

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Evaluación de la actividad genoprotectora de un extracto acuoso de *Petiveria alliacea* (anamú) frente a la radiación ultravioleta (UV).

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Byron Ariel Briones Avilés

Jacqueline de los Ángeles Ortiz Bueno

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a mis padres que han sido los pilares fundamentales de mi vida, a mis hermanos que siempre me han apoyado, en especial a Fausto por motivarme siempre a seguir adelante y estar enfocado en mis objetivos. A mis amigos Alyssa y María Belén por siempre creer en mí. Finalmente, a todos aquellos que han formado parte de mi vida y carrera y han aportado para que esto sea posible.

Byron Ariel Briones Aviles

El presente proyecto lo dedico a mis principales motores en la vida Clemencia Diocelina Chalén León, Luis Enrique Bueno Cano y Elizabeth María Bueno Chalén.

Jacqueline de los Ángeles Ortiz Bueno

AGRADECIMIENTOS

Agradecer primero a Dios por permitirme cumplir mis objetivos y guiarme en el camino. A mi tutor, Julio Bonilla PhD., por confiar en mí y darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto. A la Analista Tatiana Chávez M.Sc. por compartirme sus conocimientos y experiencias en el laboratorio. Finalmente, a la ESPOL y al CIBE por su aporte a mi formación profesional e inculcar en mí el sentido de la investigación.

Byron Ariel Briones Avilés

Mis más sinceros agradecimientos a mis hermanas Jazmin Arreaga Bueno y Stefania Ortiz Bueno que con cada gesto de amor reconfortaban mi día a día. A mis Tíos amados Carlos Bueno, Enrique Bueno y Gabriela Castro. Mis primos Jaslene, Gabriel y Saskia quienes fueron parte de mi empeño y arranque para seguir adelante. A mi padre Franklin Ortiz por haberme dado la oportunidad de vivir y convertirme en lo que siempre quise ser "Bióloga". Adicional quiero agradecerle al Ing. Paul Guzmán y la Blga Aida Vacacela por darme la oportunidad de culminar con éxito esta etapa universitaria.

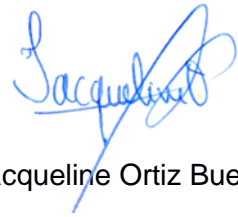
Jacqueline de los Ángeles Ortiz Bueno

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Byron Ariel Briones Avilés* y *Jacqueline de los Ángeles Ortiz Bueno* damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



Byron Briones Avilés



Jacqueline Ortiz Bueno

EVALUADORES

Diego Arturo Gallardo Polit
PROFESOR DE LA MATERIA

Julio Andrés Bonilla Jaime
PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El uso de protectores solares es una medida eficaz para prevenir el desarrollo de enfermedades a la piel relacionadas con la exposición a radiación solar, sin embargo, estas formulaciones a largo plazo pueden causar toxicidad al bioacumularse en humanos, además tienen un impacto negativo en el ambiente. Por consiguiente, se deben investigar nuevos compuestos fotoprotectores, especialmente de origen vegetal. Algunos estudios han determinado que *P. alliacea* tiene altos contenidos de flavonoides, que son compuestos capaces de absorber la radiación UV. Por esto se ha propuesto evaluar la actividad genoprotectora de un extracto acuoso de esta planta frente a la luz ultravioleta (UV). El diseño del estudio implicó un ensayo de genotoxicidad y fotoprotección en donde se expuso ADN plasmídico (pGEM-T vector) frente a radiación UVC en presencia de diferentes concentraciones del extracto acuoso de *P. alliacea*. La capacidad fotoprotectora se evaluó mediante técnicas de PCR para cuantificar el daño en el ADN. Los resultados obtenidos indican que el extracto tiene un rango seguro de usar entre el 0.1% y 10%, además se determinó que a una concentración de 2.5% el extracto tiene su máxima eficacia de fotoprotección. Bajo las condiciones de este experimento se puede concluir que el extracto acuoso de Anamú tiene el potencial de convertirse en un agente fotoprotectante del ADN para aplicarlo en la industria dermocosmética como una alternativa eco-amigable.

Palabras Clave: Fotoprotección, genotoxicidad, ADN plasmídico, Extracto acuoso

ABSTRACT

*The use of sunscreens is an effective measure to prevent the development of skin diseases related to exposure to solar radiation, but these long-term formulations can cause toxicity by bioaccumulating in humans and have a negative impact on the environment. As a result, new photoprotective compounds, especially of plant origin. Some studies have found that *P. alliacea* has high levels of flavonoids, which are compounds capable of absorbing UV radiation. For this reason, it has been proposed to evaluate the genoprotective activity of an aqueous extract of this plant against ultraviolet (UV) radiation. The study design involved a genotoxicity and photoprotection assay, in which plasmid DNA (pGEM T vector) was exposed to UVC radiation in the presence of different concentrations of the aqueous extract of *P. alliacea*. The photoprotective capacity of the extract was evaluated using PCR techniques to quantify DNA damage. The results show that the extract has a safe range to use between 0.1% and 10%, and the maximum peak of protection offered by the extract is at a concentration of 2.5%. Under the conditions of this experiment, it can be concluded that the aqueous extract of Anamú has the potential to become a DNA photoprotective agent to be applied in the dermocosmetics industry as an eco-friendly alternative.*

Keywords: *Photoprotection, genotoxicity, plasmid DNA, aqueous extract*

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	5
RESUMEN.....	I
<i>ABSTRACT</i>	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS	V
SIMBOLOGÍA	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
CAPÍTULO 1	9
1. Introducción	9
1.1 Descripción del problema	10
1.2 Justificación del problema.....	10
1.3 Objetivos.....	11
1.3.1 Objetivo General	11
1.3.2 Objetivos Específicos	11
1.4 Marco teórico	11
1.4.1 Radiación Ultravioleta	11
1.4.2 Daños al ADN producidos por exposición a radiación UV.....	11
1.4.3 Protección de la piel contra la luz UV.....	13
1.4.4 Extractos de plantas con capacidad genoprotectora.....	13
1.4.5 <i>Petiveria alliacea</i> (Anamú)	15
1.4.6 Métodos in vitro para evaluar la capacidad genoprotectora.....	16
CAPÍTULO 2.....	17
2. Metodología	17

2.1	Recolección de las muestras	17
2.2	Obtención del extracto acuoso	17
2.3	Prueba bioquímica de flavonoides.....	17
2.4	Cuantificación de fenoles y flavonoides totales.	18
2.5	Extracción de plásmidos	18
2.6	Calidad y concentración de plásmido	18
2.7	Ensayo de genotoxicidad.....	19
2.8	Electroforesis	19
2.9	Ensayo de genoprotección contra la luz UV	20
2.10	Evaluación de la actividad fotoprotectora.	20
2.10.1	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	20
2.10.2	PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	21
2.10.3	Cuantificación de intensidad de bandas.....	22
CAPÍTULO 3.....		23
3.	Resultados Y ANÁLISIS.....	23
3.1	Prueba bioquímica de flavonoides.....	23
3.2	Contenido de fenoles y flavonoides totales.....	23
3.3	Ensayo de genotoxicidad.....	25
3.3.1	Ensayo de Fotoprotección.....	27
3.3.2	Evaluación mediante qPCR.	29
CAPÍTULO 4.....		32
4.	Conclusiones Y Recomendaciones.....	32
4.1	Conclusion	32
4.2	Recomendaciones	32
BIBLIOGRAFÍA		33
APÉNDICE.....		38

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
WMO	World Meteorological Organization
FDA	Food & Drug Administration
SOLCA	Sociedad de Luchas contra el Cáncer
UV	Ultravioleta
UVI	Índice de radiación ultravioleta
ADN	Ácido desoxirribonucleico
FPS	Factor de Protección Solar
EP.a	Extracto de <i>Petiveria alliacea</i>
CPD	Dímero de pirimidina de Ciclobutano
(6-4PP)	Fotoproductos de pirimidina – pirimidona (6 – 4)
ROS	Especies reactivas de oxígeno
UV-VIS	Espectrofotometría ultravioleta visible
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
GAE	Equivalentes de ácido gálico
QE	Equivalentes de quercetina
LOD	Límite de detección
TAE	Tris-Acetate-EDTA buffer
NET	NaCl-EDTA-Tris buffer
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
X-GAL	(5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido)

SIMBOLOGÍA

mg	Miligramo
m	Metro
V	Voltio
nm	Nanómetro
%	Porcentaje
g	Gramo
mL	Mililitro
rpm	Revoluciones por minuto
°C	Grado centígrado
µm	micrómetro
N	Normal
Kg	Kilogramo
µL	Microlitro
ng	nanogramo
v/v	porcentaje en volumen
mM	milimolar
mAh	miliamperios
min	minuto
λ	Lambda
cm	centímetro
ΔRn	Intensidad de fluorescencia normalizada
R ²	Coeficiente de determinación
L	Litro
pb	pares de bases

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Fotolesiones directas e indirectas en el ADN por radiación UV. (Berens & Molinier, 2020)	12
Figura 1.2. Estructura de flavonoides con capacidad de protección UV	14
Figura 1.3. <i>Petiveria alliacea</i> (Anamú) [Elaboración propia]	15
Figura 1.4. Formas estructurales del ADN plasmídico. (Meydan et al., 2020)	16
Figura 2.1. Diseño del ensayo de fotoprotección. [Elaboración propia]	20
Figura 2.2. <i>Condiciones del termociclador para PCR de M13</i>	21
Figura 3.1. Test fitoquímico para detección de flavonoides en un extracto acuoso. ...	23
Figura 3.2. Efecto genotóxico del extracto acuoso de <i>P. alliacea</i> sobre plásmido pGEM T durante 30 min. El control positivo (C+) es plásmido incubado en H ₂ O ₂ . Form I: conformación superenrollada, Form II: forma circular relajada y Form III: plásmido lineal.	25
Figura 3.3. Evaluación semicuantitativa de los efectos del extracto acuoso de <i>P. alliacea</i> sobre ADN plasmídico del pGEM-T vector. Las barras gráficas representan mediciones densitométricas de ADN por ImageJ.	26
Figura 3.4. Gel de agarosa (1.5%) para productos PCR M13 a partir de ADN plasmídico pGEM T irradiado con UV. Carriles (-): Control sin exposición a UV. Carriles (+): con exposición a UV. C- es plásmido sin extracto y sin exposición UV. C+ es plásmido sin extracto con exposición UV. PCR- son control de contaminación de reactivos.	27
Figura 3.5. Evaluación semicuantitativa del efecto fotoprotector del extracto de <i>P. alliacea</i> sobre ADN plasmídico pGEM-T vector medido de a través de PCR. Las barras gráficas representan mediciones densitométricas de ADN por ImageJ.	28
Figura 3.6. Curva de amplificación (ΔR_n vs Ciclos) qPCR de plantillas M13 del plásmido pGEM T irradiadas con UV.	29
Figura 3.7. Diferencia de concentración (ng) de ADN plasmídico antes y después de ser expuestas a UV.	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Clasificación de valores FPS en protectores solares.	13
Tabla 3.1. Valoración cuantitativa de fenoles y flavonoides presentes en el extracto acuoso de hojas de <i>Petiveria alliacea</i>	24
Tabla 3.2. Componentes de las curvas de calibración.	24
Tabla 3.3 Resultado de la cuantificación (ng) de las muestras antes y después de la exposición a radiación UV mediante la curva estándar.	31

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 30 años, el agotamiento de la capa de ozono ha resultado en un aumento en la cantidad promedio de luz ultravioleta (UV) que llega a la superficie de la Tierra. (World Meteorological Organization (WMO), 2022). Este escenario se ha asociado con la emisión de clorofluorocarbonos a la atmósfera producto de actividades industriales (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2014). En los seres vivos la exposición constante y excesiva a los rayos UV induce modificaciones estructurales en el ADN, respuestas inflamatorias y estrés oxidativo que se correlacionan con efectos nocivos a la piel, como eritemas (quemaduras), fotoenvejecimiento y cáncer (Collantes, 2015).

La piel humana a nivel celular ha desarrollado diferentes mecanismos de defensa contra la radiación UV, por ejemplo, la producción de melanina (Brenner & Hearing, 2008). Sin embargo, niveles altos de exposición no pueden ser tolerados y por lo tanto la protección de la piel debe ser mediada por el uso de agentes fotoprotectores tópicos. En este sentido y dada la tendencia actual del uso de productos naturales amigables con el medio ambiente, se han investigado compuestos de origen vegetal (fitocompuestos) como potenciales agentes fotoprotectores con capacidad de absorber o reflejar la radiación UV (Torres-Contreras et al., 2022).

Diversos compuestos fenólicos como los flavonoides absorben la radiación ultravioleta (UV) del espectro de la luz y se ha informado que tienen el potencial de actuar como filtros UV (Fuentes Lorenzo, 2019). Bajo este contexto se propone evaluar la capacidad fotoprotectora del ADN de un extracto acuoso de *Petiveria alliacea* de la familia Phytolaccaceae dado que se ha reportado en investigaciones previas altos contenidos de flavonoides, además de capacidad antioxidante (De Sousa et al., 1990; Urueña et al., 2008a), y así lograr aplicaciones potenciales de este extracto en la industria cosmética y la biomedicina.

1.1 Descripción del problema

Según los datos presentados por SOLCA (2018), el cáncer de piel no melanoma está entre los cinco cánceres con mayor incidencia en Ecuador. La razón de esto puede ser la ubicación del país en latitudes bajas, donde la radiación solar llega de forma perpendicular, por ende, los niveles de radiación UV son muy elevados que incluso han superado en algunas ciudades el máximo permitido (8 UVI) según la OMS (2003). En consecuencia, la población está predispuesta a desarrollar afecciones en la piel, incluido el cáncer.

Esta situación constituye un problema de salud pública debido a que la luz UV es uno de los agentes genotóxico y mutagénico físicos más importante. Para prevenir los daños causados por la excesiva exposición a la radiación UV, el uso de protectores o cremas solares es una medida de precaución eficaz. Sin embargo, estas formulaciones químicas a largo plazo pueden causar toxicidad al bioacumularse en los humanos y también tiene impacto en el medio ambiente (Chatzigianni et al., 2022). Por el contrario, las sustancias naturales y de origen vegetal son de bajo riesgo y se consideran recursos potenciales de protección solar ya que absorben la radiación UV, además que tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas.

1.2 Justificación del problema

La conciencia pública de la necesidad del uso de agentes de protección solar ha impulsado el crecimiento de la industria dermocosmética preventiva. Las mejoras que se pueden realizar en estos productos incluyen la reducción de compuestos químicos para incluir alternativas más ecológicas, como los fitocompuestos. Por ejemplo, los extractos de plantas ricos en flavonoides son capaces de absorber la luz ultravioleta en las longitudes de onda UV-B y UV-A, por lo tanto, tienen un potencial uso en formulaciones de protección solar (Bosch et al., 2015). *P. alliacea*, más conocida como anamú es una planta medicinal rica en flavonoides como astilbina, miricitrina, engeletina, entre otros (De Sousa et al., 1990). Investigaciones con extractos de esta planta han demostrado su potencial antígenotóxico frente a agentes químicos (Gagliardi, 2014), pero no físicos como la radiación UV, es por esto por lo que se plantea este proyecto.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar un extracto acuoso de *P. alliacea* frente a la radiación UV, mediante ensayos *in vitro* en ADN plasmídico para la determinación de su potencial efecto genoprotector.

1.3.2 Objetivos Específicos

- i. Obtener un extracto acuoso de *P. alliacea* mediante extracción sólido-líquido discontinua.
- ii. Evaluar la genotoxicidad del extracto acuoso de *P. alliacea* en ADN plasmídico mediante electroforesis.
- iii. Determinar el rango de concentraciones del extracto acuoso que confieren genoprotección contra la radiación UV.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Radiación Ultravioleta

La radiación ultravioleta (UV) forma parte del espectro de la luz solar y abarca longitudes de onda de 100 a 400 nm (Blaustein & Searle, 2013). A su vez, la UV se subdivide en tres tipos: La UVA (320 – 400 nm) que alcanza la superficie terrestre sin ser absorbida por la atmósfera, la radiación UVB (280 a 320 nm) y la radiación UVC (100 – 280 nm) que es la más intensa de las tres, pero está completamente bloqueada por la capa de ozono (Schuch et al., 2009; Takahashi & Ohnishi, 2004). A pesar de que la radiación UV representa únicamente el 5% del espectro electromagnético, es de suma importancia dado que la exposición prolongada a esta puede inducir alteraciones en el ADN de los organismos vivos.

1.4.2 Daños al ADN producidos por exposición a radiación UV

La radiación ultravioleta puede ocasionar fotolesiones directas e indirectas en la molécula de ADN. En el primer caso los daños incluyen la configuración de dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPD) y los foto-productos de pirimidina-pirimidona (6-4) (6-4PP) por absorción directa de energía de fotones de luz UVB (Figura 1.1) (Douki, 2020; González-Púmariega et al., 2009). Los CPD afectan a

una sola hebra del ADN y se dan por la formación de enlaces covalentes entre dos pirimidinas adjuntas, por lo general timinas (T-T) y con menor frecuencia entre C-T y C-C (Vink & Roza, 2001). Por otra parte, los foto-productos 6-4 Y 6-4PP frecuentemente causan cambios de timinas a citocinas en sus extremos 3' (LeClerc et al., 1991). Estas alteraciones provocan una torcedura estructural en el ADN que interrumpen los procesos de transcripción y replicación, lo que subsecuentemente conduce a mutaciones y cáncer.

Por otra parte, las fotolesiones indirectas son inducidas por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) incluyendo superóxido [O_2^-], oxígeno singlete, radicales hidroxilos [OH], y peróxido de hidrógeno [H_2O_2] que pueden tener diferentes orígenes (Carvajal, 2019). Por ejemplo, la radiación ultravioleta puede afectar los sitios de unión del H_2O_2 a la enzima catalasa, también puede causar una reducción de los niveles de expresión de la proteína cinasa C, lo que conduce a una mayor producción de ROS (Jager et al., 2017). Cuando los mecanismos de defensa antioxidantes del cuerpo no pueden neutralizar este exceso de radicales libres, se desarrolla el estrés oxidativo y que trae como consecuencia la fragmentación monocatería o completa del ADN.

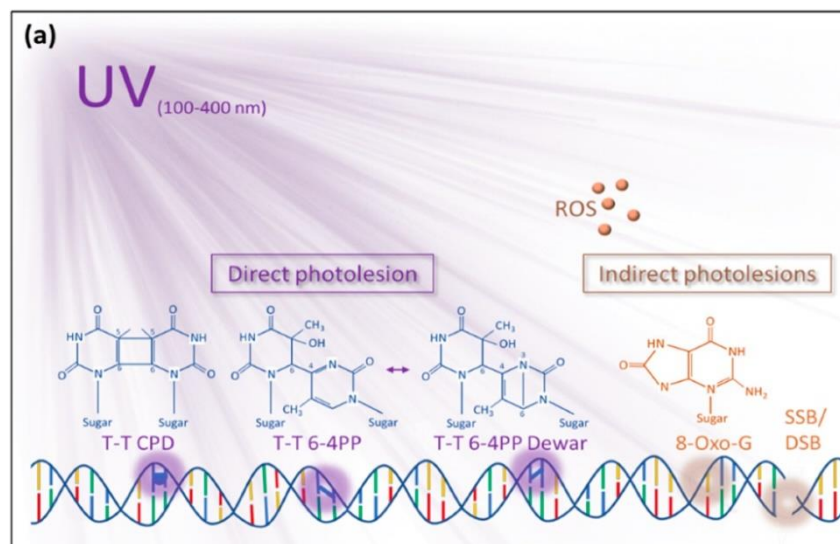


Figura 1.1 Fotolesiones directas e indirectas en el ADN por radiación UV. (Berens & Molinier, 2020)

1.4.3 Protección de la piel contra la luz UV.

Debido a las consecuencias dermo-fisiológicas de la exposición constante a la luz UV se debe hacer uso de formulaciones de protección solar. Los protectores solares son agentes tópicos de naturaleza química (compuestos orgánicos) o física (micro pigmentos) que tienen la capacidad de absorber, dispersar, reflejar o filtrar la radiación UVA/UVB (Boneta & Garroteb, 2011). El nivel de protección de estos productos frente al desarrollo de quemaduras solares se mide mediante el Factor de Protección Solar (FPS). Según las recomendaciones de la FDA (2021), se debe usar regularmente protectores con 15 de FPS o superior. El valor FPS debe ir seguido de la descripción cualitativa (protección baja, media, alta o muy alta) así como se detalla en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1 Clasificación de valores FPS en protectores solares.
(Lionetti & Rigano, 2017)**

Nivel de protección	Valor FPS
Baja	6 – 10
Media	15 – 25
Alta	30 - 40
Muy Alta	50 +

1.4.4 Extractos de plantas con capacidad genoprotectora.

En la medicina tradicional es muy conocido el uso de extractos de plantas como parte de ungüentos tópicos para tratar afecciones de la piel, sin embargo, son muy poco los estudios científicos sobre las propiedades o principios activos que pueden tener estos agregados. El mercado cosmético/dermatológico de productos fotoprotectores a base de compuestos naturales está en continuo crecimiento, y cada vez es más necesario ampliar la investigación en este campo dado que, según la firma de marketing Fact.MR, se prevé que el mercado mundial de productos de protección solar incremente a una tasa anual de casi el 7% durante 2020-2030.

Los extractos de plantas consisten en un conjunto de compuestos que son extraídos o separados mediante diferentes técnicas utilizando materia vegetal como componente principal. Estos agregados pueden mostrar propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicóticas, fotoprotectoras, entre otras (Korać & Khambholja, 2011). Las plantas responden a factores ambientales como la exposición a la radiación ultravioleta produciendo metabolitos secundarios específicos como defensa. Los compuestos fenólicos se encuentran entre los componentes bioactivos más importantes que actúan como absorbentes de rayos UV, incluidos los ácidos fenólicos, los flavonoides y los terpenoides (Skarupova et al., 2020). Estos compuestos previenen o reducen la entrada de fotones UV en las células de la piel, lo que reduce el estrés oxidativo, daño del ADN y mitiga la inflamación.

1.4.5 Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios de naturaleza polifenólica que están distribuidos ampliamente en las plantas. La presencia de anillos aromáticos en la estructura molecular les confiere a los flavonoides capacidad fotoprotectora ya que pueden absorber los rayos UV en el rango de onda de 200 a 400 nm (Figura 1.2) (Ghazi, 2022; Panche et al., 2016). Por lo tanto, los flavonoides pueden usarse como protectores solares naturales. Se han identificado alrededor de 4000 flavonoides, sin embargo, los que más se conocen por su amplia investigación son la quercetina, genisteína y daidzeína (De Luis & Aller, 2008).

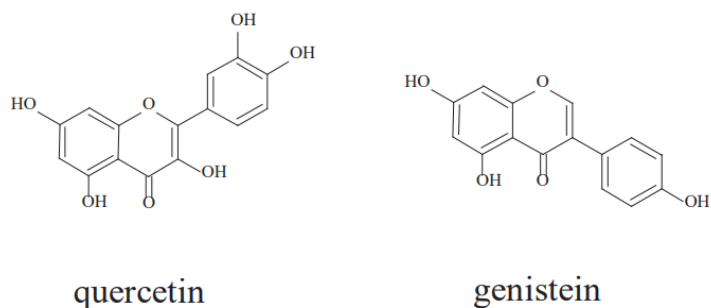


Figura 1.2. Estructura de flavonoides con capacidad de protección UV

1.4.5 *Petiveria alliacea* (Anamú)

Petiveria alliacea de la familia Phytolaccaceae también conocida como anamú o zorrilla es una planta originaria de la selva amazónica, aunque tiene un amplio rango de distribución geográfica y se puede extender desde Sudamérica hasta el sureste de Estados Unidos (Urueña et al., 2008b). En Ecuador se encuentra distribuida en las zonas de la Costa y la Amazonía. *P. alliacea* es un arbusto herbáceo que crece hasta 1 m de altura, con un sistema radicular profundo y pequeñas flores de color verde (Figura 1.3). Las raíces y las hojas tienen un olor similar al del ajo o la cebolla (Meijon, 2019).

Se han aislado muchos compuestos biológicamente activos de todas las partes de la planta, siendo los más importantes los compuestos de azufre, pero también se han identificado flavonoides como miricitina, astilbina y engeltina, triterpenos como ácido barbinérvico y compuestos como alantoína, cumarina (De Sousa et al., 1990). Varios estudios describen la caracterización fitoquímica de extractos acuosos y etanólicos de *Petiveria alliacea* (Correa et al., 2017; De Andrade et al., 2012), y evidencian la posible actividad anticancerígena, antiinflamatoria y antioxidante.

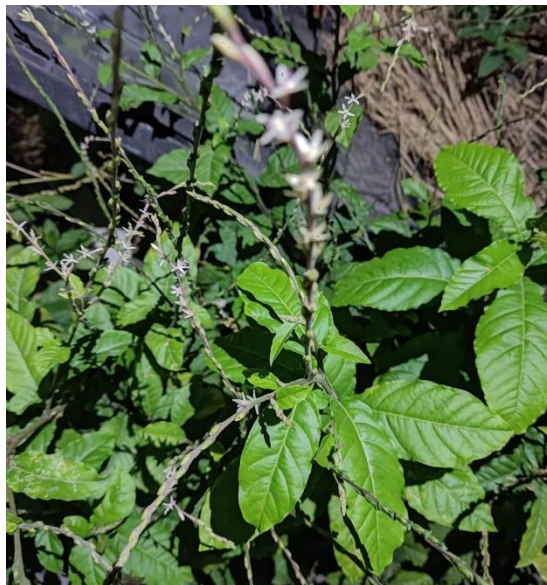


Figura 1.3. *Petiveria alliacea* (Anamú) [Elaboración propia]

1.4.6 Métodos in vitro para evaluar la capacidad genoprotectora.

Hay muchas formas de medir la capacidad genoprotectora de un extracto frente a la luz ultravioleta. El ensayo cometa es uno de los más utilizados por las empresas farmacéuticas para cuantificar el fraccionamiento de material genético (Clementi et al., 2021). Sin embargo, sus limitaciones son que requiere el uso de células eucariotas, por lo que el daño al ADN causado por el agente probado puede ser reparado por la maquinaria celular, en consecuencia, los resultados del ensayo tienden a no ser fiables. Los inmunoensayos son otro método que puede identificar con alta sensibilidad los daños a nivel de bases en el ADN, sin embargo, estos son muy costosos y tienen baja reproducibilidad, además se obtienen resultados indirectos (Schuch et al., 2009)

El ensayo que utiliza ADN plasmídico es un método relativamente rápido y sencillo para determinar las fotolesiones ocasionadas por la exposición a radiación UV, así mismo se puede probar el efecto genoprotector que tiene algún compuesto o extracto en el ADN, mediante análisis comparativo. Esta técnica se basa en las diferentes conformaciones de los plásmidos (superenrollada, relajado y lineal) (Figura 1.4), de esta forma mediante separación del material genético expuesto a UV en electroforesis en gel, se determina si el plásmido superenrollado (estado natural) ha cambiado estructuralmente debido a los cortes o lesiones en las cadenas del ADN, ocasionados por la absorción de luz UV (Lynch & Pergolizzi, 2010). Este tipo de ensayo es ideal para estudios piloto, dado que pueden determinar en primera instancia la capacidad fotoprotectora del extracto, una vez corroborada la hipótesis se puede hacer ensayos en sistemas más complejos.

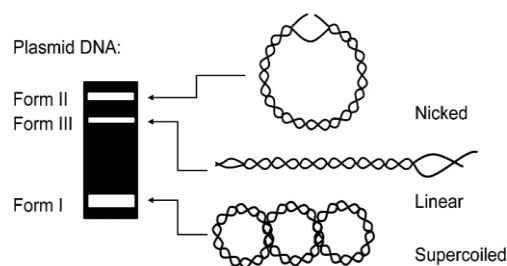


Figura 1.4. Formas estructurales del ADN plasmídico. (Meydan et al., 2020)

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Recolección de las muestras

Los especímenes de *P. alliacea* fueron recolectados de poblaciones de crecimiento espontáneo en el Recinto “Las Colembas” Cantón Colimes, provincia del Guayas. Las plantas fueron trasplantadas en macetas y aclimatadas en condiciones de 50% de sombra durante 1 semana. La identificación se realizó mediante caracterización morfológica.

2.2 Obtención del extracto acuoso

Dado que los flavonoides son compuestos fenólicos solubles en agua, se obtuvo un extracto acuoso de *P. alliacea* (EAP) modificando la metodología propuesta por Del Barrio (2000). Se elaboró un extracto a base de hojas frescas (EP.a). Las hojas se recolectaron justo antes de la extracción y se lavaron con agua destilada, luego se secaron a temperatura ambiente y se pulverizaron en nitrógeno líquido.

Para la obtención del extracto se maceraron 30 g de hojas pulverizadas con 150 ml de agua destilada en un mortero. La mezcla obtenida se colocó en agitación (New Brunswick™ Innova®40/40R) a 250 rpm por 2 horas. Posteriormente el extracto se pasó por un colador estéril y se distribuyó en tubos Falcon de 50ml, los mismo que fueron centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C para separar los sólidos en suspensión. El sobrenadante recolectado se filtró al vacío a través de una membrana Millipore® de 0,45µm. Luego, en campana de flujo laminar se esterilizó el extracto a través de un filtro MediaKap™ de 0,2µm. Las soluciones se almacenaron en tubos Eppendorf de 15 ml a -20°C en condición de oscuridad hasta su posterior uso.

2.3 Prueba bioquímica de flavonoides

La presencia de flavonoides en el extracto acuoso de *P. alliacea* se determinó utilizando el método colorimétrico descrito por Shah & Hossain (2014), detallado a continuación. A 2ml del extracto acuoso crudo obtenido, se añadió 1ml de hidróxido de sodio (NaOH) diluido al 2%. Esta reacción provocó que el extracto crudo cambie

a un color amarillo intenso. Luego se agregaron unas gotas de ácido clorhídrico (HCL) 4N lo que volvió incoloro el extracto. Esta reacción indica la presencia de flavonoides.

2.4 Cuantificación de fenoles y flavonoides totales.

La cantidad total de fenoles en el extracto acuoso de *P. alliacea* se midió utilizando una curva estándar con ácido gálico y se expresó en términos de equivalentes de ácido gálico (mg GAE/Kg) basados en la masa fresca de las hojas. Por otro lado, la cantidad total de flavonoides se determinó con una curva estándar de quercetina y se expresó en términos de equivalentes de quercetina (mg QE/Kg) en base a la masa fresca de las hojas. La medición se realizó usando espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-VIS) siguiendo el protocolo modificado del CIBE de acuerdo con (Avramova et al., 2017).

2.5 Extracción de plásmidos

Para los diferentes ensayos se utilizó el plásmido de clonación de productos PCR pGEM® -T Vector de Promega (Resistencia a la ampicilina, 3000bp, lacZ gene). Se ligó el plásmido sin ningún inserto y este producto fue utilizado para realizar transformación de células competentes JM109 de alta eficiencia que fueron cultivadas en cajas Petri con medio LB sólido con Ampicilina / IPTG / X-GAL. Al no existir inserto en el plásmido la secuencia codificante de β -galactosidasa no está interrumpida por lo tanto los clones se identificaron mediante la coloración azul de las colonias. Las colonias transformadas se cultivaron en medio LB líquido por 24 horas a 150 rpm en 37°C y luego se realizó la extracción de plásmidos mediante el kit, Pure Yield™ Plasmid Miniprep System (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras de plásmidos purificados se almacenaron en alícuotas de 50 μ l a -20°C para su disponibilidad.

2.6 Calidad y concentración de plásmido

La calidad y concentración (ng/ μ l) del plásmido se midió en el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 a relaciones de 260/280 y 260/230. La calidad del ADN plasmídico para los ensayos se confirmó mediante electroforesis. Se cargaron 3 μ l de muestra con Loading Dye (6X) en un gel de agarosa al 1%. La electroforesis se

llevó a cabo en Buffer TAE 1X a 90V durante 30 minutos. En todos los casos el gel de tñó con SYBR Safe (Invitrogen). Después de la electroforesis, las bandas de ADN correspondientes a formas de ADN superenrolladas se visualizaron mediante fluorescencia en un Biorad Gel Doc XR+.

2.7 Ensayo de genotoxicidad

La genotoxicidad o clastogenicidad de los extractos de *P. alliacea* se evaluaron mediante ensayo con ADN plasmídico utilizando el vector de clonación de productos PCR pGEM T vector. Se incubó durante 30 minutos a 37°C alícuotas de plásmido en su forma superenrollada a una concentración de 100 ng/μl en presencia del extracto a concentraciones v/v (0.1%, 1.0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%). La reacción se realizó en un volumen final de 20μl en tubos Eppendorf de 1.5ml en baño maría.

Reacción: (3μl de plásmido) + (3μl de extracto) + (14μl de solución NET)

Buffer (NET): 0.1M NaCl, 0.01M EDTA, 0.01M Tris HCL, pH 8

Como control negativo del ensayo se evaluó el efecto genotóxico en el plásmido sin tratamiento (forma superenrollada), y un control positivo (plásmido linearizado), es decir plásmido incubado con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como un generador de especies reactivas de oxígeno, que induce roturas en el ADN. Ambos controles fueron incubados en las mismas condiciones antes descritas, a 37°C durante 30 minutos.

2.8 Electroforesis

Para realizar la evaluación de genotoxicidad se realizó la separación mediante electroforesis, que permitió visualizar las lesiones de una y doble cadena producidas por el extracto en el plásmido, mediante la separación de las diferentes conformaciones estructurales del ADN, (superenrollado, relajado y lineal. Se tomó 10μl de cada muestra y se les adicionó 2μl de solución de carga (Loading Dye 6X). Las mezclas se cargaron en un gel de agarosa al 1% preparado con TAE 1X (Tris

base, ácido acético, EDTA pH 8) teñido con SYBR[®] Safe DNA. La electroforesis se llevó a cabo en Buffer TAE 1X a 90V 400mA durante 35 min.

2.9 Ensayo de genoprotección contra la luz UV

Para poder evaluar si el extracto de *P. alliacea* tiene capacidad de proteger el ADN plasmídico de la luz ultravioleta UV-C se diseñó un ensayo de fotoprotección (Figura 2.1) basado en la metodología de Fuentes y colaboradores (2016). Para el tratamiento de las muestras se incubó 25µl de plásmidos con 25µl de extracto acuoso. El plásmido se llevó a una concentración final de 1ng/µl. Del volumen final se tomaron 25µl como control (sin irradiación UV) para cada concentración, además de un control positivo (plásmido + H₂O + UV-C) y uno negativo (Plásmido + H₂O). Todas las muestras se ensayaron por triplicado.

La irradiación de las muestras se realizó en placas Petri con una lampara germicida de longitud de onda de $\lambda = 254\text{nm}$ (LABCONCO[™]) correspondiente a la radiación UV-C a una altura de 60cm. El ensayo se efectuó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

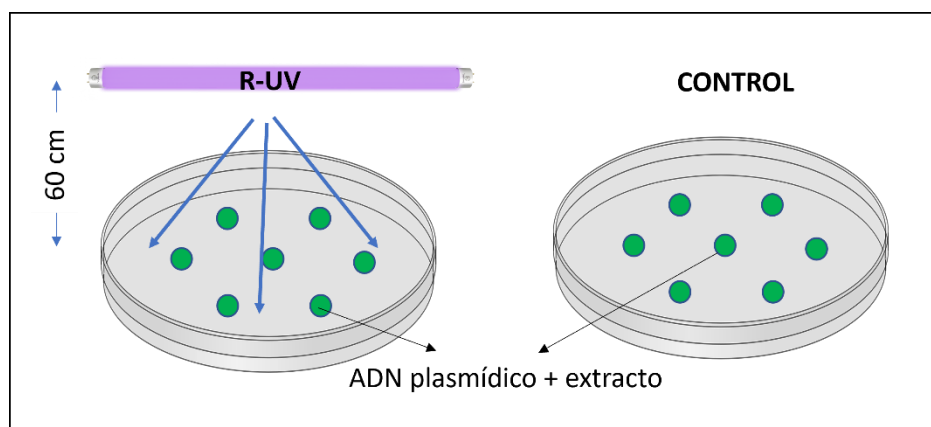


Figura 2.1. Diseño del ensayo de fotoprotección. [Elaboración propia]

2.10 Evaluación de la actividad fotoprotectora.

2.10.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica se utilizó para determinar si han ocurrido daños a nivel del ADN después del ensayo de exposición a radiación UV-C. La enzima ADN

polimerasa es sensible a la presencia de los dímeros de pirimidina (CPDs), por lo que la actividad fotoprotectora se evalúa en función de la cantidad de producto PCR generado.

Se preparó un máster mix con GoTaq® a concentración final de 1X. Los cebadores utilizados corresponden al M13 Reverse 161–177 (5'GTCATAGCTGTTTCCTG3') y el M13 Forward 2941–2957 (5'GTAAAACGACGGCCAGT3') a concentración de 5mM. El volumen de ADN utilizado para cada reacción fue de 1µl y las condiciones del termociclador se ilustran en la Figura 2.2. El producto amplificado se analizó en gel de agarosa a una concentración del 1.5%.

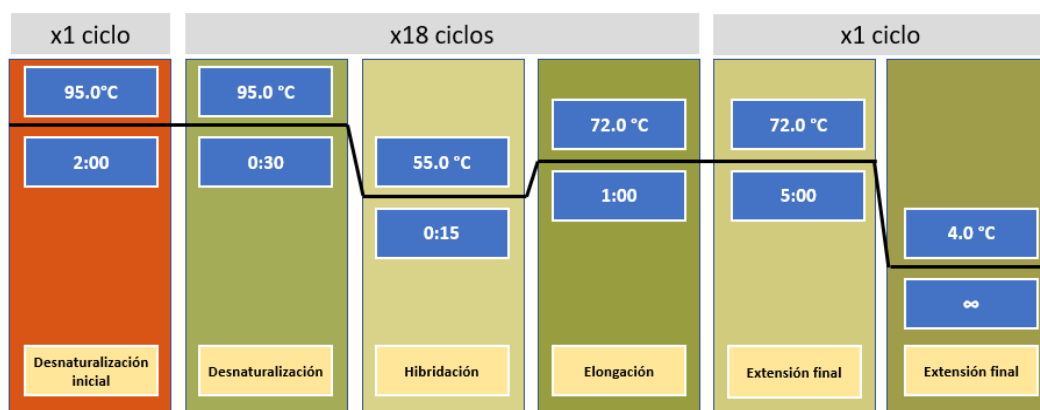


Figura 2.2. Condiciones del termociclador para PCR de M13

2.10.2 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La qPCR se llevó a cabo en un sistema QuantStudio utilizando SYBR® GreenER™ qPCR Supermix Universal mediante los cebadores M13 Reverse 161–177 (5'GTCATAGCTGTTTCCTG3') y el M13 Forward 2941–2957 (5'GTAAAACGACGGCCAGT3'). Cada reacción se llevó a cabo mediante tres replicas técnicas y los datos se representaron en una gráfica ΔR_n vs Ciclos.

2.10.3 Cuantificación de intensidad de bandas

La intensidad de las bandas en los geles de agarosa correspondientes a las conformaciones estructurales del ADN plasmídico se cuantificó mediante software de análisis de imágenes por densitometría. Se uso el programa de dominio público ImageJ del National Institute of Health, USA. <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Prueba bioquímica de flavonoides

El extracto de *P. alliacea* se sometió a una prueba de reactivo alcalino para determinar la presencia de flavonoides, y resultó positivo. Se añadió solución de hidróxido de sodio. El color amarillo intenso que se formó desapareció cuando se añadió un ácido diluido (HCl), lo que confirmó la presencia de flavonoides, como se muestra en la Figura 3.1.

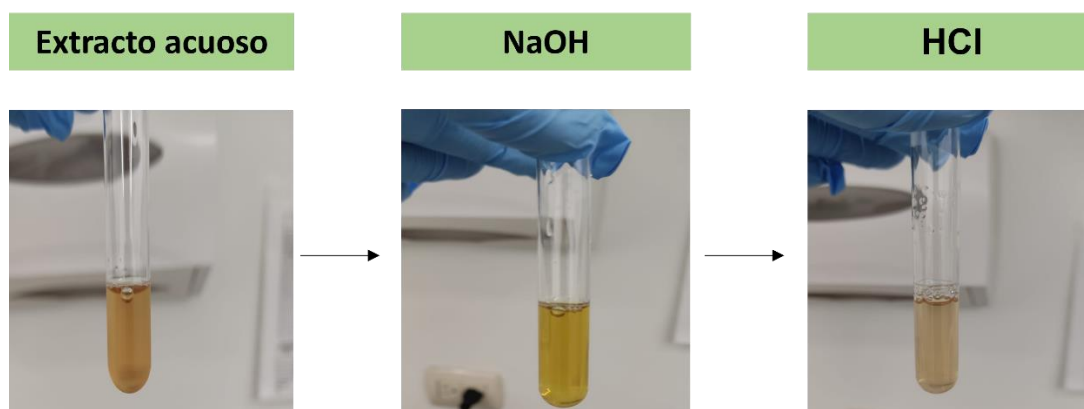


Figura 3.1. Test fitoquímico para detección de flavonoides en un extracto acuoso.

3.2 Contenido de fenoles y flavonoides totales

El análisis fitoquímico reveló que el extracto acuoso de *P. alliacea* contiene componentes fenólicos y flavonoides a una concentración del 100%, tomando como base una masa fresca de 30g y un volumen inicial de 150ml. La Tabla 3.1 resume los hallazgos, los cuales indican que el extracto tiene un contenido de fenoles totales de 1110 mg GAE/Kg de masa fresca y un contenido de flavonoides totales de 290.81 mg QE/Kg de masa fresca.

Tabla 3.1. Valoración cuantitativa de fenoles y flavonoides presentes en el extracto acuoso de hojas de *Petiveria alliacea*.

Muestra	Contenido de fenoles totales (mg GAE/Kg masa fresca)	Contenido de flavonoides totales (mg QE/Kg masa fresca)
Extracto <i>P. alliacea</i> 100%	1110 ± 48.37	290.81 ± 27.70
Extracto <i>P. alliacea</i> 2.5%	Sin reacción colorimétrica	Sin reacción colorimétrica

Los datos son consistentes con otros análisis fitoquímicos que reportan altos contenidos de flavonoides en extractos acuosos e hidroalcohólicos de *P. alliacea*, especialmente en partes aéreas (Ayodele et al., 2015; Blainski et al., 2010). Los estudios han señalado que estos extractos tienen varios flavonoides, que incluyen quercetina, kaempferol, astilbina, miricitrina (Urueña et al., 2008a). Adicionalmente, se ha reportado una concentración considerable de fenoles, siendo los más prevalentes el ácido cinámico, ácido cafeico, y el ácido ferúlico (Sariego-Frómata et al., 2015). Sin embargo, las cantidades exactas de estos fitocompuestos presentes en *P. alliacea* pueden variar según las condiciones de crecimiento, los métodos de extracción y las técnicas analíticas utilizadas.

Tabla 3.2. Componentes de las curvas de calibración.

Estándar	Ácido gálico	Quercetina
Rango Lineal (mg/L)	10 - 250	10 - 100
Ecuación	$y = 0.0047x - 0.0854$	$y = 0.0034x - 0.0035$
R ²	0.9917	0.9954
LOD (mg/L)	34.18	16.07

El límite de detección (LOD) de flavonoides en las pruebas colorimétricas UV-VIS depende de varios factores como la matriz de la muestra, los reactivos utilizados y la sensibilidad del instrumento (Doloking et al., 2022). Debido a esto el extracto a una concentración de 2.5% v/v no presentó reacción, por lo que el contenido total

de fenoles y flavonoides debió estar por debajo del valor LOD (mg/L) es decir de 34.18 y 16.07 mg/L, respectivamente como se indica en la Tabla 3.2.

3.3 Ensayo de genotoxicidad

El patrón electroforético del ADN plasmídico pGEM-T vector después de la incubación de 30 minutos en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del extracto acuoso de *P. alliacea* se muestra en la Figura 3.2. A medida que aumenta la concentración del extracto, se intensifica el efecto genotóxico o clastogénico determinado por la aparición de las diferentes conformaciones del ADN plasmídico. El tratamiento provocó la transformación del plásmido superenrollado (Form I) a la forma circular relajada (Form II) lo que indica la fragmentación de una sola cadena del ADN. Esta forma se vuelve más significativa a partir de una concentración del 10%. Por otra parte, la conformación lineal (Form III) indica la presencia de roturas de doble cadena y aparece a partir del 30%.

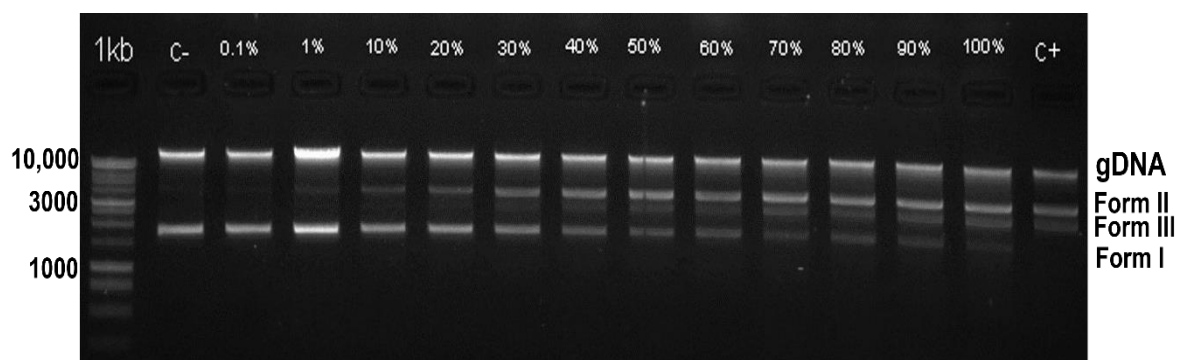


Figura 3.2. Efecto genotóxico del extracto acuoso de *P. alliacea* sobre plásmido pGEM T durante 30 min. El control positivo (C+) es plásmido incubado en H₂O₂. Form I: conformación superenrollada, Form II: forma circular relajada y Form III: plásmido lineal.

La cuantificación de las diferentes formas de ADN plasmídico se realizó utilizando densitometría de imagen. Los datos están representados en la Figura 3.3, que muestra la intensidad relativa para cada conformación plasmídica, comparada con el respectivo control. Como se puede visualizar en la Figura 3.3, la intensidad de la forma superenrollada (nativa) disminuye a mayores concentraciones del extracto. Mientras que la intensidad relativa de las formas relajada y lineal aumentan

significativamente, es decir que existe una relación inversamente proporcional. Es decir, la banda del plásmido superenrollado se hace menos intensa cuando aparecen roturas en el ADN y las bandas que representan estas lesiones (relajado o lineal) comienzan a intensificarse.

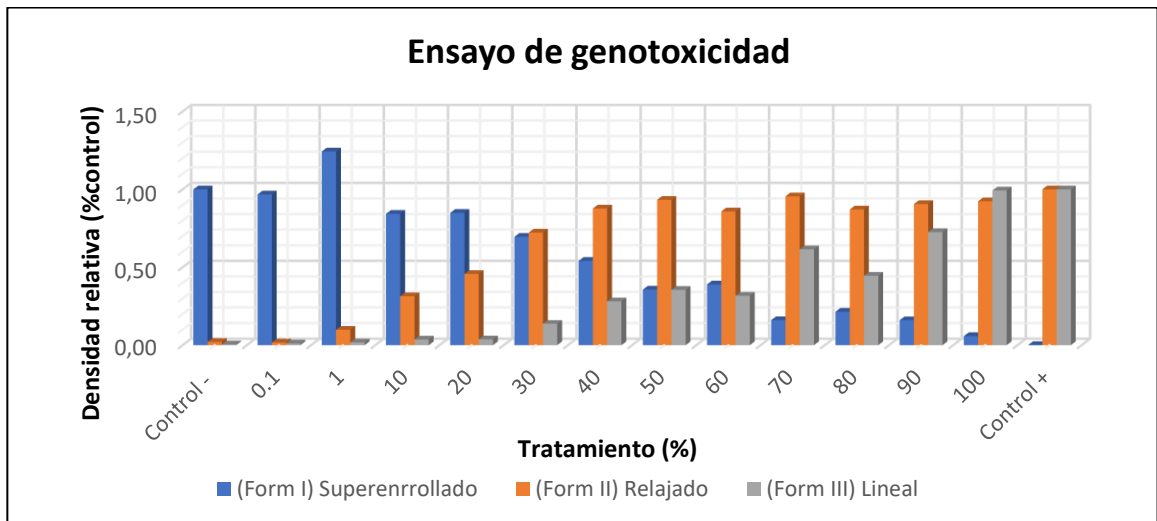


Figura 3.3. Evaluación semicuantitativa de los efectos del extracto acuoso de *P. alliacea* sobre ADN plasmídico del pGEM-T vector. Las barras gráficas representan mediciones densitométricas de ADN por ImageJ.

En las concentraciones bajas (0.1, 1, 10) % el cambio en el ADN fue muy leve y solo se registró la forma relajada. Estos resultados nos indican que el extracto acuoso tiene un rango de uso seguro entre 0.1% y máximo 10%, concentraciones superiores a este nivel son clastogénicas. Estos resultados coinciden con los reportados por (Gagliardi, et al., 2014)

La capacidad genotóxica del extracto puede deberse a la presencia de metabolitos secundarios que tengan algún tipo de interacción con el ADN. Algunos de los compuestos químicos de la planta, como los alcaloides de pirrolizidina, pueden ser responsables de este efecto (Luz et al., 2016). En la posible utilización de este extracto como agente fotoprotector, la evaluación de su efecto clastogénico es importante, por lo tanto, se precisa más estudios para comprender completamente los riesgos potenciales para la salud asociados con extractos de *P. alliacea*. El

uso de modelos experimentales vivos, tales como bacterias o células eucariotas podría aportar con resultados más significativos.

3.3.1 Ensayo de Fotoprotección

El efecto fotoprotector se estudió irradiando el ADN plasmídico (pGEM T vector) con luz UV a una onda de 254nm en presencia del extracto acuoso de *P. alliacea*. Se evaluó un rango de concentraciones seguras de usar de acuerdo con el ensayo de genotoxicidad (0.1% – 7.5%). Los efectos de esta exposición se analizaron mediante PCR. El producto de la reacción se examinó en gel de agarosa al 1.5% y los resultados se muestran en la Figura 3.4. Como se puede observar a medida que se incrementa la concentración del extracto (hasta un máximo de 2.5%), el efecto fotoprotectante también incrementa, lo cual está determinado por la intensidad de la banda, una mayor intensidad significa mayor cantidad de material genético foto-prottegido. Sin embargo, en niveles superiores a esta concentración (5% y 7.5%) el efecto comienza a decaer. Por otra parte, podemos determinar que el extracto como tal no tiene actividad inhibitoria sobre la polimerasa dado que los controles (Plásmido + extracto sin UV) resultaron en promedio de igual intensidad para todas las concentraciones incluido el control negativo (Plásmido sin extracto y sin irradiación).

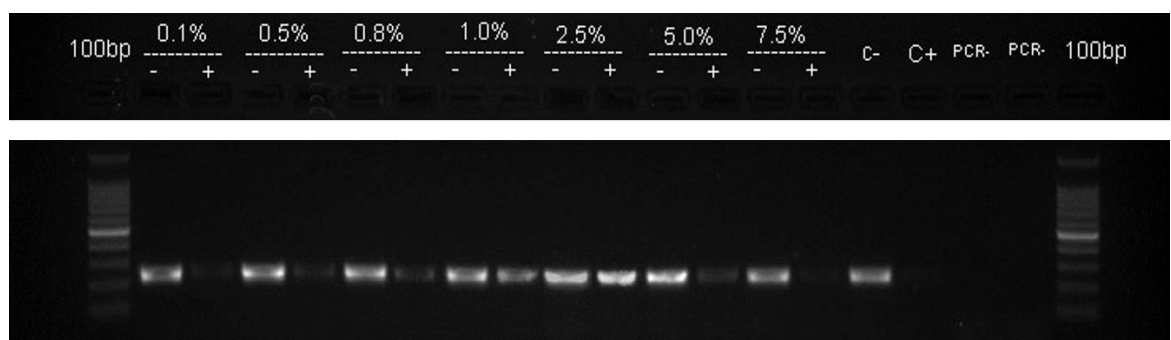


Figura 3.4. Gel de agarosa (1.5%) para productos PCR M13 a partir de ADN plasmídico pGEM T irradiado con UV. Carriles (-): Control sin exposición a UV. Carriles (+): con exposición a UV. C- es plásmido sin extracto y sin exposición UV. C+ es plásmido sin extracto con exposición UV. PCR- son control de contaminación de reactivos.

Para cuantificar los resultados obtenidos en el gel se determinó la densidad relativa, es decir la relación de la intensidad obtenida de las bandas positivas para UV entre sus respectivos controles, tal como se muestra en la Figura 3.5. La concentración del 2.5% ofrece la mayor fotoprotección del ADN, dado que al obtener una intensidad relativa de banda mayor significa que las fotolesiones se redujeron por la presencia del extracto y por lo tanto hubo mayor cantidad de plásmido disponible para la amplificación.

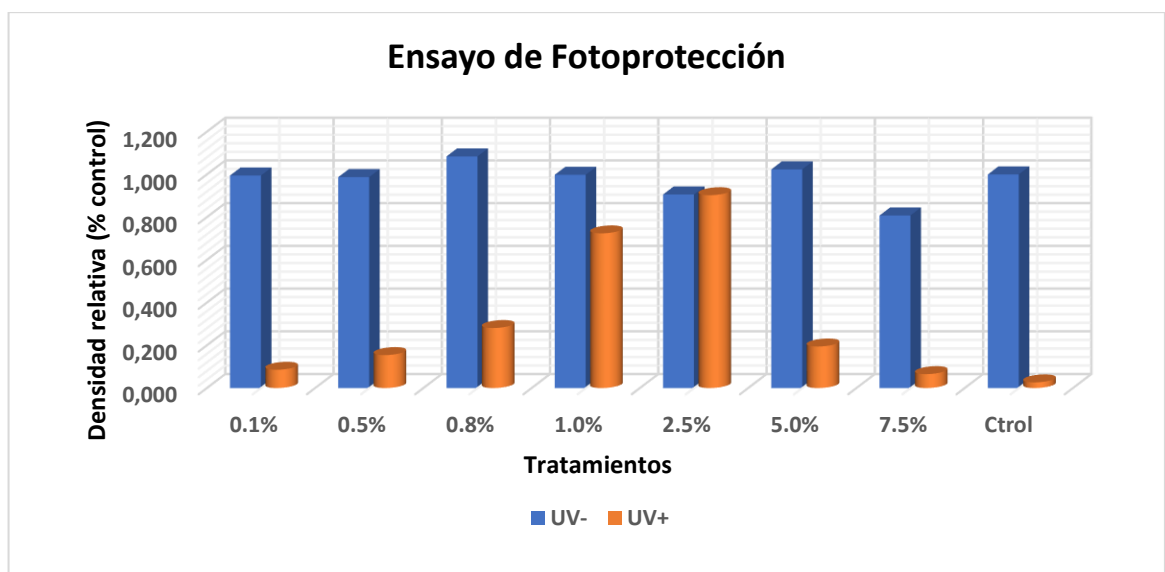


Figura 3.5. Evaluación semicuantitativa del efecto fotoprotector del extracto de *P. alliacea* sobre ADN plasmídico pGEM-T vector medido de a través de PCR. Las barras gráficas representan mediciones densitométricas de ADN por ImageJ.

Debido a la naturaleza química, la molécula de ADN absorbe directamente la energía de la luz ultravioleta, lo que da lugar a la creación de fotoproductos, principalmente dímeros de ciclobutano y pirimidina. Los CPD pueden actuar como obstáculos para la progresión de la ADN polimerasa, impidiendo la extensión de la cadena. Esto puede llevar a una reducción del producto PCR deseado. Por lo tanto, si el extracto tiene un efecto fotoprotector, los niveles de fotolesiones en el plásmido tratado con las diferentes concentraciones del extracto serán más bajos que en los no tratados y por lo tanto la cantidad de copias generadas debería incrementar no solo en relación con el control positivo si no también en los diferentes tratamientos.

Si bien esta prueba puede brindar información sobre las propiedades fotoprotectoras del extracto, es crucial tener en cuenta que es solo una evaluación preliminar e indirecta, y se necesita otras pruebas para comprender completamente la capacidad fotoprotectora del extracto.

3.3.2 Evaluación mediante qPCR.

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) se utilizó para estimar la concentración de ADN plasmídico de interés en las muestras. Si el extracto tiene la capacidad de proteger el ADN frente a la radiación UV entonces la concentración inicial en ng para las muestras irradiadas en comparación con las muestras de control no irradiadas deben variar dependiendo de las diluciones del extracto.

El gráfico de amplificación (ΔR_n vs Ciclos) qPCR mostró un retraso en la acumulación de productos en todas las muestras irradiadas respecto al control negativo (plásmido UV-), lo que indica que existen menor cantidad de copias del plásmido para ser replicadas (Figura 3.6). Sin embargo, considerando las curvas del gráfico vemos que las muestras en presencia del extracto a 2.5% redujeron el tiempo de detección, lo que indica que a esta concentración existe mayor fotoprotección, esto corrobora los resultados obtenidos mediante PCR punto final. Por lo tanto y como era de esperar, la qPCR mejoró la detección del efecto de las fotolesiones en el ADN sobre la actividad de la polimerasa.

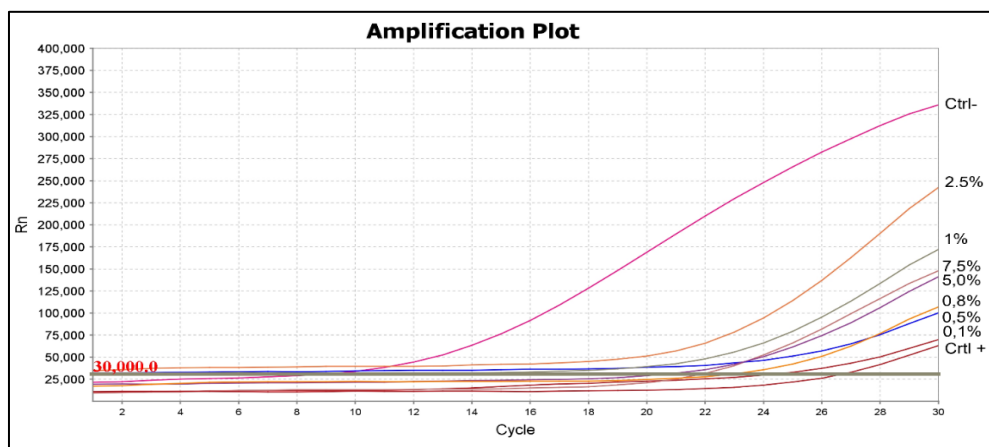


Figura 3.6. Curva de amplificación (ΔR_n vs Ciclos) qPCR de plantillas M13 del plásmido pGEM T irradiadas con UV.

El análisis de la concentración de ADN se realizó a través de una curva standard de diluciones. Se observó que a medida que la concentración del extracto se acerca al 2.5%, la diferencia de concentración (antes y después de exposición a UV) disminuye, mientras que en las concentraciones superiores (5% - 7.5%) comienza a incrementar esta diferencia, tal como se muestra en el gráfico de la Figura 3.7. Esto nos indica una vez más, que el extracto alcanza su mayor potencial fotoprotector al 2.5%.

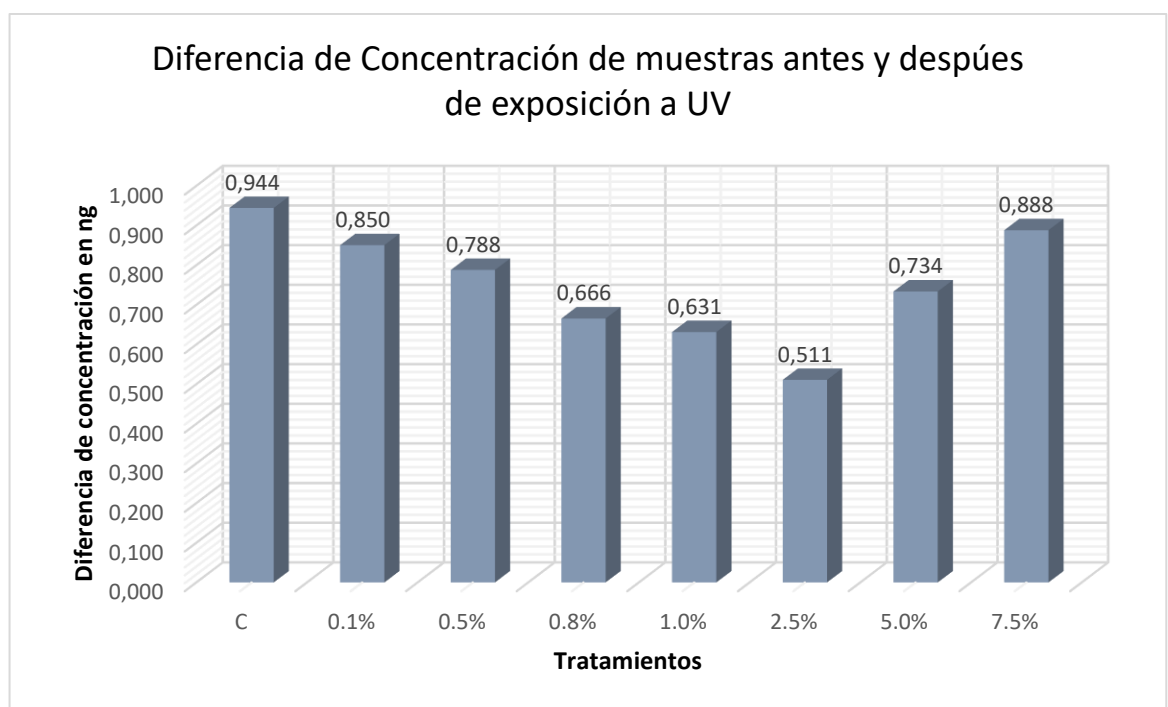


Figura 3.7. Diferencia de concentración (ng) de ADN plasmídico antes y después de ser expuestas a UV.

En la Tabla 3.3 se muestran la cantidad de ADN plasmídico (ng) de partida para los diferentes tratamientos. La diferencia mínima fue de 0.511ng en la concentración de 2.5%, es decir que el extracto protegió cerca del 50% del ADN frente a la radiación UV-C. Para las concentraciones de 5% y 7.5% se puede notar un incremento significativo en la diferencia, esto nos lleva a deducir que el extracto como tal está teniendo un efecto inhibitorio sobre la qPCR.

Tabla 3.3 Resultado de la cuantificación (ng) de las muestras antes y después de la exposición a radiación UV mediante la curva estándar.

	Tratamientos							
	C	0.1%	0.5%	0.8%	1.0%	2.5%	5.0%	7.5%
ADN (ng) UV+	-0,047	0,119	0,202	0,410	0,292	0,551	0,244	-0,053
ADN (ng) UV-	0,897	0,969	0,990	1,076	0,924	1,061	0,977	0,835
Diferencia	0,944	0,850	0,788	0,666	0,631	0,511	0,734	0,888

La radiación UVC (100 – 280nm) es altamente energética, considerada como la más potente y dañina. No obstante, tomando en cuenta que este tipo de radiación es retenida por la capa de ozono y no alcanza a la tierra, nos da una idea del potencial que tiene el extracto para absorber o reflejar los rayos UV de menor intensidad como son los UVB (280 a 320 nm) y UVA (320 – 400 nm). Además, es importante mencionar que el contenido de flavonoides en el extracto necesario para lograr este efecto no requiere ser alto, pues a una concentración de 2.5% no se pudo detectar estos fitocompuestos por técnica de espectrofotometría UV-VIS. De esta forma, los resultados conseguidos sugieren que el extracto de *P. alliacea* al 2.5% posee un efecto genoprotectante del ADN plasmídico ante la exposición de radiación UV-C durante 30 min.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusión

En el presente proyecto, se obtuvo un extracto acuoso de hojas de *Petiveria alliacea* rico en fenoles y flavonoides mediante extracción sólido-líquido discontinua. Para determinar el rango de concentraciones que no son tóxicas o que induzcan a un efecto clastogénico sobre el ADN plasmídico se evaluó su genotoxicidad y además su propiedad fotoprotectora frente a la radiación UV. Se halló que el extracto tiene un efecto genotóxico en concentraciones superiores al 10% v/v. Los ensayos de fotoprotección demostraron que el extracto de *P. alliacea* al 2.5% tiene potencial como agente fotoprotector, absorbiendo la radiación UV de alta intensidad. Este estudio reporta el efecto de fotoprotección de ADN plasmídico de un extracto acuoso de *P. alliacea* frente a la radiación UV. Esto destaca el potencial poder fotoprotector de los flavonoides presentes en esta planta y la importancia de seguir investigando para determinar el uso seguro y eficaz de este extracto para su posterior aplicación en la industria dermo-cosmética y la biomedicina.

4.2 Recomendaciones

- Realizar estudios adicionales para determinar la seguridad y eficacia del uso del extracto como fotoprotector.
- Continuar investigando los mecanismos subyacentes de la acción fotoprotectora y genotóxica del extracto y realizar ensayos en sistemas in vivo.
- Determinar la fracción del extracto acuoso de *P. alliacea* con el mayor efecto genoprotector.
- Evaluar otros factores, como la duración y frecuencia de la exposición a la radiación UV, al evaluar la efectividad del extracto como fotoprotector.

BIBLIOGRAFÍA

- Ayodele, O. D., Oyegbade, O., Oseni, S. R., & Ayodele, D. (2015). Phytochemical Analysis and Antioxidant Activities of Dry and Fresh Leaves of *Petivera alliacea* and *Ocimum gratissimum*. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR) International Journal of Sciences: Basic and Applied Research*, 24(3), 1–13. <http://gssrr.org/index.php?journal=JournalOfBasicAndApplied>
- Berens, P. J. T., & Molinier, J. (2020). Formation and recognition of uv-induced dna damage within genome complexity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms21186689>
- Blainski, A., Piccolo, V. K., Mello, J. C. P., & de Oliveira, R. M. W. (2010). Dual effects of crude extracts obtained from *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae) on experimental anxiety in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(2), 541–544. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.012>
- Blaustein, A. R., & Searle, C. (2013). Ultraviolet Radiation. *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition*, 296–303. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00147-7>
- Boneta, R., & Garroteb, A. (2011). *Protección solar. Nuevos Activos*. 30.
- Bosch, R., Philips, N., Suárez-Pérez, J. A., Juarranz, A., Devmurari, A., Chalensouk-Khaosaat, J., & González, S. (2015). Mechanisms of photoaging and cutaneous photocarcinogenesis, and photoprotective strategies with phytochemicals. *Antioxidants*, 4(2), 248–268. <https://doi.org/10.3390/antiox4020248>
- Brenner, M., & Hearing, J. V. (2008). The protective role of melanin against UV. *Photochem Photobiology*, 84(3), 539–549. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x>.The
- Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Revista Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91–100.
- Clementi, E., Garajova, Z., & Markkanen, E. (2021). Measuring DNA damage using the alkaline comet assay in cultured cells. *Bio-Protocol*, 11(16), 1–17. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4119>
- Collantes, J. (2015). Efectos de la radiación solar en la piel. *Rev.Ecu.Med.Eugenio Espejo*, 4(5), 3–6.

- Correa, M., Yeung, K., Linares, H., Pacheco, O., Caicedo, P., & Bonfante, R. (2017). *EFFECTIVIDAD DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA PLANTA Petiveria MALIGNO EN RATONES C57BL / 6 . the malignant melanoma in C57BL / 6 mice*. 21, 53–60.
- De Andrade, T. M., De Melo, A. S., Dias, R. G. C., Varela, E. L. P., De Oliveira, F. R., Vieira, J. L. F., De Andrade, M. A., Baetas, A. C., Monteiro, M. C., & Maia, C. D. S. F. (2012). Potential behavioral and pro-oxidant effects of *Petiveria alliacea* L. extract in adult rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 604–610. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.020>
- De Luis, D. A., & Aller, R. (2008). Papel de los flavonoides del té en la protección cardiovascular. *Anales de Medicina Interna*, 25(3), 105–107. <https://doi.org/10.4321/s0212-71992008000300001>
- De Sousa, J. R., Demuner, A. J., Pinheiro, J. A., Breitmaier, E., & Cassels, B. K. (1990). Dibenzyl trisulphide and trans-N-methyl-4-methoxyproline from *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry*, 29(11), 3653–3655. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85294-P](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85294-P)
- Del Barrio, G., & Parra, F. (2000). Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1–2), 317–322. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00228-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00228-2)
- Doloking, H., Ningsi, S., & Tahar, N. (2022). *Flavonoids: A Review on Extraction, Identification, Quantification, and Antioxidant Activity*. <https://doi.org/10.24252/djps.v5i1.29329>
- Douki, T. (2020). Pyrimidine (6-4) Pyrimidone Photoproducts in UVA-Irradiated DNA: Photosensitization or Photoisomerization? *ChemPhotoChem*, 4(4), 294–299. <https://doi.org/10.1002/cptc.201900280>
- Fuentes Lorenzo, J. L. (2019). Las plantas como fuente de compuestos fotoprotectores frente al daño en el ADN producido por la radiación ultravioleta. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43(168), 550–562. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.841>
- Fuentes-León, F., & Schuch, A. P. (2016). Cymbopogon citratus aqueous extract protects plasmid DNA from UVC-induced damage Transcriptional evaluation of induced pluripotent cells and neural progenitor cells of patients with Cockayne syndrome after induction of DNA damage View project PNA/8/CEADEN project “Risk assessment of natural products with use in agriculture and medicine using biological assays”. View

- project Maribel González-Pumariega. *Ars Pharm*, 57(4), 193–199. <https://doi.org/10.4321/S2340-98942016000400006>
- Gagliardi, R. F., Soares, B. O., Oliveira, M. B. N., Mansur, E., Dantas, F. J. S., De Mattos, J. C. P., & Caldeira-de-Araujo, A. (2014). Effect of extracts from field and in vitro plants of *Petiveria alliacea* L. on plasmidial DNA. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(35), 1101–1109. <https://doi.org/10.5897/jmpr2014.5471>
- Gagliardi, R. F., Soares, B. O., Oliveira, M. B. N., Mansur, E., Dantas, F. J. S., de Mattos, J. C. P., & Caldeira-de-Araujo, A. (2014). Effect of extracts from field and in vitro plants of *Petiveria alliacea* L. on plasmidial DNA. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(35), 1101–1109. <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5471>
- Ghazi, S. (2022). Do the polyphenolic compounds from natural products can protect the skin from ultraviolet rays? *Results in Chemistry*, 4(May), 100428. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100428>
- González-Púmariega, M., Tamayo, M. V., & Sánchez-Lamar, Á. (2009). La Radiación Ultravioleta. Su Efecto Dañino Y Consecuencias Para La Salud Humana. *Theoria*, 18(2), 69–80.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. (2014). Emissions Scenarios. *International Panel on Climate Change, April 2007*, 1–161.
- Jager, T. L., Cockrell, A. E., & Du Plessis, S. S. (2017). Ultraviolet light induced generation of reactive oxygen species. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 996, 15–23. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_2
- Korać, R. R., & Khambholja, K. M. (2011). Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. *Pharmacognosy Reviews*, 5(10), 164–173. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.91114>
- LeClerc, J. E., Borden, A., & Lawrence, C. W. (1991). The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone(6-4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transitions in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(21), 9685–9689. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.21.9685>
- Lionetti, N., & Rigano, L. (2017). The new sunscreens among formulation strategy, stability issues, changing norms, safety and efficacy evaluations. *Cosmetics*, 4(2). <https://doi.org/10.3390/cosmetics4020015>

- Luz, D. A., Pinheiro, A. M., Silva, M. L., Monteiro, M. C., Prediger, R. D., Ferraz Maia, C. S., & Fontes-Júnior, E. A. (2016). Ethnobotany, phytochemistry and neuropharmacological effects of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae): A review. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 185, pp. 182–201). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.053>
- Lynch, K., & Pergolizzi, R. G. (2010). In vitro Method to Quantify UV mediated DNA Damage. *In Vitro*, 20(2).
- Meijon, F. (2019). *Tintura de Petiveria alliacea (anamú) para controlar los niveles de glucosa*.
- Meydan, İ., Kizil, G., Demir, H., Ceken Toptanci, B., & Kizil, M. (2020). In vitro DNA damage, protein oxidation protective activity and antioxidant potentials of almond fruit (*Amygdalus trichamygdalus*) parts (hull and drupe) using soxhlet ethanol extraction. *Advances in Traditional Medicine*, 20(4), 571–579. <https://doi.org/10.1007/s13596-020-00491-1>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Sariego-Frómata, S., Marin Morán, J. E., Pacheco, A. O., Rivero Breff, D., & Sariego Tamayo, O. R. (2015). Determinación de metales, fenoles totales y flavonoides totales en extractos de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (anamú). *CENIC Ciencias Químicas*, 46.
- Schuch, A. P., Da Silva Galhardo, R., De Lima-Bessa, K. M., Schuch, N. J., & Menck, C. F. M. (2009). Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 8(1), 111–120. <https://doi.org/10.1039/b810085c>
- Shah, M. D., & Hossain, M. A. (2014). Total flavonoids content and biochemical screening of the leaves of tropical endemic medicinal plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(6), 1034–1038. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.12.033>
- Skarupova, D., Vostalova, J., & Svobodova, A. R. (2020). Ultraviolet a protective potential of plant extracts and phytochemicals. *Biomedical Papers*, 164(1), 1–22. <https://doi.org/10.5507/bp.2020.010>
- Sociedad de Lucha Contra el Cáncer del Ecuador. (2018). *Cáncer en guayaquil: información epidemiológica*.

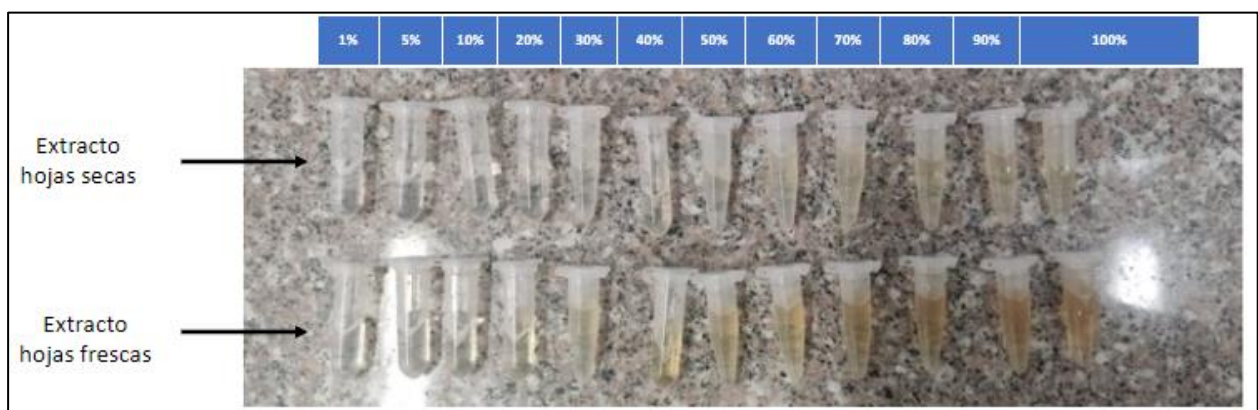
- Stapleton, A. E., & Walbot, V. (1994). Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiology*, *105*(3), 881–889. <https://doi.org/10.1104/pp.105.3.881>
- Takahashi, A., & Ohnishi, T. (2004). The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the Exposed Facility on the International Space Station. *Biological Sciences in Space = Uchū Seibutsu Kagaku*, *18*(4), 255–260. <https://doi.org/10.2187/bss.18.255>
- Torres-Contreras, A. M., Garcia-Baeza, A., Vidal-Limon, H. R., Balderas-Renteria, I., Ramírez-Cabrera, M. A., & Ramirez-Estrada, K. (2022). Plant Secondary Metabolites against Skin Photodamage: Mexican Plants, a Potential Source of UV-Radiation Protectant Molecules. *Plants*, *11*(2). <https://doi.org/10.3390/plants11020220>
- United States Food and Drug Administration. (2021). Sunscreen Drug Products for Over the Counter Human Use. In *OTC Monograph M020*.
- Urueña, C., Cifuentes, C., Castañeda, D., Arango, A., Kaur, P., Asea, A., & Fiorentino, S. (2008a). Petiveria alliacea extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *8*, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-8-60>
- Urueña, C., Cifuentes, C., Castañeda, D., Arango, A., Kaur, P., Asea, A., & Fiorentino, S. (2008b). Petiveria alliacea extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *8*, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-8-60>
- Vink, A. A., & Roza, L. (2001). Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *65*(2–3), 101–104. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00245-7](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00245-7)
- World Health Organization. (2003). Intersun: The global UV project: A guide and compendium. *World Health Organization*, 54.
- World Meteorological Organization (WMO). (2022). *Executive Summary. Scientific Assessment of Ozone Depletion 2022*.

APÉNDICE

Apéndice A: Obtención del extracto acuoso de *P. alliacea*



Apéndice B: Diluciones del extracto acuoso



Apéndice C: Data densitométricas generada con ImageJ para el ensayo de genotoxicidad.

Supercoiled			
Sample	Area	Percent	Densidad relativa
Control -	15.730.418	13.368	1,00
0.1	15.219.832	12.934	0,97
1	19.550.752	16.614	1,24
10	13.261.246	11.270	0,84
20	13.355.489	11.350	0,85
30	10.943.296	9.300	0,70
40	8.511.731	7.233	0,54
50	5.608.761	4.766	0,36
60	6.133.539	5.212	0,39
70	2.529.841	2.150	0,16
80	3.373.619	2.867	0,21
90	2.521.326	2.143	0,16
100	922.184	784	0,06
Control +	11.536	10	0,00
Circular relajada			
Sample	Area	Percent	Densidad relativa
Control -	207678,00	117	0,02
0.1	171435,00	96	0,02
1	980062,00	551	0,10
10	3117912,00	1.752	0,31
20	4537033,00	2.549	0,46
30	7173569,00	4.030	0,72
40	8708418,00	4.893	0,88
50	9259418,00	5.202	0,93
60	8522196,00	4.788	0,86
70	9483439,00	5.328	0,96
80	8646510,00	4.858	0,87
90	8993045,00	5.053	0,91
100	9167510,00	5.151	0,92
Control +	7613903,00	5.578	1,00

Lineal			
Sample	Area	Percent	Densidad relativa
Control -	25536,00	98	0,00
0.1	45632,00	214	0,01
1	70778,00	352	0,02
10	147971,00	736	0,04
20	150092,00	747	0,04
30	556719,00	2.771	0,14
40	1141468,00	5.681	0,28
50	1441811,00	7.176	0,35
60	1288983,00	6.415	0,32
70	2499619,00	12.440	0,62
80	1809368,00	9.005	0,45
90	2948146,00	14.673	0,73
100	4032924,00	20.071	0,99
Control +	4005062,00	20.215	1,00

Apéndice D. Data densitométricas generada por ImageJ para el ensayo de fotoprotección.

Tratamiento UV+	Area	Percent	Densidad relativa
0.1%	9.634.167	9.939	0,995
0.5%	9.562.681	9.865	0,988
0.8%	10.500.045	10.832	1,084
1.0%	9.668.095	9.974	0,998
2.5%	8.774.225	9.052	0,906
5.0%	9.912.711	10.226	1,024
7.5%	7.825.196	8.073	0,808
Ctrol -	7.483.024	9.989	1,000
Tratamiento UV-	Area	Percent	Densidad relativa
0.1%	829.435	856	0,086
0.5%	1.494.820	1.542	0,154
0.8%	2.721.719	2.808	0,281
1.0%	7.012.560	7.234	0,724
2.5%	8.742.225	9.019	0,903
5.0%	1.884.062	1.944	0,195
7.5%	632.435	652	0,065
Ctrol +	257.192	265	0,027

Apéndice E. Datos de la curva estándar (qPCR) generada con QuantStudio Design & Analysis Software.

