J., VOLLMANNOVÁ A., ČÉRY J.** “Relation of total antiradical activity and total polyphenol content of sweet cherries (*Prunus avium* L.) and tart cherries (*Prunus cerasus* L.)”. *Acta agriculturae Slovenica*, 95 - 1, marec 2010 str. 21 – 28
- 116. SALGADO N., RAMIREZ M. J., ROJAS S., BELTRAN Y., ORREGO, C. E.** “Polifenoles en tres accesiones de camu- camu (*myrciaria dubia*)”. *Vitae*, vol. 19, núm. 1, 2012, pp. S360-S362. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- 117. TOSUN I., SULE N.** “An investigation about antioxidant capacity of fruit nectars.” *Journal of Nutrition*, 2003; 2:167-169.
- 118. ZAPATA P., VALVERDE J.M., GUILLÉN F., BAILÉN G., CASTILLO S., MARTÍNEZ-ROMERO D., VALERO D., SERRANO M.** “Actividad antioxidante en diferentes frutos habituales en la dieta mediterránea”. Universidad Miguel Hernández, Orihuela, Alicante, España. 2006.
- 119. ZAPATA S., PIEDRAHITA A., ROJANO B.** “Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia”. *Perspect Nutr Humana*. 2014;16: 25-36.
- 120. ZULETA A., ESTEVE M., FRIGOLA A.** “ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products.” *Food Chemistry*; 114: 310-316. 2009.
- 121. RE R., PELLEGRIN N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., ANG M., RICE-EVANS C.** “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.” *Free Radical Biol. Med.* 1999, 26, 1231.
- 122. TICE, R. R.** "Single Celular Gel/Comet Assay: Directrices para in vitro y en las pruebas de toxicología genética in vivo". *Ambiental y Molecular Mutagénesis* 35: 206-21 - doi: 10.1002/10982280. PMID 10737956

123. **URBINA C. P., BOBADILLA M. L., RAMIREZ H. M., CORONA R. J., MENDOZA M. M., TROYO S. R., CORONA R. A.** “DNA damage in mouse lymphocytes exposed to curcumin and copper.” *J Appl Genet* 47(4), 2006, pp. 377 – 382.
124. **SOTIL G., ALVIS R., FRANCIA J., SHIGA B.** “Aplicación de dos biomarcadores para el análisis de lesiones en el DNA de bivalvos marinos.” *Rev. Peru. Biol. número especial* 13(3): 249 – 253 (Julio 2007).
125. **NADIN S., VARGAS L., CIOCCA D.** “A silver staining method for Single – cell Gel assay.” *J Histochem Cytochem* 2001 49: 1183.
126. **BRENNAN J., GRANDISON A.** *Food Processing Handbook*. Second edition, 2012.
127. **QUIROGA O.** *Estudio teórico experimental en secado de frutas por liofilización*. Universidad de Chile 1978.



## ANEXO 1

### FIGURAS: ENSAYO COMETA

#### FIGURA N° 34.: Preparación del Extracto



**a. La pulpa es molida en un mortero.**



**b. Se pesa la muestra y se la coloca en un tubo eppendorf**



**c. Se le agrega 1 ml de H<sub>2</sub>O destilada, y se lo agita en el vortex por 2 min.**



**d. Se lleva la muestra de sancayo al sonicador por 2 min.**



**e. Se centrifuga los tubos con la muestra a 4000 rpm x 10 min**



**f. Se toma el sobrenadante de la muestra en un tubo aparte.**



- g. Se filtra el sobrenadante, con papel filtro y tubos anotop para finalmente enrasar el extracto en una fiola de 5 ml, para un extracto al 4%

**FIGURA N° 35.: Extracción de sangre para el aislamiento de linfocitos**



**a. Extracción vía intravenosa**

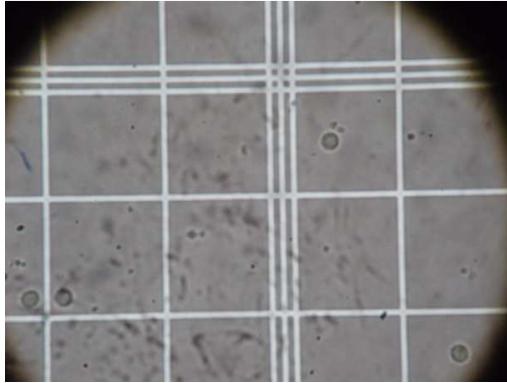
**FIGURA N° 36.: Aislamiento de linfocitos, prueba de viabilidad e incubación con el extracto**



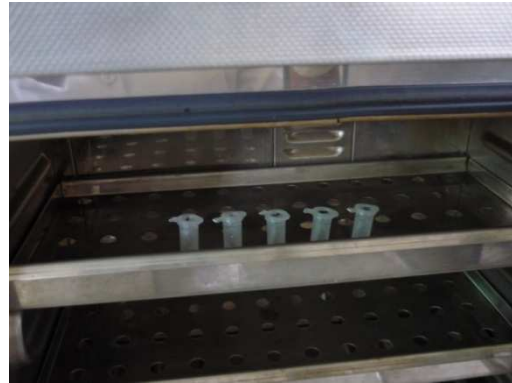
**a. Tubo Falcon con Ficoll-Paque y sangre diluida.**



**b. Tubo Falcon luego de la centrifugación.**



**c. Prueba de viabilidad en cámara de Neubauer (Foto a 40X)**



**d. Incubación de las células mononucleares a 37°C por 30 min luego de su preparación.**

**FIGURA N° 37.: Preparación de las láminas de agarosa**



**a. Preparación de la agarosa de punto de fusión normal**



**b. Láminas embebidas con la agarosa (punto de fusión normal)**



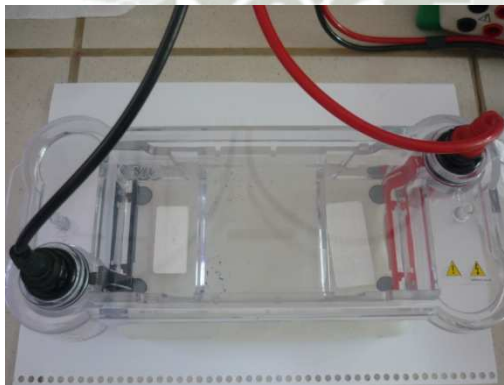
**c. Agregando la muestra embebida en la agarosa de bajo punto de fusión.**

**FIGURA N° 38.: Lisis**



**a. Portaobjetos embebidos en solución de lisis y llevados al refrigerador.**

**FIGURA N° 39.: Electroforesis**



**a. Cámara electroforética donde se realizará la exposición alcalina**



**b. Electroforesis en solución alcalina 30 v por 20 min.**

**FIGURA N° 40.: Neutralización**



**a. Solución de neutralización por 10 min**

**FIGURA N° 41.: Tinción**



**a. Solución de fijación por 10 min.**

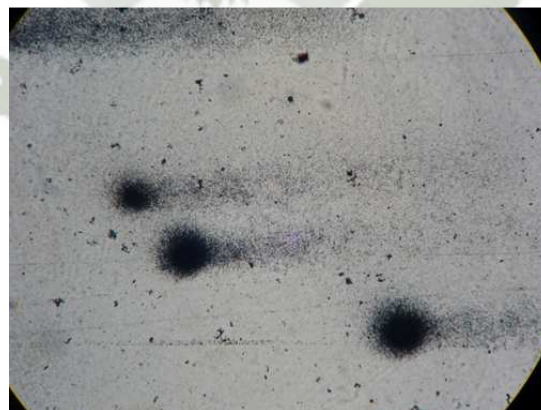


**b. Shaker con las láminas y la solución de tinción**



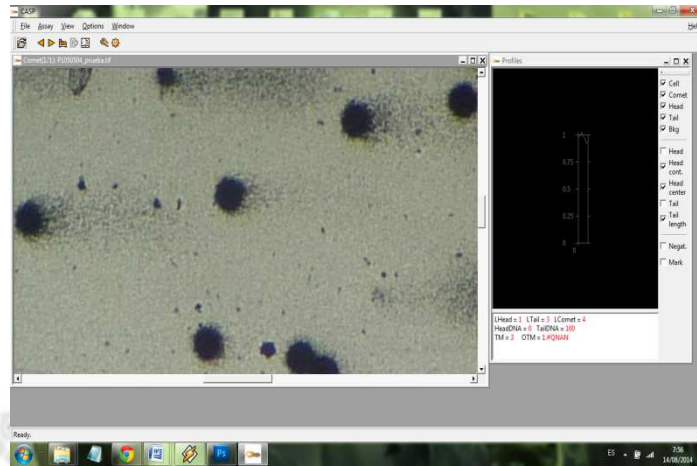
**c. Geles teñidos**

**FIGURA N° 42.: Visualización en el microscopio**

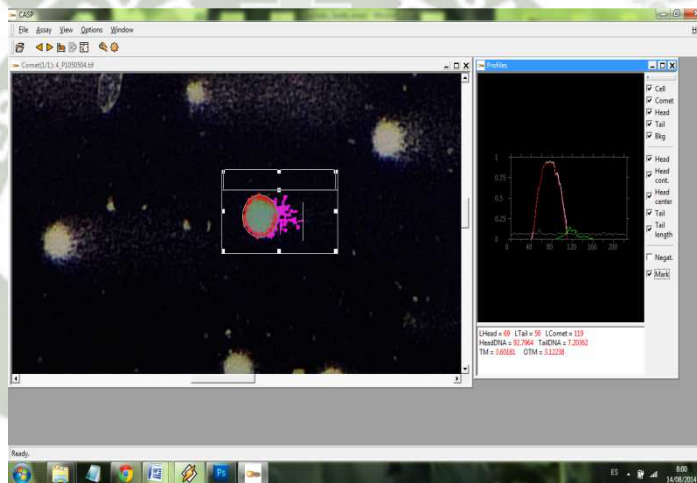


**a. Visualización de cometas a través del microscopio binocular.**

**FIGURA N° 43.: Análisis en el software CaspLab**



**a. Visualización de los cometas a través del software.**



**b. Análisis de los cometas por el software CaspLab.**

**ANEXO N° 2.: En el presente anexo se muestran los porcentajes de DNA distribuidos para cada uno de los cometas medidos en el tratamiento de 0,02% de *Corryocactus brevistilus* por el Ensayo Cometa.**

N°	Head DNA %	Tail DNA %	Head Radius	Head Length	Tail Length	Comet Length	Head Mean X	Tail Mean X	Tail Moment	Olive Tail Moment
1	95,6382	4,3618	27	53	8	62	25,8788	55,0189	0,3357	1,2710
2	95,3586	4,6414	26	53	8	62	25,9547	55,2985	0,3802	1,3620
3	96,3585	3,6415	27	54	6	61	25,6853	54,2986	0,2340	1,0419
4	94,5662	5,4338	26	53	2	56	26,1721	56,0909	0,1087	1,6257
5	82,1031	17,8969	23	46	32	78	30,1450	68,5540	5,6523	6,8740
6	84,0102	15,9898	23	47	28	76	29,4607	66,6469	4,5119	5,9460
7	83,4895	16,5105	23	46	29	77	29,6445	67,1676	4,8105	6,1953
8	84,3651	15,6349	23	47	28	75	29,3368	66,2920	4,3138	5,7779
9	83,2234	16,7766	23	46	30	77	29,7392	67,4337	4,9669	6,3239
10	84,4784	15,5216	23	47	27	75	29,2974	66,1787	4,2515	5,7246
11	81,1492	18,8508	23	45	33	79	30,4994	69,5079	6,2709	7,3534
12	99,9986	0,0014	28	56	1	58	24,7503	50,6585	0,00001	0,0004
13	74,7391	25,2609	21	42	36	79	33,1152	85,9180	9,0939	13,3385
14	99,9875	0,0125	28	56	2	59	24,7531	50,6696	0,0003	0,0032
15	81,9232	18,0768	23	46	32	78	30,2112	68,7339	5,7665	6,9637
16	83,3317	16,6684	23	46	29	77	29,7006	67,3255	4,9030	6,2714
17	99,8564	0,1436	28	55	2	58	24,7856	50,8007	0,0029	0,0373
18	81,3180	18,6820	23	45	33	79	30,4361	69,3391	6,1591	7,2679
19	99,4680	0,5320	28	55	1	57	24,8824	51,1891	0,0050	0,1400
20	80,9906	19,0094	22	45	34	80	30,5591	69,6665	6,3769	7,4341
21	81,9569	18,0431	23	46	32	78	30,1988	68,7002	5,7451	6,9468
22	95,2322	4,7678	26	53	8	62	25,9891	55,4249	0,4012	1,4034
23	96,1229	3,8772	27	53	7	61	25,7483	54,5343	0,2653	1,1161
24	96,9982	3,0018	27	54	1	56	25,5159	53,6589	0,03002	0,8448
25	95,9068	4,0932	27	53	7	62	25,8063	54,7503	0,2957	1,1847
26	99,7290	0,2710	28	55	2	58	24,8173	50,9281	0,0054	0,0708
27	99,9124	0,0876	28	56	1	58	24,7717	50,7447	0,0009	0,0228
28	73,1716	26,8284	20	41	47	89	33,8246	77,4855	12,7017	11,7135
29	75,7545	24,2455	21	42	43	86	32,6713	74,9026	10,3737	10,2392
30	98,9974	1,0026	27	55	2	58	25,0006	51,6597	0,0177	0,2673
31	95,1767	4,8233	26	53	9	62	26,0043	55,4804	0,4106	1,4217
32	95,6197	4,3803	27	53	8	62	25,8838	55,0374	0,3386	1,2770
33	93,8895	6,1105	26	52	11	64	26,3608	56,7676	0,6589	1,8580
34	95,8222	4,1778	27	53	7	62	25,8291	54,8349	0,3080	1,2118
35	96,6872	3,3128	27	54	6	61	25,5980	53,9699	0,1937	0,9399
36	90,5476	9,4524	25	50	17	68	27,3337	60,1095	1,5767	3,0981
37	96,2358	3,7642	27	53	7	61	25,7181	54,4213	0,2500	1,0804
38	93,3942	6,6058	26	52	12	65	26,5006	57,2629	0,7701	2,0321
39	95,3091	4,6909	26	53	8	62	25,9681	55,3480	0,3883	1,3782
40	95,2429	4,7571	26	53	8	62	25,9862	55,4142	0,3994	1,3999
41	94,8908	5,1092	26	53	9	63	26,0826	55,7663	0,4607	1,5166
42	93,1375	6,8625	26	52	12	65	26,5736	57,5196	0,8311	2,1237
43	95,1655	4,8345	26	53	9	62	26,0073	55,4916	0,4125	1,4254

44	95,7878	4,2122	27	53	7	62	25,8384	54,8693	0,3131	1,2228
45	96,0284	3,9717	27	53	7	61	25,7736	54,6288	0,2784	1,1460
46	99,7599	0,2401	28	55	2	58	24,8096	50,8972	0,0048	0,0626
47	97,4551	2,5449	27	54	4	60	25,3963	53,2020	0,1143	0,7076
48	99,8577	0,1423	28	55	1	57	24,7853	50,7994	0,0014	0,0370
49	95,6824	4,3176	27	53	8	62	25,8668	54,9747	0,3290	1,2567
50	96,1968	3,8032	27	53	7	61	25,7285	54,4603	0,2553	1,0927
1	94,4567	5,5433	26	52	10	63	26,2025	56,2004	0,5423	1,6629
2	99,1183	0,8817	28	55	2	58	24,9702	51,5388	0,0137	0,2343
3	99,9113	0,0887	28	56	3	60	24,7720	50,7458	0,0027	0,0230
4	99,1594	0,84056	28	55	1	58	24,9598	51,4977	0,0125	0,2231
5	88,2506	11,7494	25	49	21	71	28,0451	62,4065	2,4361	4,0373
6	84,9867	15,0133	24	47	26	75	29,1222	65,6704	3,9776	5,4871
7	87,9533	12,0468	24	49	21	71	28,1399	62,7039	2,5610	4,1638
8	86,5164	13,4836	24	48	24	73	28,6073	64,1407	3,2084	4,7912
9	96,6753	3,3248	27	54	6	61	25,6012	53,9819	0,1951	0,9436
10	97,9198	2,0802	27	54	4	59	25,2758	52,7373	0,0764	0,5713
11	99,9166	0,0834	28	56	1	58	24,7706	50,7405	0,0008	0,0216
12	99,9974	0,0026	28	56	2	59	24,7506	50,6597	0,0001	0,0007
13	99,8113	0,1887	28	55	3	59	24,7968	50,8458	0,0057	0,0492
14	99,4367	0,5633	28	55	4	60	24,8902	51,2204	0,0225	0,1483
15	79,0395	20,9605	22	44	37	82	31,3135	71,6176	7,7531	8,4479
16	98,5248	1,4752	27	55	3	58	25,1206	52,1323	0,0384	0,3985
17	99,9978	0,0022	28	56	3	60	24,7505	50,6593	0,0001	0,0006
18	69,0735	30,9265	19	38	45	84	35,8314	96,5836	13,9169	18,7885
19	73,9968	26,0032	21	41	2	44	33,4474	76,6603	0,5201	11,2367
20	96,6360	3,3640	27	54	6	61	25,6116	54,0211	0,1997	0,9557
21	93,0269	6,9731	26	52	12	65	26,6052	57,6302	0,8581	2,1634
22	98,5375	1,4625	27	55	3	58	25,1173	52,1196	0,0377	0,3949
23	77,2987	22,7013	21	43	37	81	32,0186	85,3584	8,3995	12,1088
24	99,6008	0,3992	28	55	2	58	24,8492	51,0563	0,0080	0,1046
25	99,8865	0,1135	28	55	1	57	24,7781	50,7706	0,0011	0,0295
26	95,1648	4,8352	26	53	9	62	26,0075	55,4923	0,4126	1,4257
27	54,6902	45,3098	15	30	65	96	45,2549	104,9669	29,4514	27,0554
28	82,3498	17,6502	23	46	31	78	30,0547	68,3073	5,4976	6,7517
29	76,0462	23,9538	21	42	42	86	32,5460	74,6109	10,1256	10,0761
30	99,9556	0,0444	28	56	2	59	24,7610	50,7015	0,0009	0,0115
31	99,0624	0,93755	28	55	2	58	24,9842	51,5947	0,0155	0,2495
32	99,1673	0,83274	28	55	1	58	24,9578	51,4898	0,0122	0,2209
33	99,3841	0,61594	28	55	1	57	24,9034	51,2730	0,0067	0,1624
34	96,6879	3,31215	27	54	6	61	25,5978	53,9693	0,1936	0,9397
35	98,3718	1,6282	27	55	3	59	25,1597	52,2853	0,0468	0,4417
36	99,2460	0,7540	28	55	1	57	24,9380	51,4111	0,0100	0,1996
37	97,0235	2,9765	27	54	5	60	25,5093	53,6336	0,1563	0,8371
38	96,6491	3,3509	27	54	6	61	25,6081	54,0080	0,1981	0,9516
39	95,2364	4,7636	26	53	8	62	25,9880	55,4207	0,4004	1,4021
40	99,7469	0,2531	28	55	1	57	24,8128	50,9102	0,0025	0,0661

41	95,7297	4,2703	27	53	8	62	25,8541	54,9274	0,3218	1,2415
42	89,3459	10,6541	25	50	19	69	27,7013	61,3112	2,0031	3,5808
43	93,3933	6,6067	26	52	12	65	26,5008	57,2638	0,7703	2,0324
44	89,3950	10,6050	25	50	19	69	27,6861	61,2621	1,9847	3,5607
45	80,8000	19,2000	22	45	34	80	30,6312	69,8571	6,5054	7,5314
46	80,3684	19,6316	22	45	35	80	30,7957	70,2887	6,8012	7,7531
47	92,5005	7,4995	26	51	13	66	26,7566	58,1566	0,9925	2,3549
48	91,4273	8,5727	25	51	15	67	27,0707	59,2298	1,2969	2,7569
49	94,4615	5,5386	26	52	10	63	26,2012	56,1957	0,5413	1,6613
50	70,9137	29,0863	20	39	51	92	34,9016	79,7434	14,9296	13,0428
1	94,5031	5,4969	26	53	10	63	26,1896	56,1540	0,5332	1,6471
2	93,9931	6,0069	26	52	11	64	26,3317	56,6640	0,6368	1,8220
3	93,7423	6,2577	26	52	11	64	26,4022	56,9148	0,6910	1,9094
4	95,1340	4,8660	26	53	9	62	26,0159	55,5231	0,4178	1,4358
5	96,0221	3,9779	27	53	7	61	25,7753	54,6350	0,2792	1,1480
6	99,9973	0,0027	28	56	1	58	24,7507	50,6598	0,00003	0,0007
7	93,7504	6,2496	26	52	11	64	26,3999	56,9067	0,6893	1,9066
8	87,9262	12,0738	24	49	21	71	28,1486	62,7309	2,5725	4,1754
9	82,3041	17,6959	23	46	31	78	30,0714	68,3530	5,5261	6,7743
10	95,8101	4,1899	27	53	7	62	25,8324	54,8470	0,3098	1,2157
11	98,0279	1,9721	27	54	3	59	25,2479	52,6292	0,0686	0,5400
12	95,2669	4,7331	26	53	8	62	25,9796	55,3902	0,3953	1,3920
13	97,8856	2,1145	27	54	4	59	25,2846	52,7716	0,0789	0,5812
14	98,8571	1,1429	27	55	2	58	25,0361	51,8000	0,0231	0,3059
15	93,3569	6,6431	26	52	12	65	26,5112	57,3002	0,7788	2,0454
16	96,9769	3,0231	27	54	5	60	25,5215	53,6802	0,1613	0,8513
17	98,6981	1,3020	27	55	3	59	25,0765	51,9591	0,0391	0,3500
18	96,9234	3,0766	27	54	5	60	25,5356	53,7337	0,1670	0,8675
19	86,5928	13,4072	24	48	24	73	28,5821	64,0643	3,1721	4,7572
20	78,8048	21,1952	22	44	37	82	31,4067	71,8523	7,9277	8,5725
21	76,5553	23,4447	21	43	41	85	32,3296	74,1018	9,6998	9,7934
22	88,8104	11,1896	25	49	20	70	27,8684	61,8467	2,2095	3,8020
23	95,9690	4,0310	27	53	7	61	25,7896	54,6881	0,2867	1,1649
24	99,7961	0,2039	28	55	1	57	24,8006	50,8610	0,0020	0,0531
25	74,3555	25,6445	21	41	40	82	33,2860	86,3016	10,2578	13,5956
26	89,1826	10,8174	25	50	19	70	27,7521	61,4745	2,0650	3,6479
27	41,5795	58,4205	12	23	87	111	59,5245	109,0776	50,8258	28,9492
28	94,3678	5,6322	26	52	10	63	26,2272	56,2893	0,5598	1,6932
29	99,9820	0,0180	28	56	3	60	24,7545	50,6751	0,0005	0,0047
30	92,6245	7,3755	26	51	13	65	26,7208	58,0326	0,9600	2,3094
31	93,1421	6,8579	26	52	12	65	26,5723	57,5150	0,8300	2,1220
32	95,9342	4,0658	27	53	7	61	25,7989	54,7229	0,2917	1,1760
33	95,6382	4,3618	27	53	8	62	25,8788	55,0189	0,3357	1,2710
34	92,9959	7,0041	26	52	12	65	26,6141	57,6612	0,8657	2,1746
35	99,9870	0,0130	28	56	2	59	24,7532	50,6701	0,0003	0,0034
36	99,9959	0,0041	28	56	3	60	24,7510	50,6612	0,0001	0,0011
37	98,2452	1,7548	27	55	3	59	25,1921	52,4119	0,0543	0,4777

38	94,0342	5,9658	26	52	11	64	26,3202	56,6229	0,6281	1,8078
39	93,6492	6,3508	26	52	11	64	26,4284	57,0079	0,7118	1,9420
40	93,5025	6,4975	26	52	11	64	26,4699	57,1546	0,7450	1,9937
41	94,8728	5,1272	26	53	4	58	26,0876	55,7843	0,2051	1,5226
42	95,3325	4,6675	26	53	8	62	25,9618	55,3246	0,3845	1,3705
43	98,6350	1,3650	27	55	2	58	25,0925	52,0221	0,0329	0,3676
44	96,4727	3,5274	27	54	6	61	25,6549	54,1845	0,2196	1,0063
45	96,3419	3,6581	27	54	6	61	25,6898	54,3152	0,2361	1,0471
46	99,6727	0,3273	28	55	1	57	24,8313	50,9844	0,0019	0,0856
47	99,5970	0,4030	28	55	1	57	24,8501	51,0601	0,0029	0,1056
48	99,8301	0,1699	28	55	1	57	24,7921	50,8270	0,0017	0,0442
49	97,3428	2,6572	27	54	5	60	25,4256	53,3143	0,1246	0,7411
50	99,7071	0,2929	28	55	1	57	24,8227	50,9500	0,0015	0,0765



**ANEXO N° 3.: En el presente anexo se muestran los porcentajes de DNA distribuidos para cada uno de los cometas medidos en el tratamiento de 0,2% de *Corryocactus brevistilus* por el Ensayo Cometa.**

N°	Head DNA %	Tail DNA %	Head Radius	Head Length	Tail Length	Comet Length	Head Mean X	Tail Mean X	Tail Moment	Olive Tail Moment
1	73,5121	26,4879	20	41	47	89	33,6679	77,1450	12,3813	11,5162
2	95,5069	4,4931	27	53	8	62	25,9144	55,1502	0,3563	1,3136
3	75,6834	24,3166	21	42	43	86	32,7020	74,9737	10,4347	10,2790
4	76,0398	23,9602	21	42	42	86	32,5487	74,6173	10,1310	10,0797
5	96,4324	3,5676	27	54	6	61	25,6656	54,2247	0,2246	1,0189
6	53,1645	46,8355	15	30	83	113	46,5536	97,4926	38,7100	23,8575
7	95,9938	4,0062	27	53	7	61	25,7829	54,6633	0,2832	1,1570
8	72,2178	27,7822	20	40	49	90	34,2713	78,4393	13,6209	12,2708
9	95,3459	4,6541	26	53	8	62	25,9581	55,3112	0,3822	1,3661
10	95,8796	4,1204	27	53	7	62	25,8136	54,7775	0,2996	1,1934
11	96,9676	3,0324	27	54	5	60	25,5240	53,6895	0,1623	0,8541
12	95,5870	4,4130	27	53	8	62	25,8926	55,0701	0,3437	1,2876
13	54,5121	45,4879	15	30	80	112	45,4028	96,1450	36,5144	23,0816
14	75,7572	24,2428	21	42	43	86	32,6702	74,8999	10,3714	10,2377
15	76,2696	23,7304	21	42	42	85	32,4507	74,3875	9,9376	9,9518
16	75,2433	24,7567	21	42	44	86	32,8933	75,4138	10,8158	10,5267
17	99,2483	0,7517	28	55	2	58	24,9374	51,4088	0,0150	0,1990
18	99,9865	0,0135	28	56	1	58	24,7533	50,6706	0,0001	0,0035
19	72,0078	27,9922	20	40	49	90	34,3713	78,6493	13,8276	12,3944
20	73,6149	26,3851	20	41	47	88	33,6209	77,0422	12,2854	11,4568
21	73,8355	26,1645	21	41	46	88	33,5205	76,8216	12,0808	11,3295
22	97,9970	2,0030	27	54	4	59	25,2559	52,6601	0,07080	0,5489
23	76,8273	23,1727	21	43	41	85	32,2151	73,8298	9,4760	9,6432
24	99,9963	0,0037	28	56	1	58	24,7509	50,6608	0,00004	0,0010
25	75,8263	24,1737	21	42	43	86	32,6404	74,8308	10,3124	10,1990
26	77,3658	22,6342	21	43	40	84	31,9909	73,2913	9,0407	9,3480
27	29,9001	70,0999	8	17	124	141	82,7756	120,7570	86,7176	26,6249
28	95,9875	4,0125	27	53	7	61	25,7846	54,6696	0,2841	1,1590
29	95,9979	4,0021	27	53	7	61	25,7818	54,6592	0,28265	1,1557
30	99,4928	0,5072	28	55	2	58	24,8762	51,1643	0,0101	0,1333
31	99,8492	0,1508	28	55	1	57	24,7874	50,8079	0,0015	0,0392
32	78,8669	21,1331	22	44	37	82	31,3820	71,7902	7,8813	8,5395
33	98,8655	1,1345	27	55	2	58	25,0340	51,7916	0,0227	0,3036
34	97,8597	2,1403	27	54	4	59	25,2913	52,7974	0,0808	0,5887
35	99,7997	0,2003	28	55	1	57	24,7997	50,8574	0,0020	0,0522
36	96,8410	3,1590	27	54	6	60	25,5574	53,8161	0,1761	0,8927
37	76,8825	23,1175	21	43	41	85	32,1920	73,7746	9,4309	9,6129
38	75,4147	24,5853	21	42	43	86	32,8185	75,2424	10,6665	10,4300
39	76,2965	23,7035	21	42	42	85	32,4392	74,3606	9,9151	9,9368
40	78,2996	21,7004	22	43	38	83	31,6094	72,3575	8,3101	8,8425
41	75,3923	24,6077	21	42	43	86	32,8283	75,2648	10,6860	10,4426
42	72,0129	27,9871	20	40	49	90	34,3688	78,6442	13,8225	12,3914
43	76,6365	23,3635	21	43	41	85	32,2953	74,0206	9,6327	9,7485

44	75,2150	24,7850	21	42	44	87	32,9057	75,4421	10,8405	10,5426
45	76,0138	23,9862	21	42	42	86	32,5599	74,6433	10,1530	10,0942
46	76,1568	23,8432	21	42	42	85	32,4987	74,5003	10,0323	10,0145
47	77,7671	22,2329	22	43	39	83	31,8258	72,8900	8,7230	9,1298
48	95,9234	4,0766	27	53	7	61	25,8018	54,7337	0,2933	1,1794
49	75,2088	24,7912	21	42	44	87	32,9084	75,4483	10,8459	10,5462
50	95,5496	4,4504	27	53	8	62	25,9028	55,1075	0,3495	1,2997
1	95,4989	4,5011	27	53	8	62	25,9165	55,1582	0,3575	1,3162
2	96,9972	3,0028	27	54	5	60	25,5162	53,6599	0,1591	0,8451
3	78,9742	21,0258	22	44	37	82	31,3393	71,6829	7,8015	8,4825
4	77,1420	22,8580	21	43	40	84	32,0837	73,5151	9,2204	9,4704
5	99,9978	0,0022	28	56	1	58	24,7506	50,6593	0,0000	0,0006
6	99,2625	0,7375	28	55	2	58	24,9339	51,3946	0,0148	0,1952
7	98,5714	1,4286	27	55	3	58	25,1087	52,0857	0,0360	0,3854
8	99,8936	0,1064	28	55	1	57	24,7764	50,7635	0,0011	0,0276
9	99,4634	0,5366	28	55	1	57	24,8835	51,1937	0,0051	0,1412
10	76,2537	23,7463	21	42	42	85	32,4574	74,4034	9,9509	9,9606
11	77,4812	22,5188	22	43	40	84	31,9432	73,1759	8,9488	9,2851
12	78,4724	21,5277	22	44	38	83	31,5398	72,1848	8,1783	8,7499
13	99,9292	0,0708	28	56	1	58	24,7675	50,7279	0,0007	0,0184
14	98,6021	1,3979	27	55	2	58	25,1009	52,0550	0,0345	0,3768
15	97,4161	2,5839	27	54	5	60	25,4065	53,2410	0,1178	0,7192
16	94,0947	5,9053	26	52	10	64	26,3033	56,5624	0,6154	1,7869
17	95,7946	4,2054	27	53	7	62	25,8365	54,8625	0,3121	1,2206
18	73,2631	26,7369	20	41	47	89	33,7824	77,3940	12,6152	11,6604
19	96,6112	3,3888	27	54	6	61	25,6182	54,0459	0,2027	0,9634
20	28,0357	71,9643	8	16	127	144	88,2803	122,6214	91,3917	24,7133
21	72,0940	27,9060	20	40	49	90	34,3302	78,5631	13,7426	12,3436
22	73,4082	26,5918	20	41	47	89	33,7156	77,2489	12,4787	11,5763
23	79,1506	20,8494	22	44	37	82	31,2695	71,5065	7,6711	8,3892
24	99,9979	0,0021	28	56	1	58	24,7505	50,6592	0,00002	0,0005
25	75,6208	24,3792	21	42	43	86	32,7291	75,0363	10,4884	10,3142
26	76,2941	23,7059	21	42	42	85	32,4402	74,3630	9,9171	9,9382
27	99,6411	0,35890	28	55	1	57	24,8391	51,0160	0,0023	0,0939
28	98,3484	1,65156	27	55	3	59	25,1656	52,3087	0,0481	0,4483
29	98,0508	1,94925	27	54	3	59	25,2420	52,6064	0,0671	0,5334
30	75,9395	24,0606	21	42	42	86	32,5918	74,7177	10,2161	10,1357
31	76,7336	23,2664	21	43	41	85	32,2544	73,9235	9,5528	9,6949
32	77,7484	22,2516	22	43	39	83	31,8335	72,9087	8,7377	9,1399
33	79,4295	20,5705	22	44	36	81	31,1597	71,2276	7,4673	8,2422
34	78,6916	21,3085	22	44	38	82	31,4519	71,9656	8,0126	8,6328
35	77,4730	22,5270	22	43	40	84	31,9466	73,1841	8,9553	9,2896
36	79,0932	20,9068	22	44	37	82	31,2922	71,5639	7,7134	8,4195
37	78,4997	21,5003	22	44	38	83	31,5288	72,1574	8,1576	8,7353
38	77,5965	22,4035	22	43	40	84	31,8958	73,0606	8,8574	9,2224
39	76,6980	23,3020	21	43	41	85	32,2694	73,9591	9,5821	9,7145
40	95,1284	4,8716	26	53	9	62	26,0175	55,5287	0,4188	1,4377

41	95,7927	4,2073	27	53	7	62	25,8370	54,8644	0,3124	1,2213
42	99,9631	0,0369	28	56	1	58	24,7591	50,6940	0,0004	0,0096
43	97,0759	2,9241	27	54	5	60	25,4955	53,5812	0,1509	0,8212
44	53,2328	46,7672	15	30	83	113	46,4939	97,4243	38,5971	23,8187
45	76,9019	23,0981	21	43	41	84	32,1839	73,7552	9,4151	9,6022
46	95,3045	4,6955	26	53	8	62	25,9694	55,3526	0,3891	1,3797
47	99,5992	0,4008	28	55	1	57	24,8496	51,0579	0,0028	0,1050
48	78,5994	21,4006	22	44	38	82	31,4888	72,0577	8,0821	8,6820
49	99,0165	0,9835	28	55	2	58	24,9958	51,6406	0,0171	0,2621
50	99,8035	0,1965	28	55	1	57	24,7987	50,8536	0,0020	0,0512
1	99,6926	0,3074	28	55	1	57	24,8263	50,9645	0,0017	0,0803
2	81,7200	18,2800	23	45	32	79	30,2863	68,9371	5,8969	7,0654
3	96,9559	3,0441	27	54	5	60	25,5271	53,7012	0,1635	0,8577
4	54,4520	45,5480	15	30	80	112	45,4529	96,2051	36,6109	23,1166
5	55,4226	44,5774	15	31	79	110	44,6569	95,2345	35,0673	22,5462
6	99,3328	0,6672	28	55	2	58	24,9162	51,3243	0,0133	0,1762
7	98,5788	1,4212	27	55	3	58	25,1068	52,0783	0,0356	0,3833
8	98,2164	1,7836	27	55	3	59	25,1995	52,4407	0,0561	0,4859
9	99,9992	0,0008	28	56	1	58	24,7502	50,6579	0,00001	0,0002
10	97,3841	2,6159	27	54	5	60	25,4148	53,2730	0,1208	0,7287
11	53,3734	46,6266	15	30	82	113	46,3714	97,2837	38,3654	23,7387
12	75,8465	24,1535	21	42	43	86	32,6317	74,8106	10,2952	10,1877
13	98,7108	1,2892	27	55	2	58	25,0733	51,9463	0,0293	0,3465
14	77,4488	22,5512	22	43	40	84	31,9566	73,2083	8,9745	9,3028
15	76,2421	23,7579	21	42	42	85	32,4624	74,4150	9,9607	9,9671
16	75,0010	24,9990	21	42	44	87	32,9996	75,6561	11,0285	10,6637
17	79,2746	20,7254	22	44	37	82	31,2206	71,3825	7,5802	8,3237
18	78,6112	21,3888	22	44	38	82	31,4841	72,0459	8,0732	8,6757
19	95,1844	4,8156	26	53	8	62	26,0022	55,4727	0,4092	1,4192
20	83,8612	16,1388	23	47	28	76	29,5130	66,7959	4,5964	6,0170
21	82,4696	17,5304	23	46	31	78	30,0111	68,1875	5,4232	6,6925
22	98,8146	1,1854	27	55	2	58	25,0469	51,8425	0,0248	0,3176
23	99,8076	0,1924	28	55	1	57	24,7977	50,8495	0,0019	0,0501
24	99,5515	0,4485	28	55	1	57	24,8615	51,1056	0,0035	0,1177
25	77,3645	22,6355	21	43	40	84	31,9914	73,2926	9,0418	9,3487
26	99,4126	0,5874	28	55	1	57	24,8962	51,2445	0,0061	0,1548
27	82,5055	17,4946	23	46	31	78	29,9980	68,1517	5,4010	6,6748
28	99,6849	0,3151	28	55	1	57	24,8282	50,9722	0,0018	0,0824
29	73,3657	26,6343	20	41	47	89	33,7351	77,2914	12,5186	11,6009
30	71,1184	28,8816	20	40	51	91	34,8011	79,5387	14,7202	12,9209
31	96,6832	3,3168	27	54	6	61	25,5991	53,9739	0,1941	0,9411
32	81,2997	18,7003	23	45	33	79	30,4429	69,3574	6,1712	7,2771
33	97,5406	2,4594	27	54	4	60	25,3740	53,1165	0,1067	0,6823
34	69,6245	30,3755	19	39	54	93	35,5478	81,0326	16,2824	13,8162
35	99,8203	0,1797	28	55	1	57	24,7946	50,8368	0,0018	0,0468
36	81,7325	18,2675	23	45	32	79	30,2817	68,9246	5,8888	7,0591
37	95,6468	4,3532	27	53	8	62	25,8765	55,0103	0,3344	1,2683

38	80,5907	19,4093	22	45	34	80	30,7107	70,0664	6,6480	7,6387
39	75,2568	24,7432	21	42	44	86	32,8874	75,4003	10,8040	10,5191
40	78,8411	21,1589	22	44	37	82	31,3923	71,8160	7,9006	8,5532
41	79,2993	20,7007	22	44	37	82	31,2109	71,3578	7,5621	8,3107
42	81,4120	18,5880	23	45	33	79	30,4009	69,2451	6,0973	7,2204
43	80,2393	19,7607	22	45	35	80	30,8452	70,4178	6,8909	7,8198
44	71,5953	28,4047	20	40	50	91	34,5693	79,0618	14,2381	12,6380
45	99,0195	0,9805	28	55	2	58	24,9951	51,6376	0,0170	0,2612
46	76,7652	23,2348	21	43	41	85	32,2412	73,8919	9,5269	9,6775
47	80,0557	19,9443	22	44	35	81	30,9160	70,6014	7,0196	7,9150
48	81,4356	18,5644	23	45	33	79	30,3921	69,2215	6,0818	7,2084
49	85,4279	14,5721	24	47	26	74	28,9718	65,2292	3,7473	5,2835
50	99,9961	0,0039	28	56	1	58	24,7510	50,6610	0,0000	0,0010



**ANEXO N° 4.: En el presente anexo se muestran los porcentajes de DNA distribuidos para cada uno de los cometas medidos en el tratamiento de 2% de *Corryocactus brevistilus* por el Ensayo Cometa.**

N°	Head DNA %	Tail DNA %	Head Radius	Head Length	Tail Length	Comet Length	Head Mean X	Tail Mean X	Tail Moment	Olive Tail Moment
1	75,1271	24,8729	21	42	44	87	32,9442	75,5300	10,9175	10,5923
2	75,9808	24,0192	21	42	42	86	32,5740	74,6763	10,1810	10,1126
3	74,7954	25,2046	21	42	39	82	33,0903	75,8617	9,8298	10,7804
4	74,1471	25,8529	21	41	42	84	33,3796	76,5100	10,8582	11,1505
5	73,1745	26,8255	20	41	47	89	33,8233	77,4826	12,6990	11,7118
6	74,0756	25,9244	21	41	46	88	33,4118	76,5815	11,8601	11,1915
7	75,5613	24,4387	21	42	38	81	32,7549	75,0958	9,2867	10,3476
8	76,0019	23,9981	21	42	39	82	32,5650	74,6552	9,3593	10,1009
9	74,1077	25,8923	21	41	46	88	33,3973	76,5494	11,8308	11,1731
10	75,8946	24,1054	21	42	43	86	32,6110	74,7625	10,2542	10,1608
11	75,7542	24,2458	21	42	43	86	32,6715	74,9029	10,3740	10,2394
12	73,0136	26,9864	20	41	48	89	33,8978	77,6435	12,8517	11,8054
13	75,2809	24,7191	21	42	44	86	32,8769	75,3762	10,7830	10,5055
14	76,4633	23,5367	21	42	42	85	32,3685	74,1938	9,7761	9,8443
15	75,8085	24,1915	21	42	43	86	32,6481	74,8486	10,3276	10,2089
16	95,4019	4,5981	27	53	8	62	25,9429	55,2552	0,3731	1,3478
17	95,1795	4,8205	26	53	9	62	26,0035	55,4776	0,4101	1,4208
18	54,3966	45,6034	15	30	80	112	45,4992	96,2605	36,7001	23,1489
19	53,6558	46,3442	15	30	82	113	46,1274	97,0013	37,9021	23,5771
20	29,1405	70,8595	8	16	125	142	84,9333	121,5166	88,6071	25,9227
21	73,0519	26,9481	20	41	48	89	33,8800	77,6052	12,8153	11,7831
22	75,3421	24,6579	21	42	41	84	32,8502	75,3150	10,1097	10,4709
23	74,6926	25,3074	21	41	40	82	33,1358	75,9645	10,1230	10,8388
24	75,5671	24,4329	21	42	43	86	32,7523	75,0900	10,5347	10,3443
25	74,8232	25,1768	21	42	44	87	33,0780	75,8339	11,1860	10,7646
26	53,9571	46,0429	15	30	71	102	45,8698	96,7000	32,6905	23,4037
27	96,9997	3,0003	27	54	5	60	25,5155	53,6574	0,1589	0,8443
28	72,2669	27,7331	20	40	49	90	34,2480	78,3902	13,5728	12,2420
29	71,0377	28,9623	20	39	51	92	34,8407	79,6194	14,8026	12,9690
30	76,2689	23,7311	21	42	42	85	32,4510	74,3882	9,9382	9,9522
31	95,3115	4,6885	26	53	8	62	25,9675	55,3456	0,3879	1,3774
32	95,9952	4,0048	27	53	7	61	25,7825	54,6619	0,2830	1,1566
33	74,7751	25,2249	21	42	45	87	33,0993	75,8820	11,2287	10,7919
34	73,0659	26,9341	20	41	48	89	33,8735	77,5912	12,8020	11,7750
35	95,0284	4,9716	26	53	9	63	26,0448	55,6287	0,4362	1,4708
36	74,3281	25,6719	21	41	45	88	33,2983	76,3290	11,6302	11,0468
37	95,7483	4,2517	27	53	8	62	25,8490	54,9088	0,3190	1,2355
38	76,3945	23,6055	21	42	42	85	32,3976	74,2626	9,8333	9,8824
39	75,0178	24,9822	21	42	44	87	32,9922	75,6393	11,0137	10,6542
40	95,2845	4,7155	26	53	8	62	25,9748	55,3726	0,3924	1,3863
41	96,0188	3,9812	27	53	7	61	25,7762	54,6383	0,2797	1,1491
42	29,5601	70,4399	8	16	124	142	83,7276	121,0970	87,5607	26,3229
43	79,9120	20,0880	22	44	35	81	30,9716	70,7451	7,1211	7,9897

44	76,6201	23,3799	21	43	41	85	32,3022	74,0370	9,6462	9,7575
45	30,3078	69,6922	8	17	123	141	81,6621	120,3493	85,7118	26,9619
46	28,9058	71,0942	8	16	125	143	85,6230	121,7513	89,1950	25,6852
47	30,5623	69,4377	8	17	123	141	80,9821	120,0948	85,0870	27,1589
48	73,2114	26,7886	20	41	47	89	33,8062	77,4457	12,6640	11,6904
49	52,9839	47,0161	15	29	83	113	46,7123	97,6732	39,0091	23,9598
50	95,2384	4,7616	26	53	8	62	25,9874	55,4187	0,4001	1,4014
1	81,9974	18,0026	23	46	32	78	30,1839	68,6597	5,7193	6,9266
2	80,5365	19,4635	22	45	34	80	30,7314	70,1206	6,6852	7,6665
3	72,8124	27,1876	20	40	48	89	33,9915	77,8447	13,0441	11,9226
4	79,6294	20,3706	22	44	36	81	31,0815	71,0277	7,3228	8,1373
5	80,1866	19,8134	22	45	30	76	30,8655	70,4705	5,9440	7,8471
6	79,6646	20,3354	22	44	36	81	31,0678	70,9925	7,2976	8,1189
7	75,6489	24,3511	21	42	43	86	32,7169	75,0082	10,4643	10,2984
8	73,8146	26,1854	21	41	46	88	33,5300	76,8425	12,1002	11,3416
9	74,2813	25,7187	21	41	45	88	33,3193	76,3758	11,6727	11,0736
10	78,2419	21,7581	22	43	38	83	31,6327	72,4152	8,3544	8,8735
11	79,6194	20,3806	22	44	36	81	31,0854	71,0377	7,3300	8,1425
12	72,5262	27,4738	20	40	48	90	34,1256	78,1309	13,3202	12,0899
13	76,7908	23,2092	21	43	41	85	32,2304	73,8663	9,5059	9,6634
14	73,3710	26,6290	20	41	47	89	33,7327	77,2861	12,5136	11,5978
15	63,7223	36,2777	18	35	64	100	38,8404	86,9348	23,2248	17,4475
16	72,2519	27,7481	20	40	49	90	34,2552	78,4052	13,5875	12,2508
17	28,0321	71,9679	8	16	127	144	88,2916	122,6250	91,4008	24,7090
18	74,2915	25,7085	21	41	45	88	33,3147	76,3656	11,6634	11,0677
19	73,7689	26,2311	20	41	46	88	33,5507	76,8882	12,1424	11,3679
20	75,6478	24,3522	21	42	43	86	32,7174	75,0093	10,4652	10,2990
21	76,5692	23,4308	21	43	41	85	32,3237	74,0879	9,6882	9,7857
22	76,8658	23,1342	21	43	41	85	32,1990	73,7913	9,4446	9,6221
23	75,8310	24,1690	21	42	43	86	32,6384	74,8261	10,3084	10,1964
24	74,7354	25,2646	21	42	45	87	33,1168	75,9217	11,2641	10,8145
25	76,1807	23,8193	21	42	39	82	32,4885	74,4764	9,2895	10,0012
26	75,9718	24,0282	21	42	38	81	32,5779	74,6853	9,1307	10,1177
27	47,9921	52,0079	13	27	92	119	51,5710	102,6650	47,7321	26,5729
28	75,1000	24,9000	21	42	44	87	32,9560	75,5571	10,9413	10,6076
29	95,4767	4,5233	27	53	8	62	25,9226	55,1804	0,3611	1,3234
30	95,9332	4,0668	27	53	7	61	25,7992	54,7239	0,2919	1,1763
31	72,4984	27,5016	20	40	44	85	34,1387	78,1587	12,1007	12,1062
32	97,8928	2,1072	27	54	4	59	25,2828	52,7643	0,0784	0,5791
33	96,6826	3,3174	27	54	6	61	25,5992	53,9745	0,1942	0,9413
34	96,8729	3,1271	27	54	6	60	25,5489	53,7842	0,1726	0,8829
35	97,7078	2,2922	27	54	4	59	25,3306	52,9493	0,0927	0,6331
36	54,4276	45,5724	15	30	80	112	45,4733	96,2295	36,6502	23,1308
37	73,0125	26,9875	20	41	48	89	33,8983	77,6446	12,8528	11,8060
38	71,4664	28,5336	20	40	50	91	34,6317	79,1907	14,3676	12,7143
39	72,2114	27,7886	20	40	49	90	34,2744	78,4457	13,6272	12,2746
40	71,5327	28,4673	20	40	50	91	34,5996	79,1244	14,3010	12,6750

41	73,5777	26,4223	20	41	47	89	33,6379	77,0794	12,3201	11,4782
42	51,9218	48,0782	14	29	85	115	47,6678	98,7353	40,7914	24,5523
43	76,4748	23,5252	21	42	39	82	32,3636	74,1823	9,1748	9,8379
44	75,9787	24,0213	21	42	40	83	32,5749	74,6784	9,6085	10,1138
45	76,8597	23,1403	21	43	40	84	32,2015	73,7974	9,2561	9,6254
46	73,5543	26,4457	20	41	37	79	33,6486	77,1028	9,7849	11,4918
47	96,3533	3,6467	27	54	6	61	25,6867	54,3038	0,2347	1,0436
48	96,9579	3,0421	27	54	5	60	25,5265	53,6992	0,1633	0,8570
49	73,0891	26,9109	20	41	47	89	33,8628	77,5680	12,7799	11,7615
50	75,0147	24,9853	21	42	44	87	32,9935	75,6424	11,0164	10,6559
1	75,9977	24,0023	21	42	42	86	32,5668	74,6594	10,1667	10,1032
2	76,4355	23,5645	21	42	42	85	32,3802	74,2216	9,7992	9,8597
3	75,8419	24,1581	21	42	43	86	32,6337	74,8152	10,2991	10,1903
4	75,3629	24,6371	21	42	43	86	32,8411	75,2942	10,7115	10,4592
5	76,2312	23,7689	21	42	42	85	32,4670	74,4260	9,9699	9,9731
6	74,4935	25,5065	21	41	53	95	33,2244	76,1636	13,5184	10,9523
7	75,9326	24,0674	21	42	42	86	32,5947	74,7245	10,2219	10,1395
8	76,2342	23,7658	21	42	42	85	32,4657	74,4229	9,9673	9,9715
9	76,6926	23,3074	21	43	41	85	32,2717	73,9645	9,5865	9,7175
10	72,6577	27,3423	20	40	48	90	34,0638	77,9994	13,1930	12,0130
11	74,4986	25,5014	21	41	35	77	33,2221	76,1585	8,9255	10,9494
12	78,2036	21,7964	22	43	38	83	31,6482	72,4535	8,3838	8,8941
13	73,6022	26,3978	20	41	47	88	33,6267	77,0549	12,2972	11,4641
14	72,7829	27,2171	20	40	48	89	34,0052	77,8742	13,0724	11,9398
15	71,4630	28,5370	20	40	50	91	34,6333	79,1941	14,3711	12,7163
16	76,1397	23,8603	21	42	36	79	32,5060	74,5174	8,5897	10,0240
17	75,9873	24,0127	21	42	37	80	32,5712	74,6698	8,8847	10,1090
18	95,4072	4,5928	27	53	8	62	25,9414	55,2499	0,3722	1,3461
19	73,8470	26,1530	21	41	46	88	33,5152	76,8101	12,0702	11,3229
20	74,2530	25,7470	21	41	45	88	33,3320	76,4041	11,6984	11,0898
21	28,8019	71,1981	8	16	126	143	85,9318	121,8552	89,4559	25,5768
22	95,4984	4,5016	27	53	8	62	25,9167	55,1587	0,3576	1,3164
23	71,7825	28,2175	20	40	50	91	34,4792	78,8746	14,0511	12,5273
24	75,3492	24,6508	21	42	44	86	32,8471	75,3079	10,7234	10,4669
25	73,1616	26,8384	20	41	47	89	33,8292	77,4955	12,7112	11,7193
26	74,9424	25,0576	21	42	44	87	33,0254	75,7147	11,0803	10,6969
27	95,8066	4,1934	27	53	7	62	25,8333	54,8505	0,3103	1,2168
28	72,9624	27,0376	20	41	48	89	33,9216	77,6947	12,9006	11,8352
29	71,1473	28,8527	20	40	51	91	34,7870	79,5098	14,6908	12,9037
30	74,2961	25,7039	21	41	35	77	33,3127	76,3610	8,9964	11,0651
31	70,3748	29,6252	20	39	52	92	35,1688	80,2823	15,4880	13,3650
32	96,0441	3,9559	27	53	7	61	25,7694	54,6130	0,2762	1,1410
33	54,8197	45,1803	15	30	75	106	45,1480	95,8374	33,8852	22,9016
34	95,7891	4,2109	27	53	7	62	25,8380	54,8680	0,3129	1,2224
35	53,7817	46,2183	15	30	82	112	46,0194	96,8754	37,6964	23,5048
36	96,9231	3,0769	27	54	5	60	25,5357	53,7340	0,1671	0,8676
37	75,6027	24,3973	21	42	43	86	32,7369	75,0544	10,5040	10,3243

38	73,2085	26,7915	20	41	42	84	33,8075	77,4486	11,2524	11,6921
39	76,3943	23,6057	21	42	42	85	32,3977	74,2628	9,8335	9,8825
40	74,7827	25,2173	21	42	45	87	33,0959	75,8744	11,2220	10,7876
41	76,8880	23,1120	21	43	41	85	32,1897	73,7691	9,4264	9,6098
42	75,6486	24,3514	21	42	43	86	32,7171	75,0085	10,4646	10,2986
43	75,0751	24,9249	21	42	39	82	32,9670	75,5820	9,7207	10,6217
44	96,7876	3,2124	27	54	4	59	25,5715	53,8695	0,1285	0,9090
45	76,5031	23,4969	21	43	41	85	32,3516	74,1540	9,7430	9,8223
46	95,7172	4,2828	27	53	8	62	25,8574	54,9399	0,3237	1,2455
47	96,3438	3,6562	27	54	6	61	25,6893	54,3133	0,2359	1,0466
48	74,6629	25,3371	21	41	38	80	33,1490	75,9942	9,6281	10,8557
49	74,1577	25,8423	21	41	36	78	33,3748	76,4994	9,3032	11,1444
50	95,0377	4,9623	26	53	9	63	26,0423	55,6194	0,4346	1,4677



**ANEXO N°5.: En el presente anexo se muestran los porcentajes de DNA distribuidos para cada uno de los cometas medidos en el control negativo con PBS por el Ensayo Cometa.**

N°	Head DNA %	Tail DNA %	Head Radius	Head Length	Tail Length	Comet Length	Head Mean X	Tail Mean X	Tail Moment	Olive Tail Moment
1	98,6826	1,3174	27	55	5	61	25,0804	51,9745	0,0659	0,3543
2	99,0277	0,9723	28	55	4	60	24,9930	51,6294	0,0389	0,2590
3	99,1209	0,8791	28	55	3	59	24,9695	51,5362	0,0264	0,2335
4	99,5283	0,4717	28	55	5	61	24,8673	51,1288	0,0236	0,1239
5	99,0629	0,9371	28	55	5	61	24,9841	51,5942	0,0469	0,2494
6	99,3831	0,6169	28	55	2	58	24,9036	51,2740	0,0123	0,1627
7	99,1636	0,8364	28	55	2	58	24,9587	51,4935	0,0167	0,2219
8	98,2914	1,7086	27	55	4	60	25,1802	52,3657	0,0683	0,4645
9	98,2229	1,7771	27	55	2	58	25,1978	52,4342	0,0355	0,4840
10	99,9036	0,0964	28	56	2	59	24,7739	50,7535	0,0019	0,0250
11	99,1380	0,8620	28	55	3	59	24,9652	51,5191	0,0259	0,2289
12	98,9966	1,0034	27	55	4	60	25,0009	51,6605	0,0401	0,2675
13	98,4540	1,5460	27	55	4	60	25,1386	52,2031	0,0618	0,4184
14	99,7743	0,2257	28	55	1	57	24,8060	50,8828	0,0023	0,0589
15	99,3297	0,6703	28	55	2	58	24,9170	51,3274	0,0134	0,1770
16	87,2756	12,7244	24	48	22	72	28,3584	63,3815	2,8572	4,4565
17	97,1877	2,8123	27	54	6	61	25,4662	53,4694	0,16874	0,7875
18	99,6385	0,3615	28	55	2	58	24,8398	51,0186	0,0072	0,0946
19	99,2356	0,7644	28	55	3	59	24,9406	51,4215	0,0229	0,2024
20	99,3407	0,6594	28	55	4	60	24,9143	51,3165	0,0264	0,1741
21	98,9978	1,0022	27	55	5	61	25,0006	51,6593	0,05011	0,2672
22	73,4013	26,5987	20	41	47	89	33,7188	77,2558	12,4852	11,5803
23	97,6613	2,3387	27	54	4	59	25,3427	52,9958	0,0935	0,6467
24	89,7632	10,2368	25	50	18	69	27,5725	60,8939	1,8493	3,4110
25	53,8119	46,1881	15	30	82	112	45,9936	96,8452	37,6472	23,4874
26	99,3026	0,6974	28	55	1	57	24,9238	51,3545	0,0086	0,1843
27	54,8023	45,1977	15	30	80	111	45,1623	95,8548	36,0499	22,9118
28	97,9177	2,0823	27	54	4	59	25,2763	52,7394	0,0833	0,5719
29	98,5357	1,4643	27	55	3	58	25,1178	52,1214	0,0378	0,3954
30	99,5330	0,4671	28	55	1	57	24,8661	51,1242	0,0038	0,1226
31	99,2162	0,7838	28	55	1	58	24,9455	51,4409	0,0108	0,2077
32	98,2237	1,7763	27	55	2	58	25,1976	52,4334	0,0355	0,4838
33	94,8078	5,1922	26	53	9	63	26,1054	55,8493	0,4757	1,5444
34	71,9974	28,0026	20	40	49	90	34,3762	78,6597	13,8379	12,4005
35	93,4698	6,5302	26	52	12	64	26,4791	57,1873	0,7525	2,0053
36	99,5476	0,4524	28	55	1	57	24,8625	51,1095	0,0036	0,1187
37	99,1860	0,8140	28	55	2	58	24,9531	51,4711	0,0163	0,2159
38	98,7227	1,2773	27	55	3	59	25,0702	51,9344	0,0383	0,3431
39	73,3030	26,6970	20	41	47	89	33,7640	77,3541	12,5776	11,6372
40	99,2467	0,7533	28	55	2	58	24,9379	51,4104	0,0151	0,1994
41	98,0894	1,9106	27	54	3	59	25,2321	52,5677	0,0644	0,5223
42	98,1782	1,8218	27	55	3	59	25,2093	52,4789	0,0586	0,4968
43	98,1302	1,8698	27	55	3	59	25,2216	52,5269	0,0617	0,5106

44	99,3018	0,6982	28	55	1	57	24,9240	51,3553	0,0086	0,1845
45	99,7728	0,2272	28	55	1	57	24,8064	50,8843	0,0023	0,0593
46	98,5044	1,4956	27	55	3	58	25,1258	52,1527	0,0395	0,4042
47	98,4663	1,5337	27	55	2	58	25,1355	52,1908	0,0307	0,4150
48	97,9877	2,0123	27	54	4	59	25,2583	52,6694	0,0805	0,5516
49	99,1495	0,8505	28	55	2	58	24,9623	51,5076	0,0128	0,2258
50	98,3760	1,6240	27	55	3	59	25,1586	52,2811	0,0465	0,4405
1	95,2646	4,7354	26	53	8	62	25,9803	55,3925	0,3957	1,3928
2	96,5602	3,4398	27	54	6	61	25,6317	54,0969	0,2088	0,9791
3	97,3354	2,6646	27	54	5	60	25,4275	53,3217	0,1253	0,7433
4	99,8270	0,1730	28	55	1	57	24,7929	50,8301	0,0017	0,0450
5	97,9404	2,0596	27	54	4	59	25,2705	52,7167	0,0749	0,5653
6	99,4388	0,5612	28	55	1	57	24,8897	51,2183	0,0056	0,1478
7	99,8010	0,1990	28	55	1	57	24,7993	50,8561	0,0020	0,0519
8	98,1866	1,8135	27	55	3	59	25,2071	52,4706	0,0580	0,4944
9	96,0438	3,9562	27	53	7	61	25,7695	54,6133	0,2762	1,1411
10	95,9495	4,0505	27	53	7	61	25,7948	54,7076	0,28953	1,1711
11	96,6676	3,3324	27	54	6	61	25,6032	53,9895	0,1960	0,9459
12	96,7810	3,2190	27	54	6	60	25,5732	53,8761	0,1829	0,9111
13	96,4042	3,5958	27	54	6	61	25,6731	54,2529	0,2282	1,0277
14	95,9992	4,0008	27	53	7	61	25,7815	54,6579	0,28247	1,1553
15	95,7384	4,2616	27	53	8	62	25,8517	54,9187	0,3205	1,2387
16	99,8749	0,1251	28	55	1	57	24,7810	50,7822	0,0013	0,0325
17	99,7738	0,2262	28	55	1	57	24,8061	50,8833	0,0023	0,0590
18	99,0221	0,9779	28	55	2	58	24,9944	51,6350	0,0169	0,2605
19	97,8430	2,1570	27	54	4	59	25,2956	52,8141	0,0821	0,5936
20	97,7807	2,2193	27	54	4	59	25,3117	52,8764	0,0869	0,6117
21	96,7572	3,2428	27	54	6	60	25,5795	53,8999	0,1856	0,9184
22	74,7678	25,2322	21	42	45	87	33,1025	75,8893	11,2352	10,7961
23	96,6071	3,3929	27	54	6	61	25,6192	54,0500	0,2031	0,9646
24	54,2145	45,7855	15	30	81	112	45,6520	96,4426	36,9937	23,2547
25	99,3717	0,6283	28	55	1	57	24,9065	51,2854	0,0063	0,1657
26	99,5282	0,4718	28	55	1	57	24,8673	51,1289	0,0039	0,1239
27	29,7626	70,2374	8	17	1	19	83,1580	120,8945	0,7024	26,5051
28	99,8411	0,1589	28	55	1	57	24,7894	50,8160	0,0016	0,0414
29	99,2559	0,7441	28	55	1	57	24,9356	51,4012	0,0098	0,1969
30	96,1867	3,8133	27	53	7	61	25,7312	54,4704	0,2566	1,0959
31	99,7891	0,2109	28	55	1	57	24,8023	50,8680	0,0021	0,0550
32	93,5989	6,4011	26	52	11	64	26,4426	57,0582	0,7231	1,9597
33	99,4838	0,5163	28	55	1	57	24,8784	51,1734	0,0047	0,1357
34	92,5875	7,4125	26	51	13	66	26,7315	58,0696	0,9696	2,3229
35	95,4576	4,5424	27	53	8	62	25,9277	55,1995	0,3641	1,3296
36	94,8631	5,1369	26	53	9	63	26,0902	55,7940	0,4657	1,5259
37	95,0388	4,9612	26	53	9	63	26,0420	55,6183	0,4344	1,4673
38	97,0970	2,9030	27	54	5	60	25,4900	53,5601	0,1487	0,8149
39	96,8020	3,1980	27	54	6	60	25,5677	53,8551	0,1805	0,9046
40	96,6849	3,3151	27	54	6	61	25,5986	53,9722	0,1939	0,9406

41	97,4338	2,5662	27	54	5	60	25,4019	53,2233	0,1162	0,7140
42	95,2973	4,7027	26	53	8	62	25,9714	55,3598	0,3903	1,3821
43	95,9124	4,0876	27	53	7	61	25,8048	54,7447	0,2949	1,1829
44	99,9100	0,0900	28	56	1	58	24,7723	50,7471	0,0009	0,0234
45	98,9979	1,0021	27	55	2	58	25,0005	51,6592	0,01772	0,2671
46	97,2451	2,7549	27	54	5	60	25,4512	53,4120	0,1339	0,7703
47	99,3014	0,6986	28	55	1	57	24,9241	51,3557	0,0086	0,1846
48	99,0043	0,9957	28	55	2	58	24,9989	51,6528	0,0175	0,2654
49	99,7723	0,2277	28	55	1	57	24,8065	50,8848	0,0023	0,0594
50	99,8504	0,1496	28	55	1	57	24,7871	50,8067	0,0015	0,0389
1	98,5765	1,4236	27	55	3	58	25,1074	52,0807	0,0358	0,3840
2	97,4277	2,5723	27	54	5	60	25,4034	53,2294	0,1168	0,7158
3	97,0639	2,9361	27	54	5	60	25,4987	53,5932	0,1521	0,8249
4	96,2888	3,7112	27	53	7	61	25,7039	54,3683	0,2431	1,0638
5	96,6058	3,3942	27	54	6	61	25,6196	54,0513	0,2033	0,9650
6	96,9375	3,0625	27	54	5	60	25,5319	53,7196	0,1655	0,8633
7	96,7193	3,2807	27	54	6	61	25,5895	53,9378	0,1899	0,9300
8	96,9430	3,0570	27	54	5	60	25,5305	53,7141	0,1649	0,8616
9	95,7271	4,2729	27	53	8	62	25,8548	54,9300	0,3222	1,2424
10	95,2330	4,7670	26	53	8	62	25,9889	55,4241	0,4010	1,4032
11	98,7401	1,2599	27	55	2	58	25,0658	51,9170	0,0280	0,3383
12	98,8928	1,1072	27	55	2	58	25,0271	51,7643	0,0216	0,2960
13	99,0099	0,9902	28	55	2	58	24,9975	51,6473	0,0173	0,2639
14	99,3996	0,6004	28	55	1	57	24,8995	51,2575	0,0064	0,1582
15	98,2720	1,7280	27	55	3	59	25,1852	52,3851	0,0527	0,4700
16	98,7083	1,2917	27	55	2	58	25,0739	51,9488	0,0294	0,3471
17	97,9995	2,0005	27	54	4	59	25,2552	52,6576	0,0706	0,5482
18	96,4180	3,5820	27	54	6	61	25,6695	54,2391	0,2264	1,0234
19	96,8785	3,1215	27	54	6	60	25,5475	53,7786	0,1720	0,8812
20	94,0178	5,9822	26	52	11	64	26,3248	56,6393	0,6315	1,8135
21	95,8768	4,1232	27	53	7	62	25,8144	54,7803	0,3000	1,1943
22	99,6189	0,3811	28	55	1	57	24,8447	51,0382	0,0026	0,0998
23	99,7869	0,2131	28	55	1	57	24,8029	50,8702	0,0021	0,0555
24	98,2838	1,7162	27	55	3	59	25,1822	52,3733	0,0520	0,4667
25	98,0129	1,9871	27	54	4	59	25,2518	52,6442	0,0697	0,5443
26	98,1289	1,8711	27	55	3	59	25,2219	52,5282	0,0618	0,5109
27	99,2188	0,7812	28	55	1	58	24,9449	51,4383	0,0108	0,2070
28	99,0877	0,9123	28	55	2	58	24,9779	51,5694	0,0147	0,2426
29	99,8119	0,1881	28	55	1	57	24,7966	50,8452	0,0019	0,0490
30	98,6859	1,3141	27	55	2	58	25,0796	51,9712	0,0305	0,3534
31	94,4358	5,5642	26	52	10	63	26,2083	56,2213	0,5464	1,6700
32	93,0197	6,9803	26	52	12	65	26,6073	57,6374	0,8598	2,1660
33	99,2736	0,7264	28	55	1	57	24,9311	51,3835	0,0093	0,1922
34	73,3765	26,6235	20	41	47	89	33,7301	77,2806	12,5084	11,5947
35	99,9754	0,0246	28	56	1	58	24,7561	50,6817	0,0002	0,0064
36	95,4756	4,5244	27	53	8	62	25,9229	55,1815	0,3612	1,3238
37	95,8769	4,1231	27	53	1	55	25,8144	54,7802	0,0412	1,1943

38	96,0879	3,9121	27	53	7	61	25,7577	54,5692	0,2701	1,1271
39	96,1601	3,8399	27	53	7	61	25,7383	54,4970	0,2602	1,1043
40	99,2179	0,7821	28	55	1	58	24,9451	51,4392	0,0108	0,2072
41	98,9237	1,0763	27	55	2	58	25,0193	51,7334	0,0204	0,2875
42	74,8210	25,1790	21	42	44	87	33,0789	75,8361	11,1879	10,7658
43	54,2239	45,7761	15	30	81	112	45,6441	96,4332	36,9786	23,2493
44	95,0877	4,9123	26	53	9	62	26,0286	55,5694	0,4258	1,4511
45	99,7293	0,2707	28	55	1	57	24,8172	50,9278	0,0027	0,0707
46	99,2314	0,7686	28	55	1	57	24,9417	51,4257	0,0104	0,2036
47	99,1089	0,8911	28	55	2	58	24,9725	51,5482	0,0140	0,2368
48	98,3820	1,6180	27	55	3	59	25,1570	52,2751	0,0462	0,4388
49	98,2882	1,7118	27	55	3	59	25,1810	52,3689	0,0517	0,4654
50	98,3327	1,6673	27	55	3	59	25,1697	52,3244	0,0491	0,4527



**ANEXO N° 6.: En el presente anexo se muestran los porcentajes de DNA distribuidos para cada uno de los cometas medidos en el control positivo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 umol por el Ensayo Cometa.**

N°	Head DNA %	Tail DNA %	Head Radius	Head Length	Tail Length	Comet Length	Head Mean X	Tail Mean X	Tail Moment	Olive Tail Moment
1	73,8660	26,1340	21	41	46	88	33,5066	76,7911	12,0527	11,3120
2	73,4673	26,5327	20	41	47	89	33,6885	77,1898	12,4233	11,5421
3	72,6836	27,3164	20	40	48	90	34,0517	77,9735	13,1680	11,9979
4	72,6121	27,3879	20	40	48	90	34,0852	78,0450	13,2370	12,0396
5	73,2864	26,7136	20	41	47	89	33,7716	77,3707	12,5932	11,6469
6	72,6509	27,3491	20	40	48	90	34,0670	78,0062	13,1995	12,0170
7	71,0129	28,9871	20	39	51	92	34,8528	79,6442	14,8280	12,9837
8	73,0108	26,9892	20	41	48	89	33,8991	77,6463	12,8544	11,8070
9	72,8658	27,1342	20	40	48	89	33,9666	77,7913	12,9929	11,8915
10	75,5057	24,4943	21	42	43	86	32,7790	75,1514	10,5877	10,3788
11	73,5351	26,4649	20	41	47	89	33,6574	77,1220	12,3598	11,5029
12	75,6089	24,3911	21	42	43	86	32,7342	75,0482	10,4987	10,3208
13	75,5663	24,4337	21	42	43	86	32,7527	75,0908	10,5354	10,3448
14	75,0735	24,9265	21	42	44	87	32,9677	75,5836	10,9647	10,6227
15	75,5807	24,4193	21	42	43	86	32,7465	75,0764	10,5230	10,3367
16	76,6132	23,3868	21	43	41	85	32,3051	74,0439	9,6519	9,7614
17	95,4278	4,5722	27	53	8	62	25,9358	55,2293	0,3689	1,3394
18	73,9770	26,0230	21	41	46	88	33,4563	76,6801	11,9505	11,2481
19	72,3875	27,6125	20	40	49	90	34,1910	78,2696	13,4550	12,1712
20	73,8846	26,1154	21	41	46	88	33,4982	76,7725	12,0355	11,3013
21	75,6993	24,3007	21	42	43	86	32,6952	74,9578	10,4210	10,2701
22	74,9172	25,0828	21	42	44	87	33,0365	75,7399	11,1026	10,7112
23	95,0143	4,9857	26	53	9	63	26,0487	55,6428	0,4387	1,4755
24	74,4740	25,5260	21	41	45	87	33,2331	76,1831	11,4984	10,9634
25	75,5935	24,4065	21	42	43	86	32,7409	75,0636	10,5120	10,3295
26	75,5538	24,4462	21	42	43	86	32,7581	75,1033	10,5462	10,3518
27	29,2124	70,7876	8	16	125	142	84,7243	121,4447	88,4274	25,9935
28	97,9961	2,0039	27	54	4	59	25,2561	52,6610	0,0709	0,5492
29	54,5844	45,4156	15	30	80	111	45,3426	96,0727	36,3984	23,0394
30	96,0452	3,9548	27	53	7	61	25,7691	54,6119	0,2760	1,1407
31	75,9503	24,0497	21	42	42	86	32,5871	74,7068	10,2068	10,1297
32	73,7578	26,2422	20	41	46	88	33,5558	76,8993	12,1527	11,3743
33	73,7659	26,2341	20	41	46	88	33,5521	76,8912	12,1452	11,3696
34	54,1701	45,8299	15	30	81	112	45,6894	96,4870	37,0655	23,2805
35	75,1147	24,8853	21	42	44	87	32,9496	75,5424	10,9284	10,5993
36	74,7282	25,2718	21	42	55	98	33,1200	75,9289	13,8995	10,8186
37	73,2030	26,7970	20	41	47	89	33,8101	77,4541	12,6720	11,6953
38	54,9969	45,0031	15	31	84	116	45,0025	95,6602	37,8026	22,7975
39	53,0788	46,9212	15	29	88	118	46,6288	97,5783	41,2907	23,9061
40	75,6481	24,3519	21	42	43	86	32,7173	75,0090	10,4650	10,2988
41	95,7230	4,2770	27	53	8	62	25,8559	54,9341	0,3228	1,2437
42	75,4499	24,5501	21	42	43	86	32,8032	75,2072	10,6360	10,4102
43	74,8402	25,1598	21	42	44	87	33,0705	75,8169	11,1709	10,7549

44	53,6821	46,3179	15	30	82	113	46,1048	96,9750	37,8591	23,5620
45	97,4497	2,5503	27	54	5	60	25,3977	53,2074	0,1148	0,7092
46	69,4933	30,5067	19	39	54	93	35,6149	81,1638	16,4234	13,8955
47	75,0864	24,9136	21	42	44	87	32,9620	75,5707	10,9533	10,6154
48	28,3375	71,6625	8	16	126	143	87,3401	122,3196	90,6267	25,0672
49	97,9999	2,0001	27	54	4	59	25,2551	52,6572	0,0706	0,5481
50	98,3454	1,6546	27	55	3	59	25,1664	52,3117	0,0483	0,4491
1	75,3820	24,6180	21	42	43	86	32,8328	75,2751	10,6949	10,4485
2	73,2648	26,7352	20	41	47	89	33,7816	77,3923	12,6136	11,6594
3	75,7058	24,2942	21	42	43	86	32,6924	74,9513	10,4155	10,2665
4	75,1223	24,8777	21	42	44	87	32,9463	75,5348	10,9218	10,5950
5	76,0483	23,9517	21	42	42	86	32,5451	74,6088	10,1238	10,0750
6	74,7400	25,2600	21	42	45	87	33,1148	75,9171	11,2600	10,8119
7	75,9403	24,0597	21	42	42	86	32,5914	74,7168	10,2153	10,1352
8	76,3015	23,6985	21	42	42	85	32,4371	74,3556	9,9109	9,9341
9	74,4989	25,5011	21	41	47	89	33,2220	76,1582	11,9855	10,9492
10	75,7548	24,2452	21	42	46	89	32,6712	74,9023	11,1528	10,2390
11	76,0103	23,9897	21	42	42	86	32,5614	74,6468	10,1560	10,0962
12	76,4760	23,5240	21	42	52	95	32,3631	74,1811	12,2325	9,8373
13	71,1849	28,8151	20	40	56	97	34,7686	79,4722	16,1365	12,8814
14	75,5346	24,4654	21	42	43	86	32,7665	75,1225	10,5628	10,3626
15	74,6308	25,3692	21	41	45	87	33,1633	76,0263	11,3576	10,8740
16	76,7862	23,2138	21	43	41	85	32,2323	73,8709	9,5096	9,6659
17	72,9424	27,0576	20	41	48	89	33,9309	77,7147	12,9197	11,8469
18	73,9741	26,0259	21	41	46	88	33,4577	76,6830	11,9532	11,2498
19	29,6129	70,3871	8	16	124	142	83,5784	121,0442	87,4296	26,3711
20	73,1078	26,8922	20	41	47	89	33,8541	77,5493	12,7622	11,7506
21	73,9988	26,0012	21	41	46	88	33,4465	76,6583	11,9305	11,2356
22	72,1322	27,8678	20	40	49	90	34,3120	78,5249	13,7050	12,3212
23	74,7919	25,2081	21	42	44	87	33,0918	75,8652	11,2138	10,7824
24	75,8058	24,1942	21	42	43	86	32,6492	74,8513	10,3299	10,2105
25	73,4243	26,5757	20	41	47	89	33,7082	77,2328	12,4635	11,5670
26	72,6072	27,3928	20	40	48	90	34,0875	78,0499	13,2417	12,0425
27	75,1001	24,8999	21	42	44	87	32,9560	75,5570	10,9413	10,6076
28	74,7274	25,2726	21	42	45	87	33,1204	75,9297	11,2713	10,8190
29	73,6531	26,3469	20	41	46	88	33,6035	77,0040	12,2499	11,4347
30	73,8884	26,1116	21	41	46	88	33,4965	76,7687	12,0320	11,2991
31	74,3683	25,6317	21	41	45	88	33,2803	76,2888	11,5938	11,0238
32	75,8714	24,1286	21	42	43	86	32,6210	74,7857	10,2739	10,1737
33	73,9469	26,0531	21	41	54	96	33,4700	76,7102	14,0687	11,2654
34	72,3004	27,6996	20	40	55	96	34,2322	78,3567	15,2348	12,2223
35	75,2363	24,7637	21	42	49	92	32,8964	75,4208	12,1342	10,5306
36	75,9529	24,0471	21	42	42	86	32,5860	74,7042	10,2046	10,1282
37	74,7100	25,2900	21	42	45	87	33,1281	75,9471	11,2868	10,8289
38	54,6482	45,3518	15	30	80	111	45,2897	96,0089	36,2962	23,0021
39	75,7086	24,2914	21	42	43	86	32,6911	74,9485	10,4130	10,2649
40	53,0571	46,9429	15	29	83	113	46,6479	97,6000	38,8877	23,9184

41	95,6674	4,3326	27	53	8	62	25,8709	54,9897	0,3313	1,2616
42	75,3529	24,6471	21	42	43	86	32,8455	75,3042	10,7202	10,4649
43	76,0211	23,9789	21	42	42	86	32,5568	74,6360	10,1469	10,0902
44	75,9314	24,0686	21	42	42	86	32,5952	74,7257	10,2229	10,1402
45	73,1586	26,8414	20	41	47	89	33,8306	77,4985	12,7140	11,7211
46	75,9567	24,0433	21	42	42	86	32,5844	74,7004	10,2014	10,1261
47	75,1631	24,8369	21	42	44	87	32,9284	75,4940	10,8859	10,5720
48	76,9384	23,0616	21	43	41	84	32,1686	73,7187	9,3854	9,5821
49	74,3751	25,6249	21	41	45	88	33,2773	76,2820	11,5877	11,0199
50	97,8243	2,1757	27	54	4	59	25,3005	52,8328	0,0835	0,5990
1	75,8079	24,1921	21	42	43	86	32,6483	74,8492	10,3281	10,2093
2	74,6669	25,3331	21	41	45	87	33,1472	75,9902	11,3253	10,8535
3	73,5167	26,4833	20	41	53	95	33,6658	77,1404	14,0361	11,5135
4	76,8393	23,1607	21	43	41	85	32,2101	73,8178	9,4662	9,6366
5	73,8535	26,1465	21	41	46	88	33,5123	76,8036	12,0642	11,3192
6	75,8888	24,1112	21	42	43	86	32,6135	74,7683	10,2591	10,1640
7	73,9652	26,0348	21	41	46	88	33,4617	76,6919	11,9614	11,2549
8	73,1190	26,8810	20	41	47	89	33,8489	77,5381	12,7516	11,7441
9	74,6068	25,3932	21	41	45	87	33,1739	76,0503	11,3791	10,8877
10	76,2811	23,7190	21	42	42	85	32,4458	74,3761	9,9280	9,9454
11	72,4311	27,5689	20	40	49	90	34,1704	78,2260	13,4125	12,1456
12	54,3502	45,6498	15	30	81	112	45,5380	96,3069	36,7748	23,1759
13	73,2062	26,7938	20	41	47	89	33,8086	77,4509	12,6690	11,6934
14	76,3477	23,6523	21	42	42	85	32,4175	74,3094	9,8724	9,9084
15	53,2485	46,7515	15	30	83	113	46,4802	97,4086	38,5712	23,8098
16	76,3128	23,6872	21	42	42	85	32,4323	74,3443	9,9015	9,9278
17	73,0765	26,9235	20	41	52	94	33,8686	77,5806	14,0002	11,7688
18	75,7217	24,2783	21	42	43	86	32,6855	74,9354	10,4018	10,2576
19	76,8603	23,1397	21	43	41	85	32,2013	73,7968	9,4490	9,6251
20	75,7035	24,2965	21	42	43	86	32,6933	74,9536	10,4174	10,2678
21	75,1761	24,8239	21	42	44	87	32,9227	75,4810	10,8746	10,5646
22	74,0178	25,9822	21	41	51	93	33,4379	76,6393	13,2509	11,2247
23	74,7625	25,2375	21	42	45	87	33,1048	75,8946	11,2399	10,7991
24	75,6950	24,3050	21	42	43	86	32,6970	74,9621	10,4247	10,2725
25	76,7227	23,2773	21	43	41	85	32,2590	73,9344	9,5617	9,7009
26	75,4970	24,5030	21	42	43	86	32,7828	75,1601	10,5953	10,3837
27	76,8856	23,1144	21	43	41	85	32,1907	73,7715	9,4284	9,6112
28	73,7247	26,2753	20	41	49	91	33,5708	76,9324	12,8749	11,3934
29	74,7601	25,2399	21	42	48	91	33,1059	75,8970	12,1152	10,8004
30	74,0967	25,9033	21	41	46	88	33,4023	76,5604	11,8408	11,1794
31	99,9980	0,0020	28	56	1	58	24,7505	50,6591	0,0000	0,0005
32	99,2075	0,7925	28	55	3	59	24,9477	51,4496	0,0238	0,2100
33	97,0177	2,9823	27	54	5	60	25,5108	53,6394	0,1570	0,8389
34	29,0191	70,9809	8	16	125	142	85,2887	121,6380	88,9110	25,8011
35	54,7689	45,2311	15	30	80	111	45,1899	95,8882	36,1033	22,9314
36	74,7579	25,2421	21	42	45	87	33,1069	75,8992	11,2441	10,8017
37	76,0107	23,9893	21	42	42	86	32,5612	74,6464	10,1556	10,0959

38	73,7305	26,2695	20	41	50	92	33,5682	76,9266	13,1348	11,3900
39	74,3485	25,6515	21	41	45	88	33,2892	76,3086	11,6118	11,0351
40	73,5752	26,4248	20	41	53	95	33,6391	77,0819	14,0051	11,4797
41	72,5398	27,4602	20	40	54	95	34,1192	78,1173	14,8285	12,0820
42	76,3541	23,6459	21	42	45	88	32,4148	74,3030	10,6407	9,9049
43	75,7686	24,2314	21	42	43	86	32,6652	74,8885	10,3617	10,2313
44	73,0178	26,9822	20	41	50	92	33,8958	77,6393	13,4911	11,8029
45	74,0769	25,9231	21	41	46	88	33,4112	76,5802	11,8589	11,1907
46	75,7690	24,2310	21	42	43	86	32,6651	74,8881	10,3613	10,2311
47	76,2668	23,7332	21	42	42	85	32,4519	74,3903	9,9400	9,9533
48	75,1761	24,8239	21	42	44	87	32,9227	75,4810	10,8746	10,5646
49	78,3481	21,6519	22	44	38	83	31,5898	72,3090	8,2730	8,8165
50	74,0718	25,9282	21	41	46	88	33,4135	76,5853	11,8636	11,1937





UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA  
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



“AÑO DE LA INVERSION PARA EL DESARROLLO RURAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA”

CONSTANCIA N° 015-2013-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.


HACE CONSTAR:

Que la muestra de frutos presentada por la Srta. Soany Alanoca Coaquira, egresada de la Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica de la Universidad Católica de Santa María, para la Ejecución de su Tesis: “**Determinacion de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos del fruto de *Corryocactus brevistylus* (Sankallo)**”. Las muestras fueron traídas al Laboratorio de Botánica al estado fenológico fresco, de la localidad de Caylloma (Colca) para su determinación en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) y corresponde a la especie:

***Corryocactus brevistylus* ( Schumann ex Vaupel) Briton & Rose. “Sankallo ”**

Se expide la presente solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.

Arequipa 14 de Junio del 2013.

  
Blgo. Leoncio Mariño Herrera  
DIRECTOR  
*Herbarium Arequipense* (HUSA)

