	GESTIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS Y BIBLIOTECARIOS		CÓDIGO	FO-GS-15	
			VERSIÓN	02	
	<b>ESQUEMA HOJA DE RESUMEN</b>			FECHA	03/04/2017
				PÁGINA	1 de 1
<b>ELABORÓ</b>		<b>REVISÓ</b>	<b>APROBÓ</b>		
Jefe División de Biblioteca		Equipo Operativo de Calidad	Líder de Calidad		

## RESUMEN TRABAJO DE GRADO

**AUTORES:**

**NOMBRE(S)** LISETH BEATRIZ **APELLIDOS** ARÉVALO OCHOA

**FACULTAD:** CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

**DIRECTOR:**

**NOMBRE(S)** NELSON ALFONSO **APELLIDOS** VEGA CONTRERAS

**TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS):** EVALUACIÓN GENOTÓXICA EN LINFOCITOS HUMANOS DE LA ALOÍNA COMPONENTE PRINCIPAL DE UN BIOINSECTICIDA EN LINFOCITOS HUMANOS

**RESUMEN.** Para la evaluación genotóxica de la aloína frente a linfocitos humanos se llevó a cabo la extracción de la aloína de las hojas de Aloe Vera, se le determinaron características fisicoquímicas, los linfocitos humanos y los tratamientos se sometieron a electroforesis alcalina en gel de células (SCGE) o ensayo cometa donde se pudo concluir que la concentración de extracto de aloína es directamente proporcional al daño de los linfocitos humanos.

**PALABRAS CLAVES:** Ensayo cometa, aloína, genotóxica, aloe vera, cromatografía líquida

**CARACTERÍSTICAS**

**PÁGINAS:** 88 **PLANOS:**        **ILUSTRACIONES:**        **CD ROOM:**

EVALUACIÓN GENOTÓXICA EN LINFOCITOS HUMANOS DE LA ALOÍNA  
COMPONENTE PRINCIPAL DE UN BIOINSECTICIDA EN LINFOCITOS HUMANOS

LISETH BEATRIZ ARÉVALO OCHOA

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2022

EVALUACIÓN GENOTÓXICA EN LINFOCITOS HUMANOS DE LA ALOÍNA  
COMPONENTE PRINCIPAL DE UN BIOINSECTICIDA EN LINFOCITOS HUMANOS

LISETH BEATRIZ ARÉVALO OCHOA

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de Ingeniera Biotecnológica

Director

NELSON ALFONSO VEGA CONTRERAS

Magister

Codirector

GERMAN LUCIANO LÓPEZ BARRERA

Magister

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2022

**ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO**

FECHA: 20 diciembre de 2022

HORA: 04:00 P.M.

LUGAR: SC 302 – UFPS - CUCUTA, NORTE DE SANTANDER

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: “EVALUACION GENOTOXICA EN LINFOCITOS HUMANOS DE LA ALOINA  
COMO COMPONENTE PRINCIPAL DE UN BIOINSECTICIDA EN LOS LINFOCITOS  
HUMANOS.”

MODALIDAD: INVESTIGACION

JURADO PAOLA ANDREA ROMÁN HERNÁNDEZ  
ROMINA ESMERALDA FUENTES DÍAZ  
DANNY WALDIR IBARRA VEGA

ENTIDAD: UFPS

DIRECTOR: NELSON ALFONSO VEGA CONTRERAS  
CODIRECTOR: GERMAN LUCIANO LÓPEZ BARRERA

NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
Liseth Beatriz Arevalo Ochoa	1611365	4.3

OBSERVACIONES: APROBADO.

FIRMA DE LOS JURADOS

*Paola Andrea Román H.*

*Romina E. Fuentes D.*

*Danny Ibarra V.*

\_\_\_\_\_  
Paola Andrea Román Hernández Romina Esmeralda Fuentes Diaz Danny Waldir Ibarra Vega

Vo. Bo Coordinador Comité Curricular \_\_\_\_\_

*Gerardo Arango*

## **Agradecimientos**

Primeramente le agradezco a Dios por darme la fortaleza y sabiduría necesaria para el desarrollo de mis estudios.

Al MSc. Nelson Alfonso Vega Contreras por el apoyo y dedicación, por la dirección y sugerencias a lo largo de todo el proyecto.

A mis padres y hermanos, a quienes debo este triunfo profesional, el motor que impulsa mis sueños y esperanzas, ya que siempre han sido un gran apoyo y acompañamiento durante este proceso.

A Daniela Ditta y Karen Luna por su apoyo emocional y aliento, por acompañarme en mis momentos difíciles durante este proceso.

## Tabla de contenido

	pág.
Resumen	12
Introducción	13
1. Problema	15
1.1 Título	15
1.2 Planteamiento del problema	15
1.3 Formulación del problema	17
1.4 Justificación	17
1.5 Objetivos	19
1.5.1 Objetivo general	19
1.5.2 Objetivos específicos	19
1.6 Delimitación	20
1.6.1 Delimitación Espacial	20
1.6.2 Delimitación Temporal	20
1.6.3 Delimitación Conceptual	20
2. Marco referencial	21
2.1 Antecedentes	21
2.1.1 A Nivel Internacional	21
2.1.2 Ámbito nacional	22
2.1.3 Ámbito Regional	24
2.2 Marco teórico	25

2.2.1 Aloe Vera (Barbadensis Miller)	25
2.3 Marco legal	36
3. Metodología	39
3.1 Tipo de investigación	39
3.1.1 Diseño experimental	39
3.2 Población y muestra	40
3.2.1 Población	40
3.2.2 Muestra	40
3.3 Hipótesis	40
3.4 Variables	41
3.4.1 Variable dependiente	41
3.4.2 Variable independiente	41
3.5 Metodología avances. (Descripción detallada).	41
3.5.1 Extracción de la aloína	41
3.5.2 Caracterización Cromatografía	42
3.5.3 Análisis de los datos registrados	42
3.5.4 Genotoxicidad (ensayo test cometa)	43
4. Resultados y análisis	48
4.1 Extracción de aloína	48
4.2 Obtención de los linfocitos	53
4.3 Exposición de los linfocitos a las diferentes concentraciones de extracción de aloína	56
4.4 Solución de lisis	57
4.5 Electroforesis alcalina en gel de células (SCGE) o ensayo cometa	58
4.5.1 Primera capa de Agarosa	58

4.5.2 Segunda capa de Agarosa	<b>Tabla de contenido</b>	59
4.6 Desnaturalización y electroforesis		60
4.7 Neutralización		62
4.8 Coloración y observación de los linfocitos		63
4.9 Visualización		64
4.10 Análisis estadístico		75
5. Conclusiones		79
6. Recomendaciones		80
Referencias bibliográficas		81



## Lista de tablas

	<b>pág.</b>
Tabla 1. Taxonomía de <i>Barbadensis</i> Miller.	27
Tabla 2. Componentes químicos de la planta de <i>Aloe vera</i> .	28
Tabla 3. Resultados del análisis de aloina por UHPLC-ESI-orbitrap- MS en las muestras enviadas	51
Tabla 4. Medidas de los linfocitos en el control positivo	65
Tabla 5. Resumen estadístico de la longitud de cola en el control positivo	65
Tabla 6. Medidas de los linfocitos en el control negativo	66
Tabla 7. Medidas de los linfocitos en el tratamiento	68
Tabla 8. Resumen estadístico de la longitud de la cola en tratamiento C1 (1,0%)	68
Tabla 9. Medidas de los linfocitos en el tratamiento C2 (1.5%)	70
Tabla 10. Resumen estadístico de la longitud de la cola en tratamiento C2 (1,5%)	71
Tabla 11. Medidas de los linfocitos en el tratamiento C3 (2.0%)	73
Tabla 12. Resumen estadístico de la longitud de la cola en tratamiento C3 (2,0%)	74
Tabla 13. Media de la longitud de la cola de cada tratamiento con intervalos de cada media	76
Tabla 14. Longitud de la cola por Tratamiento. Análisis de varianza	77

## Lista de figuras

	<b>pág.</b>
Figura 1. Planta de Aloe Barbadensis Miller	27
Figura 2. Esquema de los principios generales de la formación de la cola del cometa bajo condiciones alcalinas, propuesto por Shaposhnikov et al., 2009	35
Figura 3. Proceso de extracción de aloína. A. Pesaje de pencas de <i>Aloe Barbadensis Miller</i> . B. Proceso de separación del exocarpio del tejido parenquimático o gel de la penca de <i>Aloe Barbadensis Miller</i> . C. Proceso de liquidar el gel de <i>Aloe Barbadensis Miller</i> con etanol al 96%. D. Baño de ultrasonido de la mezcla de etanol al 96% y gel de <i>Aloe Barbadensis Miller</i> .	49
Figura 4. A. Filtrado de la mezcla de etanol al 96% y gel de <i>Aloe Vera</i> . B. Técnica de evaporación del etanol en una placa de calentamiento a 70°C	49
Figura 5. Abundancia relativa de las muestras analizadas	51
Figura 6. Obtención de linfocitos. Muestra de sangre	53
Figura 7. Fraccionamiento de la sangre. Plasma: glóbulos rojos y plaquetas. Fracción inferior: glóbulos rojos	54
Figura 8. Tratamientos con diferentes concentraciones de 1.0, 1,5 y 2.0 de extracción de aloína	56
Figura 9. Tratamientos con diferentes concentraciones donde control positivo (+): Peróxido de Hidrógeno 100uM, control negativo (-): PBS, C1: 70u concentración de aloína al 1,0% y 70u de linfocitos , C2: 70u concentración de aloína al 1,5% y 70u de linfocitos , C3: 70u concentración de aloína al 2,0% y 70u de linfocitos y L: Plasma (Linfocitos) .	56
Figura 10. Solución de lisis	58
Figura 11. Primera capa de agarosa en los portaobjetos	59

Figura 12. Segunda capa de agarosa. A. Cubreobjetos en la segunda capa de agarosa. B. Segunda capa encima de la primera capa de agarosa. C. Portaobjetos en solución de lisis.	60
Figura 13. Electroforesis. A. Portaobjetos en la cámara de electroforesis. B. Proceso de electroforesis	62
Figura 14. Fijación en alcohol al 96%	62
Figura 15. Coloración y observación de linfocitos. A. Coloración de los linfocitos. B. Microscopio b-510 series optika italy	63
Figura 16. Control positivo: peróxido de hidrogeno; TL: Longitud de la cola, TA: área de la cola, %T: % de ADN en la cola y TM: momento de la cola	65
Figura 17. Linfocitos completos. Control negativo: PBS; TL: Longitud de la cola, TA: área de la cola, %T: % de ADN en la cola y TM: momento de la cola	66
Figura 18. Tratamiento con concentración 1.0% de aloína (C1); TL: Longitud de la cola, TA: área de la cola, %T: % de ADN en la cola y TM: momento de la cola	67
Figura 19. Comparación de las medidas de longitud de cola del tratamiento C1 con el control positivo y negativo	69
Figura 20. Tratamiento con concentración 1.5% de aloína (C2); TL: Longitud de la cola, TA: área de la cola, %T: % de ADN en la cola y TM: momento de la cola	70
Figura 21. Comparación de las medidas de longitud de cola del tratamiento C2 con el control positivo y negativo	72
Figura 22. Tratamiento con concentración 2.0% de aloína (C3); TL: Longitud de la cola, TA: área de la cola, %T: % de ADN en la cola y TM: momento de la cola	73
Figura 23. Comparación de las medidas de longitud de cola del tratamiento C3 con el control positivo y negativo	75
Figura 24. Intervalo de la media de la longitud de cola de cada tratamiento	76

## Resumen

La literatura afirma que la aloína cuenta con propiedades bioinsecticidas y es una gran alternativa para la agricultura, pero también es importante evaluar su efecto genotóxico ante los linfocitos humanos, ya que los trabajadores estarán expuestos a esto. Para esto, se llevó a cabo la extracción de la aloína de las hojas de Aloe Vera por medio de la técnica de licuefacción, se le determinaron características fisicoquímicas, se prepararon tratamientos con diferentes concentraciones (1,0%; 1,5% y 2,0%) y para el control positivo se utilizó hidrogeno de peróxido y para el control negativo PBS. Por otro lado se obtuvieron linfocitos humanos de una muestra de sangre propia, extraída en un laboratorio externo a la universidad francisco de Paula Santander.

Los linfocitos humanos y los tratamientos se sometieron a electroforesis alcalina en gel de células (SCGE) o ensayo cometa, las muestras fueron impregnadas en agarosa de bajo punto de fusión, se realizó una técnica de sándwich para protección y fijación de las células. Posteriormente se dejaron sumergidas en solución lisis por 3 horas, seguidamente se sacaron y se desnaturalizaron en buffer por 20min, finalmente se llevaron a electroforesis alcalina. Las muestras se tiñeron con gel red, los linfocitos se observaron en el objetivo de 40x, las imágenes fueron capturadas por optika pro view y evaluadas en el software comet score donde la longitud de cola y el porcentaje de ADN en la cola fueron el parámetro que se tuvo en cuenta para la medición. Mostrando un mayor daño en los tratamientos con concentraciones de 1,5%(C2) y 2,0%(C3). Podemos concluir que la concentración de extracto de aloína es directamente proporcional al daño de los linfocitos humanos.

## Introducción

La mayor parte de los problemas fitosanitarios están causados por bacterias, hongos, insectos o virus que colonizan diferentes partes de la planta atacada, provocando efectos diversos desde una disminución de la calidad de los productos de interés hasta la pérdida total de las cosechas. De ahí que sea del mayor interés el control de las plagas y las enfermedades de los vegetales, sobre todo de los de interés agrícola. (Padilla, 2017). A causa de esto los bioinsecticidas son una gran alternativa para el control de plagas.

Una de las ventajas de la biotecnología agrícola ha sido el impulso del empleo de bioinsecticidas, los cuales tienen como objetivo primordial proteger al ambiente y mejorar la calidad de los alimentos. (Tamez, 2001). Partiendo de esto, queriendo dejar a un lado a los insecticidas a bases de químicos perjudiciales para el ambiente y salud humana, se hacen estudios para dar a conocer los bioinsecticidas a base de extractos naturales que traen mayores beneficios tanto para el cultivo como para la salud humana. Como es el caso de la sábila, en la cual se encuentra la aloína que es el principal compuesto fenólico y el componente mayoritario en las hojas de esta planta. (Groom y Reynolds, 1986, como se citó en Matos, 2011).

Siendo uno de los compuestos que ésta secreta como defensa contra depredadores. (Esteban et al., 2001 como se citó en Matos, 2011). Su principal metabolito secundario es la aloína, el cual es considerado como el principio activo de la planta, se produce en mayor concentración y ha sido empleado como un marcador taxonómico de donde deriva el nombre del género Aloe. Este compuesto, en conjunto con una cantidad alta de fitoquímicos y antioxidantes que se encuentran

en la planta, le confiere las propiedades medicinales y nutritivas que posee. (Pandey y Singh, 2016; Cardarelli et al, 2017).

Aunque es un gran error considerar los productos de origen vegetal y, por ende, los insecticidas vegetales como productos inocuos. Existe una gran cantidad de productos vegetales que son muy tóxicos; basta recordar que Sócrates fue condenado a muerte por ingesta de cicuta (*Cicuta spp.*), un extracto acuoso muy venenoso de esta planta. (Silva, Lagunes, Rodríguez & Rodríguez, 2002). Por esto, las investigaciones relacionadas con el tema de la genotoxicidad adquieren cada día mayor importancia a nivel mundial, debido al creciente deterioro del ambiente al que se encuentra expuesto el hombre moderno. (Arrebola y Fernández, 2003). El ensayo cometa consiste en embeber las células en agarosa de bajo punto de fusión para formar un microgel, someterlas a lisis para remover todas las proteínas celulares y permitir el posterior desenrollamiento por la interrupción de los enlaces por puentes de hidrógeno entre las dobles cadenas del ADN bajo condiciones alcalina/neutras (Arrebola y Fernández, 2003) En base a esto, nuestra investigación busca evaluar la incidencia que tiene la aloína como componente fundamental de un bioinsecticida en los linfocitos humanos, el cual determinaremos con la ayuda del ensayo cometa.

## **1. Problema**

### **1.1 Título**

Evaluación Genotóxica En Linfocitos Humanos De La Aloína Componente Principal De Un Bioinsecticida En Linfocitos Humanos

### **1.2 Planteamiento del problema**

La industrialización, los intereses económicos de los grandes productores de plaguicidas, así como la necesidad de controlar químicamente las plagas, favoreció su fabricación y consumo a escala mundial y originó, a su vez, una carrera incesante en la búsqueda de compuestos análogos menos tóxicos al ser humano y más efectivos y selectivos con las plagas. Sin embargo, al paso de los años se hicieron evidentes los efectos indeseables de los plaguicidas sobre la salud del ser humano y sobre el medio ambiente. Independientemente de sus beneficios, los plaguicidas son sustancias químicas deliberadamente tóxicas, creadas para interferir algún sistema biológico en particular y que carecen de selectividad real. (OMS, 1993). Por esta razón, un gran número de acciones regulatorias se ha llevado a cabo en cuanto al uso indiscriminado de plaguicidas sintéticos debido a todos sus efectos perjudiciales, y se han establecido límites máximos permisibles de residuos de plaguicidas en los alimentos para que puedan comercializarse y consumirse. (Isman, 2006). Por consiguiente, a nivel mundial se ha extendido el uso de insecticidas de origen natural debido a las tantas ventajas que reporta su uso, las cuales van desde menor riesgo para la salud hasta la rápida degradación y la no presencia de residuos en los cultivos. (Pérez, 2012).

El Aloe vera contiene Glucósidos antraquinónicos (aloína, barbaloína, emodina) los cuales estimulan el crecimiento de los fibroblastos y la producción consiguiente de colágenos, de modo que se acelera la cicatrización. (Cameron, 2013). La aloína es una antraquinona y uno de los compuestos más importantes de las hojas Aloe. La concentración de este metabolito secundario en las hojas de Aloe vera está condicionada por diferentes factores como la especie, las condiciones de cultivo, etc. Además, la aloína tiene un gran interés ya que se le atribuye la capacidad antifúngica y bacteriana de los extractos de Aloe. (Valverde et al, s.f.). Ya que es el principal componente del acíbar, que la planta secreta como defensa para alejar a posibles depredadores por su olor y sabor desagradable. También interviene en el proceso de control de la transpiración en condiciones de elevada insolación. (Morales, 2018).

En vista de que la aloína cuenta con propiedades bioinsecticidas, es una gran alternativa para la agricultura pero ¿qué efectos puede desatar esta en los trabajadores expuestos? Ya que dicho componente es un glicósido antraquinónico que le confiere propiedades laxantes al acíbar y se utiliza en 33 preparados farmacéuticos produciendo en ocasiones alergias a personas sensibles. (Morales, 2018). Según Rivero, Rodríguez, Menéndez, Fernández, Barrio y González (2002) la antraquinona es un potente laxante y por ello se debe minimizar hasta concentraciones permitidas o eliminar cuando el gel se va emplear para el consumo directo o como materia prima para la fabricación de otros productos alimenticios, en este sentido la Unión Europea establece el límite máximo de concentración de aloína en productos destinados al consumo humano, siendo éste de 0,1mg/kg (CEE 88/388).



### 1.3 Formulación del problema

¿La aloína como componente principal del bioinsecticida tendrá alguna incidencia en el DNA de los linfocitos humanos?

### 1.4 Justificación

Los principios activos responsables de la actividad antifúngica del Aloe vera no se conocen con exactitud, aunque se ha puesto de manifiesto que algunas moléculas presentes en varias especies de Aloe sp, como aloe-emodina y aloína, tienen actividad antifúngica frente a *Aspergillus* sp, *Fusarium* sp y *Cladosporium* sp. (Ali et al., 1999). El mecanismo de acción por el cual los extractos de aloe inhiben el desarrollo de los hongos no se conoce con exactitud, aunque se ha propuesto que aloína o barbaloina afectan en gran medida a los fosfolípidos de las membranas, lo que conduce a cambios notables en las propiedades físicas de la membrana. Estas alteraciones consisten en cambios de la interfase de lípido/agua en los fosfolípidos cargados negativamente y perturbaciones del núcleo de la bicapa, que están relacionadas con la actividad antimicrobiana de la aloína. (Alves, Pérez, Estepa & Micol, 2004).

En este sentido, en una amplia gama de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas y de cepas de hongos, la aloína y la 7-O methylaloesina A han mostrado una fuerte actividad antimicrobiana. (Asamenew, Bisrat, Mazumder & Asres, 2011). Según estudios realizados el porcentaje de heridas infectadas por los diferentes hongos en las hojas de las diferentes especies de Aloe se correlacionó negativamente con la concentración de aloína de sus geles, lo que indica que la aloína puede ser uno de los componentes más importantes del gel de aloe más importante

relacionado con la actividad antifúngica. (Navarro, 2013). Y aunque el uso de extractos vegetales en el control de plagas toma cada vez más relevancia en el ámbito científico, también es pertinente evaluar el efecto del extracto vegetal en las células humanas, como es en este caso la aloína, pese a que los estándares internacionales, como los establecidos por ASC (Aloe Science Council) y la Unión Europea (CEE Directiva del Consejo 88/388) ha fijado un límite máximo para la concentración de aloína permitidos en alimentos y bebidas de 0,1 mg / kg, la selección de estas plantas con altas concentraciones de aloína, resulta atractivo tanto para programas de mejoramiento genético, como para ser utilizadas comercialmente, cuando su uso es para la industria manufacturera de cosméticos y fármacos. (Molero et al., 2016).

En cuanto a los efectos potenciales del Aloe Vera en las células humanas, el gel suprime la carcinogénesis, la aloína muestra efectos quimioprotectores y el Aloe emodina ha demostrado inhibición de las células cancerosas. (Saravia, 2021). Además, la Aloína, aloe emodina y otras antraquinonas presenta acción laxante, acemanano aumenta permeabilidad intestinal. (Sánchez, López, Sendón & Sanches, 2017). Por otra parte, se ha reportado que la sábila genera beneficios a la salud, como en el caso de Pérez et al. (2007) donde observaron que un extracto metánolico de la sábila disminuyó la resistencia a la insulina en ratones de laboratorio y ésta disminución se relacionó con su capacidad antioxidante; además, el extracto se caracterizó y entre los compuestos mayoritarios se encontró a la aloína. Sin embargo, existen estudios contradictorios que señalan que la aloína actúa como un prooxidante, ocasionando rupturas en las hebras de ADN (Tian y Hua, 2005). En este sentido, la investigación sobre la incidencia de la aloína en los linfocitos humanos suma importancia para la determinación de efectos negativos o positivos a la salud humana y ambiental, tanto para los trabajadores expuestos a su manipulación, como al medio ambiente. Para esto desde hace varias décadas el ensayo Cometa, o electroforesis alcalina

de células individuales, se ha convertido en un método establecido para el estudio del daño de ácido desoxirribonucleico, con múltiples aplicaciones en ensayos de genotoxicidad, estudios de biomonitorio en humanos, epidemiología molecular y ecotoxicología; así como una herramienta fundamental para investigaciones sobre daño y reparación del ácido desoxirribonucleico. (Rey et al., 2016). Para la realización del siguiente proyecto se tendrá en cuenta las siguientes etapas: Una primera etapa que consiste en la caracterización del extracto de aloína por cromatografía el cual permitirá conocer los componentes presentes en dicha muestra, como segunda etapa se determinara los tratamientos a aplicar a los linfocitos humanos, como tercera etapa se determinara la genotoxicidad que podría darse en linfocitos humanos; es por ello que con esto se pretende evaluar la aloína y su posible afectación en las personas.

## 1.5 Objetivos

**1.5.1 Objetivo general.** Evaluar el efecto genotóxico de la Aloína en linfocitos humanos como componente principal de un biopesticida

**1.5.2 Objetivos específicos.** Determinar el rendimiento de la aloína presente en las hojas de Aloe vera de la variedad (*Barbadensis miller*) mediante técnicas de licuefacción.

✓ Caracterizar mediante la técnica de cromatografía líquida la Aloína extraída del ole vera (*Barbadensis miler*).

✓ Identificar el efecto genotoxico de diferentes tratamientos de la aloína en linfocitos humanos.

## **1.6 Delimitación**

**1.6.1 Delimitación Espacial.** El presente trabajo de investigación se llevará a cabo en la Universidad Francisco de Paula Santander en los laboratorios del complejo experimental Campos Elíseos ubicado en el kilómetro 4 en dirección hacia el municipio de los Patios

**1.6.2 Delimitación Temporal.** Se estima que el desarrollo de las actividades programadas en el presente proyecto tendrá una duración de cuatro meses aproximadamente a partir de la aprobación del proyecto.

**1.6.3 Delimitación Conceptual.** En el desarrollo de este proyecto se tendrán en cuenta los siguientes conceptos:

- ✓ Análisis cuantitativo
  
- ✓ Análisis fisicoquímicos
  
- ✓ Espectrofotometría
  
- ✓ Cromatografía líquida

## 2. Marco referencial

### 2.1 Antecedentes

**2.1.1 A Nivel Internacional.** Toxicidad por insecticidas organofosforados en fumigadores de Campaña contra el Dengue, estado Aragua, Venezuela, año 2008. (Gómez & Cáceres G., 2010)

Un estudio descriptivo sobre las condiciones de salud y su relación con la exposición a plaguicidas, de los “fumigadores” de la campaña contra el dengue. Aunque en la investigación no se demostró significación estadística, el estudio observó que a mayor cantidad de años de labor, mayor era la intensidad de los signos y síntomas de intoxicación llegando a producir enfermedades. Se pudo concluir sobre el riesgo presente en los fumigadores de la Corporación de Salud del estado Aragua, los cuales en sus labores: pesan y transfieren insecticidas manualmente, cumplen labores entre seis y ocho horas diarias, la mayoría trabaja con su propia ropa, aunque CORPOSALUD les proporciona mientras están en servicio; guantes, mascarillas, bragas, gorras, botas de seguridad, los cuales no usan con regularidad por resultarles incómodos.

*Obtención y caracterización preliminar de un extracto de Aloe vera L. con actividad antiviral.* (Martínez, Leyes, Castillo, Fernández, Barrio & Sanabia, 2002).

En el presente trabajo se abordó la obtención de un extracto de la corteza de Aloe vera L., su posterior caracterización y la determinación de la efectividad media frente al virus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1). Se concluyó que el extracto obtenido presentó una acción antiviral in vitro frente al virus Herpes *simplex* tipo 1 (HSV-1) en las condiciones de trabajo ensayadas.

**Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*.** (Iannacone & Lamas, 2002).

En la siguiente investigación la rotenona y la azadiractina (componente principal del nim), productos de origen botánico, y el plaguicida carbámico cartap, inicialmente de origen animal, fueron evaluados sobre huevos, larvas de primer instar (L1 ) y pupas de *C. externa*, en bioensayos ecotoxicológicos realizados en el laboratorio. En el estudio ninguna de las tres sustancias provocó efectos en L1 en ensayos de ingestión con huevos de *Sitotroga cerealella* impregnados de las sustancias. Por tanto, la L1 de *C. externa* fue el estado de desarrollo inmaduro más sensible. Se discute la posibilidad de empleo de los insecticidas botánicos y *C. externa* en programas de manejo integrado de plagas.

**2.1.2 Ámbito nacional.** *Actividad insecticida de extractos vegetal es sobre Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia.* (Parra, García & Cotes, 2007)

En la investigación se determinó la toxicidad de extractos etanólicos de *Annona muricata* (guanábana), *Melia azedarach* (cinamono) y *Ricinus communis* (ricino) sobre larvas de cuarto estadio de *Aedes aegypti*. Esta investigación se llevó a cabo mediante un diseño completamente al azar se realizaron bioensayos para determinar la toxicidad de diferentes concentraciones de extractos vegetales sobre *Ae. Aegypti*. Los resultados de toxicidad se consideran promisorios por estar por debajo de la concentración máxima (5 000 ppm) recomendada por la Agencia de Cooperación Técnica Alemana (GTZ). Es necesario evaluar las fracciones de los extractos para detectar posible actividad a concentraciones menores.

***Residuos de insecticidas organoclorados en leche humana y de vaca en Colombia.*** (Melo & Vallejo, 1990).

La siguiente investigación tenía como objetivo determinar la presencia de insecticidas organoclorados en la leche humana y de vaca. Donde se hallaron cantidades detectables de insecticidas organoclorados en gran parte de las muestras; en todas se encontró DDT. En 35% del total de las muestras de leche humana y en 45% de las de leche fresca de vaca se halló lindano (gamma HCH). También se encontraron dieldrina, heptacloro epóxido (metabolito del heptacloro) y transnonacloro (metabolito del clordano) en porcentajes menores de las muestras. Como conclusión debe señalarse que los posibles efectos a largo plazo de los insecticidas, aún no dilucidados, justifican que se consideren un factor de alto riesgo para las comunidades, en especial para los grupos vulnerables.

***Evaluación del potencial genotóxico de fitoproductos autóctonos activos contra Leishmania y Trypanosoma mediante el test de Ames y el ensayo cometa.*** (Navarro, Bonilla & Trujillo, 2006).

En este trabajo evaluaron dos fracciones extraídas de una planta del género Sapindus, con actividad anti-Leishmania y anti-Trypanosoma para determinar su eventual efecto mutagénico o genotóxico, mediante el Test de Ames y el Ensayo Cometa. Y como resultados el test cometa demostró que ninguna de las fracciones es mutagénica en las cepas de Salmonella typhimurium evaluadas, TA-100 y TA-98. De manera interesante, gracias al test cometa se pudo demostrar que la fracción 3S-F mostro no ser genotóxica en linfocitos humanos de sangre periférica, lo cual permite postular esta fracción como

candidato para continuar su desarrollo como posible tratamiento contra la Leishmaniosis y la enfermedad de Chagas.

**2.1.3 Ámbito Regional.** *Evaluación genotóxica del aire de Pamplona-Colombia por el ensayo cometa.* (Quijano, Quijano & Meléndez, 2017).

El objetivo de la investigación fue determinar los Hidrocarburos Aromáticos Poli cíclicos (HAP) extraídos con el sistema Diclorometano-etanol tolueno en muestras del aire de Pamplona (PM 2.5) y evaluar la genotoxicidad por el ensayo cometa. Y como conclusión llegaron a que existe un riesgo para la población expuesta, debido a que el PM del municipio de Pamplona muestra genotoxicidad, la cual probablemente se debe a los HAP Benzo (a) pireno, Benzo (b) fluoranteno, Benzo (k) fluoranteno, Criseno, así como a los metales (Cr, Ni, Pb) encontrados en la materia orgánica del PM2.5 de esta localidad, esta genotoxicidad está relacionada con las emisiones de los motores Diesel que circulan por la ciudad.

***Caracterización mutagénica, genotóxica e identificación de compuestos orgánicos en el material particulado fracción respirable PM2.5 en Pamplona-Norte de Santander-Colombia.*** (Martínez, 2011).

En esta investigación se identificaron los compuestos orgánicos presentes en el material particulado fracción respirable PM2.5 en la ciudad de Pamplona -Norte de Santander-Colombia; se determinó la actividad mutagénica a partir del test de Ames y la detección del daño del DNA por ensayo cometa. La detección del daño del DNA se realizó por medio de la prueba de electroforesis alcalina de células individuales o ensayo cometa; se detectó el rompimiento de



cadena en el DNA en sitios lábiles al álcali de los cometas obtenidos, que se observaron en un microscopio de fluorescencia.

## 2.2 Marco teórico

**2.2.1 Aloe Vera (Barbadensis Miller).** El *Aloe Vera* es una planta de gran interés medicinal utilizada como tal desde hace más de 3000 años. De alrededor de 300 especies de Aloe, se ha demostrado científicamente que son cuatro tipos los que presentan mayores propiedades medicinales: *Aloe Barbadensis Miller*, *Aloe Perryi Baker*, *Aloe ferox* y *Aloe Arborescens*. No obstante, el *Aloe Barbadensis Miller* es considerada como la más utilizada en la medicina curativa y la más popular en el mundo entero llamada comúnmente *Aloe vera*. (Vega, Ampuero, Díaz & Lemus, 2010).

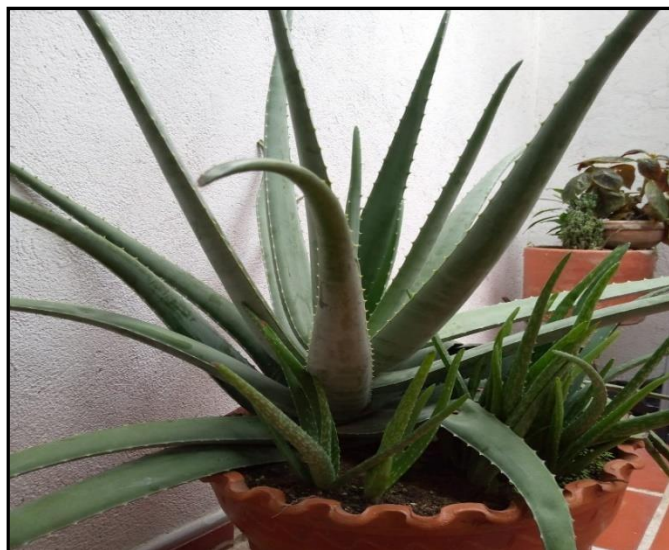
La sábila (también llamada: Aloe (Barbadensis Miller), actualmente se utiliza como antioxidante, estimulante de los procesos digestivos, y cicatrizante. El gel de aloe ha tenido diversas aplicaciones por la actividad biológica de sus componentes, está conformado por agua en un porcentaje de 99,5%, 0,5% restante; corresponde a materia con: vitaminas, minerales, enzimas, polisacáridos, compuestos fenólicos y ácidos orgánicos. (Restrepo y Aristizabal, 2010). De esta lo más utilizado son las hojas, cada una está compuesta por tres capas: una interna que es un gel transparente que contiene 99% de agua y el resto está hecho de glucomananos, aminoácidos, lípidos, esteroides y vitaminas; la capa intermedia o látex que es la savia amarillo amarga contiene antraquinonas y glucósidos y la capa externa gruesa llamada corteza, que tiene la función de protección y síntesis de carbohidratos y proteínas. Dentro de la corteza los haces vasculares son responsables del transporte de sustancias como el

agua (xilema) y almidón (floema). (Surjushe et al. , 2008 y Vega et al. , 2014, como se citó en Ferraro, 2019). En cuanto a la composición química del Aloe vera presenta constituyentes fenólicos; son generalmente clasificados en dos principales grupos: cromonas como la aloesina y antraquinonas como la barbaloína, la isobarbaloína y la aloemodina de la capa interna de las células epidermales de la hoja, siendo responsables de la actividad de laxante drástico del Aloe. La presencia de polisacáridos es lo más destacado de la composición del gel o mucílago de Aloe vera y son ellos los que ostentan las propiedades por las que se conoce. (Martínez et al, 2002).

Entre estos compuestos de la sábila se encuentra la aloína que es el principal compuesto fenólico y el componente mayoritario en las hojas de esta planta (Groom y Reynolds, 1986, como se citó en Matos, 2011). Siendo uno de los compuestos que ésta secreta como defensa contra depredadores (Esteban et al., 2001 como se citó en Matos, 2011). Esta se encuentra en alta concentración en el acíbar (jugo viscoso de color amarillo y sabor amargo que se obtiene de las hojas del Aloe Barbadensis al ser cortadas transversalmente). (Lozano et al, 2011). Por otro lado, la aloína es altamente valorada en la industria farmacéutica pero se considera contaminante en los productos alimenticios a base de Aloe vera. De hecho, en los países europeos, el límite de regulación del contenido de aloína es de 0,1 ppm en alimentos y bebidas, mientras que el Consejo Científico Internacional de Aloe vera (IASC) estableció una concentración de aloína inferior a 10 ppm en una solución de Aloe vera con sólidos al 0.5% para consumo oral (Javed y Atta-Ur-Rahman, 2014 citado en Favela, Cortez, Ríos, Esqueda, Cadillo & Fuentes, 2020).

La aloína (10-C- $\beta$ -glucopiranosido de Aloe-emodin-antrona) es un metabolito considerado como un C-heterósido (o también llamado glucósido antraquinónico) producto de la combinación de una antraquinona simple (genina) con un azúcar (glucosa). La aloína se extrae

de fuentes naturales como una mezcla de dos diastereoisómeros, llamados aloína-A (también conocida como barbaloína) y aloína-B (o isobarbaloína) (Dagne, e, bisrat, d; viljoen, a; van wyk, b-e (2000).



**Figura 1. Planta de Aloe Barbadensis Miller. Fuente Jardín casero**

**Tabla 1. Taxonomía de Barbadensis Miller.**

TAXONOMÍA	
<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Liliopsida
<b>Subclase:</b>	Lilidae
<b>Orden:</b>	Asparagales
<b>Familia:</b>	Asphodelaceae
<b>Subfamilia:</b>	Asphodelaceae

<b>Género:</b>	<i>Aloe</i>
<b>Especie:</b>	<i>Aloe Vera</i>

Nota. Fuente (García Silvia, 2006)

La planta de Aloe Vera, contiene entre 99 y 99.5% de agua, con un pH medio de 4.5. El material restante sólido contiene más de 75 ingredientes diferentes incluyendo vitaminas, minerales, enzimas, azúcares, antraquinonas o compuestos de fenólicos, lignina, saponinas, esteroides, aminoácidos y el ácido salicílico. (Jia, Zhao, y Jia. 2008). La planta contiene vitamina A, antioxidante importante; C; F; B (tiamina), niacina, B2 (riboflavina), colina y el ácido fólico está también presente 2(GIFAP, Bruselas, Bélgica, 1993). Otros investigadores han reportado que la composición química de la Aloe vera está constituida por una mezcla compleja de compuestos como se muestra en la Tabla 2 y que más de 20 de estas sustancias poseen actividades benéficas para la salud.( Reynolds, T. y Dweck A. C. (1999), (Pritam, A. y Kale, P. G. (2007).

**Tabla 2. Componentes químicos de la planta de *Aloe vera*.**

COMPOSICIÓN	COMPUESTOS
<b>Antraquinonas</b>	Ácido aloético, antranol, ácido cinámico, barbaloina, ácido crisofánico, emodina, aloe emodin, éster de ácido cinámico, aloína, isobarbaloina, antraceno, resistanol.
<b>Vitaminas</b>	Ácido fólico, vitamina B1, colina, vitamina B2, vitamina C, vitamina B3, vitamina E, vitamina B6, betacaroteno.

<b>Minerales</b>	Calcio, magnesio, potasio, zinc, sodio, cobre, hierro, manganeso, fosforo, cromo.
<b>Carbohidratos</b>	Celulosa, galactosa, glucosa, xilosa, manosa, arabinosa, aldopentosa, glucomanosa, fructuosa, acemanano, sustancias pépticas, L-ramnosa.
<b>Enzimas</b>	Amilasa, ciclooxidasa, carboxipeptidasa, lipasa, bradikinas, catalasa, oxidasa, fosfatasa alcalina, ciclooxigenasa, superoxido dismutasa.
<b>Lípidos y compuestos orgánicos</b>	Esteroides (campesterol, colesterol, $\beta$ -sitoesterol), ácido salicílico, sorbato de potasio, triglicéridos, lignina, ácido úrico, saponinas, giberelina, triterpenos.
<b>Aminoácidos</b>	Alanina, ácido aspártico, arginina, ácido glut amino, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, tirosina, treonina, valina.

Nota. Fuente (Barbadenses Miller) (Dagne y col., 2000; Choi y Chung, 2003; Ni y col., 2004; Hamman, 2008).

## **Aloe Vera**

La planta de Aloe vera es originaria de África, específicamente de la península de Arabia. Su nombre genérico Aloe proviene del término árabe alloeh que significa sustancia brillante y amarga, se le denomina también con el nombre de sábila; ésta y otras variantes se debe a la deformación del vocablo árabe Cabila que significa planta espinosa. Al continente americano fue introducida por Cristóbal Colón en los tiempos del descubrimiento de América, debido a que éste la utilizaba como medicina para su tripulación. En esos años España ya tenía plantaciones considerables de este vegetal, probablemente dejadas como herencia de la invasión musulmana

(Vega et al., 2005). El Aloe vera durante siglos fue utilizada por sus propiedades medicinales y terapéuticas sin ningún entendimiento claro o análisis científico de cada una de sus propiedades (Eshun y He, 2004).

En el siglo pasado fue descubierto un papiro escrito durante el reinado de Amenhotep, en Egipto. En las rodillas de una momia habían escritas unas 12 formulas diferentes para preparar el Aloe, todas utilizadas los 2.000 años anteriores a su escritura. Al igual se tienen referencias del uso de la planta en el papiro de Ebers, que data de 1.500 a.C. Donde se menciona sus efectos antiinflamatorios y analgésicos. Además, varios mitos populares en Egipto parecen sugerir que el Aloe vera, fue parte importante del régimen de belleza de las reinas Nefertiti (1370-1330 a.C.) y de la famosa reina Cleopatra (69-30 a.C.). (Silva, 2020)

Silva (2020) también menciona que el conquistador Alejandro Magno, dejó constancia de que la valoró mucho para curar las heridas de sus soldados; y en la época de Nerón, el afamado médico Dioscórides, escribió en su tratado de farmacología, una detallada descripción de las múltiples bondades del Aloe.

Por otro lado, en los Estados Unidos, en Japón, en Rusia, en China, el áloe tiene decenas de millones de adeptos, a menudo entusiastas, y existen innumerables publicaciones al respecto. En Francia, a pesar de haber sido uno de los primeros países europeos en reconocer las virtudes medicinales del áloe, los mandarines de la ortodoxia medicinal impidieron durante mucho tiempo que se publicaran estudios científicos que trataran el tema de forma seria. (Schweizer, 1994)

## **Insecticidas**

Teniendo en cuenta que la utilización no siempre racional de los insecticidas, con criterios no adecuados para las decisiones de aplicación, tiene como consecuencias entre otras, el aumento de residuos tóxicos, mayores riesgos para la salud humana y el consecuente impacto ambiental negativo. (Paullier y Folch 2012).

Por ello se hace necesario incorporar a los sistemas de producción aquellos métodos de control, como el control biológico, que reduzcan el uso de plaguicidas químicos y ofrezcan alimentos de calidad y seguros. (Paullier y Folch, 2012). Las restricciones de la sostenibilidad acerca del uso de insecticidas incluyen los efectos sobre la salud humana, los ecosistemas agrícolas (insectos beneficiosos), el medio ambiente en general (especies que no son el objetivo, paisajes y comunidades) y la selección de rasgos que confieren la resistencia a los insecticidas en las especies plagas. Para todas estas categorías es posible encontrar ejemplos donde los insecticidas han sido utilizados de manera desastrosa, y otros donde los peligros que representaban han sido mitigados (accidentalmente o por estrategias implementadas). (Devine et al, 2008).

En el siglo XX, el uso de insecticidas sintéticos fue un paso fundamental en el control de plagas y por lo tanto en el aumento de rendimiento de los cultivos. Sin embargo, los efectos nocivos sobre la salud humana y la ecología han limitado su uso, y una preocupación general de la sociedad es encontrar alternativas que ofrezcan rendimientos en los cultivos similares a los obtenidos con insecticidas sintéticos, sin comprometer a la salud pública y al ambiente. (Rocha-Estrada y García, 2008).

Las vías por las que los plaguicidas sintéticos afectan al humano, son la exposición directa o el consumo de alimentos con residuos de estos compuestos. (PitarchArquimbau, 2001 citado por Rocha y García, 2008). Sin Embargo, la biotecnología agrícola ofrece soluciones a los problemas de pérdidas de cultivos y cosechas por plagas, así como a los riesgos de salud que representa la utilización de insecticidas convencionales. Los biopesticidas, incluyen a organismos entomopatógenos (bacterias, virus, hongos, nemátodos), entomófagos (insectos predadores o parasitoides) o algunos compuestos orgánicos e inorgánicos. (Tamez Guerra et al., 2001 citado por Rocha y García, 2008), Aunque es un gran error considerar los productos de origen vegetal y, por ende, los insecticidas vegetales como productos inocuos. Existe una gran cantidad de productos vegetales que son muy tóxicos; basta recordar que Sócrates fue condenado a muerte por ingesta de cicuta (*Cicuta spp.*), un extracto acuoso muy venenoso de esta planta. (Silva et al, 2002). La mayoría de las especies de plantas que se utilizan en la protección vegetal, exhiben un efecto insectistático más que insecticida. (Rodríguez, 1996 citado por Silva et al, 2002). Es decir, inhiben el desarrollo y comportamiento de los insectos en lugar de matarlos directamente por sus propiedades tóxicas. Sin embargo, no se puede olvidar que algunas sustancias vegetales sí provocan un efecto insecticida, como sucede con las piretrinas, la nicotina o la rotenona (Izuru 1970 citado por Silva et al, 2002) Para ser usada en forma extensiva, no basta con que una planta sea considerada promisorio o con demostradas propiedades insecticidas. Además, se debe hacer análisis de riesgos para el medio ambiente y la salud. (Silva et al, 2002).

### **Genotoxicidad: Ensayo test cometa**

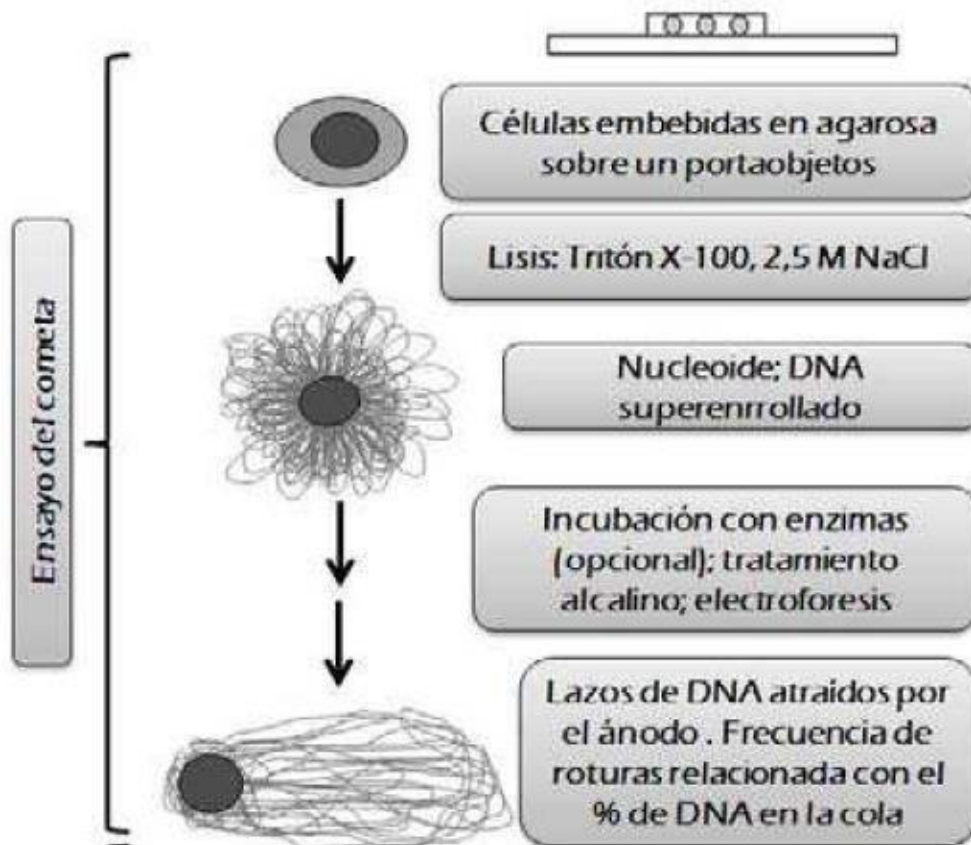
Las investigaciones relacionadas con el tema de la genotoxicidad adquieren cada día mayor importancia a nivel mundial, debido al creciente deterioro del ambiente al que se encuentra



expuesto el hombre moderno. (Mahata et al, 2003; Rajaguru et al, 2003, citado por Arrebola y Fernández, 2003). Como es el ensayo cometa el cual es una técnica altamente sensible para evaluar el daño y la reparación del ADN en cualquier tipo de célula eucariota. Este, en su versión alcalina, permite detectar roturas de simple cadena y sitios sensibles al álcali que se originan durante la reparación dando lugar a la formación de la cola del cometa. (Ayala Mayte Cossio, et al 2004 citado por Martínez, 2011). Las rupturas de simple cadena y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN han sido parámetros ampliamente utilizados para la detección de genotoxicidad y han sido demostradas sus implicaciones en enfermedades degenerativas, el cáncer, y vinculadas al estrés oxidativo. (Arrebola y Fernández, 2003). Una de las pruebas de laboratorio para evaluar el daño genotóxico por estos componentes es el “ensayo cometa o técnica de electroforesis unicelular”; el cual permite medir la magnitud del daño mediante la visualización de núcleos de células sanas comparadas con aquellas que han sido expuestas. Estas últimas, debido a la fragmentación del ADN, se visualizan en forma de cola de cometa, a través de microscopía de fluorescencia. Previo a la observación, la muestra de células deberá ser concentrada y tratada para someterlas a una corrida electroforética en microgeles, y luego teñirlas con bromuro de etidio. (Azqueta et al, 2019 citado por Castro et al, 2019).

El fundamento de este ensayo para detectar daños al ADN producidos por un rompimiento simple o doble en la cadena, daño oxidativo inducido y entrecruzamiento de ADN-ADN/ADN-proteína, se basa en la fragilidad que poseen los sitios dañados; al ser sometidos a un pH superior a trece y su comportamiento en una electroforesis. Los fragmentos de ADN, producto de la acción de la sustancia a probar, afectados por el pH alcalino, migran a una velocidad diferente del resto del material nuclear formando la cola del “cometa”, entre más larga sea esta porción mayor será el daño ocasionado al ADN. (Guevara et al, s.f.). Una excelente aproximación para

demostrar que la cola del cometa, bajo condiciones neutras, corresponde a los lazos relajados, mientras que bajo condiciones alcalinas consiste en fragmentos de ADN. (Klaude et al. 1996 citado por Zúñiga, 2009), un año después, la teoría de la relajación de los lazos ADN se propuso como principio básico para la explicación de la cola del cometa en la versión alcalina del ensayo. (Collins et al., 1997a citado por Zúñiga, 2009). Esta propuesta se basa en la comparación de las características de la electroforesis en el ensayo del cometa con las características de una electroforesis convencional. Es obvio que el ADN durante la electroforesis no migra a modo de fragmentos como sucede en una electroforesis ordinaria, donde la distancia atravesada esta inversamente relacionada con el tamaño de los fragmentos. El ensayo del cometa alcalino posee una capacidad de resolución de unas pocas miles de roturas por célula, por lo que la distancia entre dichas roturas está dentro del orden de  $10^9$  da de ADN, definitivamente mucho más allá del rango de tamaño de los fragmentos para las cuales la electroforesis convencional es adecuada. (Zúñiga, 2009) (Figura 2)



**Figura 2. Esquema de los principios generales de la formación de la cola del cometa bajo condiciones alcalinas, propuesto por Shaposhnikov et al., 2009**

En una investigación Sala (2014), buscaba Evaluar la genotoxicidad utilizando el ensayo cometa en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de Dimetil Sulfoxido (DMSO). Donde los resultados obtenidos nos sugieren que la exposición de células sanguíneas a agentes crioprotectores como el Dimetil sulfoxido (DMSO) no conllevaría a un daño significativo en el ADN, pues con el ensayo cometa tanto por registro visual y el software se comprobó que a exposiciones prolongadas de 30 y 60 minutos en linfocitos aislados no hubo diferencias significativas en relación a los controles ( $p < 0.05$ ), esto nos demuestra que el ensayo cometa ha logrado un gran éxito para detectar una amplia gama de ADN fragmentado.

### 2.3 Marco legal

**Según la constitución política de Colombia en el Decreto 779 de 1.967**, el cual exigió por primera vez el certificado de eficiencia a los plaguicidas. También estableció definiciones precisas sobre ingrediente activo, materiales técnicos, aditivos; señaló requisitos toxicológicos a cargo del Ministerio de Salud y exigencias sobre normas técnicas a cargo del Ministerio de Fomento

**También en la Ley 9 de 1.979, o Código Sanitario Nacional. Ley reglamentada por el Ministerio de Salud en el Decreto 1843 del 22 de julio de 1.991**, el cual a partir de unas nuevas disposiciones generales y definiciones, constituye el marco que rige en la actualidad las actividades relacionadas con plaguicidas en aspectos tales como la producción, proceso y formulación, almacenamiento, distribución, transporte, aplicación aérea de plaguicidas y las medidas de protección del ambiente y de las persona.

**Así mismo, el decreto 1843 de 1.991, originario del Ministerio de Salud Pública, reglamenta el control y vigilancia epidemiológica** en el uso y manejo de plaguicidas, con el objeto de evitar que afecten la salud de la comunidad, la sanidad animal y vegetal o causen deterioro en el ambiente. Igualmente, se establecen controles para las diferentes actividades relacionadas con los plaguicidas y se precisa el concepto toxicológico como una condición previa de los requisitos para la licencia de venta establecida por el ICA.

**Resolución 10834 del 25 de noviembre de 1.992 expedida por el Ministerio de Salud, por la cual se reglamenta parcialmente el capítulo III del decreto 1843 de 1.991.** Con esta

resolución se logran ampliar las categorías y los criterios para la clasificación toxicológica de los plaguicidas, pasando de tres a cuatro categorías; y teniéndose en cuenta los siguientes criterios:

- ✓ Dosis letal media oral y dérmica y concentración letal media inhalatoria en ratas.
- ✓ Estudios de toxicidad crónica.
- ✓ Efectos potenciales cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos.
- ✓ Presentación y formulación.
- ✓ Forma y dosis de aplicación.
- ✓ Persistencia y degradabilidad.
- ✓ Acción Tóxica, aguda, subaguda y crónica en humanos y animales.
- ✓ Factibilidad de diagnóstico médico y tratamiento con recuperación total.
- ✓ Efectos ambientales a corto plazo.

**Resolución 2674 del 2013.** Se modifica parcialmente el decreto 3075 de 1997. Esta tiene como objeto establecer los requisitos sanitarios que deben cumplir las personas naturales y/o jurídicas que ejercen actividades de fabricación, procesamiento, preparación, envasado, almacenamiento, transporte, distribución y comercialización de alimentos y materias primas de

alimentos y requisitos para la notificación permiso o resgitro según el riesgo de vida de la persona.

### 3. Metodología

#### 3.1 Tipo de investigación

La investigación que se llevara a cabo es de tipo descriptivo y explicativa. Jiménez y Martínez (2020) señala que la investigación descriptiva es el procedimiento usado en ciencia para describir las características del fenómeno, sujeto o población a estudiar; se emplea cuando se tiene poca información del fenómeno. Es un tipo de investigación que se utiliza para estudiar a fenómenos o sujetos de forma cualitativa, antes de hacerlo de forma cuantitativa. Por otro lado, Arias (2012) afirma que el modelo explicativo se encarga de buscar el porqué de los hechos mediante el establecimiento de relaciones causa-efecto. En este sentido, los estudios explicativos pueden ocuparse tanto de la determinación de las causas, como de los efectos (investigación experimental), mediante la prueba de hipótesis. Sus resultados y conclusiones constituyen el nivel más profundo de conocimientos.

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente la investigación será de tipo descriptiva, ya que se especificará las características de los efectos que tendrá la aloína como componente principal de un bioinsecticida en los linfocitos humanos, así podremos identificar la relación que puede tener la aloína con las células. Igualmente será de tipo explicativa, ya que se determinará las causas y los efectos de la aloína en los linfocitos humanos, así probando la hipótesis planteada.

**3.1.1 Diseño experimental.** El diseño experimental a emplear en la investigación es un diseño factorial  $2^n$ , en el cual se estudiarán los efectos y las interacciones de los factores sobre los resultados a alcanzar. Los resultados obtenidos se evaluarán aplicando las técnicas de la estadística inferencial mediante análisis de varianza de la genotoxicidad causada en las células

teniendo en cuenta los tratamientos respectivos (ANOVA), y así mismo estas pruebas se analizará por el programa estadístico Statgrafics centurión. Los resultados obtenidos en las diferentes etapas de la investigación se consignarán en tablas y gráficos que junto con el diseño experimental planeado y el empleo del programa Statgrafics centurión para lo cual se realizará un análisis de varianza y comparación de medias de tratamientos con la prueba de Tukey ( $p=0,05$ ).

### **3.2 Población y muestra**

**3.2.1 Población.** Hojas de sábila variedad *Aloe Barbadensis* miller adquiridos de jardín casero

**3.2.2 Muestra.** Se trabajarán con 5 kg de hoja fresca de sábila para realizar la extracción de la aloína y posterior caracterización físico química, así mismo se tomarán muestras de sangre de fuentes propias para realizar la aplicación de tratamiento sobre ellos y posterior evaluación de la incidencia del bioinsecticida en los linfocitos humanos.

### **3.3 Hipótesis**

Ha: ¿Tendrá la aloína como bioinsecticida alguna incidencia sobre los linfocitos humanos?

Ho: ¿No tendrá la aloína como bioinsecticida alguna incidencia sobre los linfocitos humanos?



### 3.4 Variables

**3.4.1 Variable dependiente.** Las variables dependientes corresponden a la visualización de núcleos de células sanas comparadas con aquellas que han sido expuestas.

**3.4.2 Variable independiente.** Las variables independientes corresponden a la concentración de aloína.

### 3.5 Metodología avances. (Descripción detallada).

**3.5.1 Extracción de la aloína.** Para el proceso de extracción se realizará un proceso de separación manual por fileteado siguiendo la metodología (Conti, P., Simonetti, R., Lozano, E. y Figueroa, L. (2006). la cual consiste en realizar cortes manuales a la hoja realizando fileteando, el gel se extraerá con un cuchillo a partir de aproximadamente 2.5 cm desde la base de la hoja abarcando su extremo superior y las partes laterales, el gel obtenido se licua con aspas de acero, posterior a ello la extracción se realizará con una mezcla de etanol al 96°C y agua como solventes en una relación 1.1. (Sydiskis, RJ, Owen DG, Lohr JL, Roster1991), utilizando aproximadamente una cantidad de 20 g para cada extracción, la cual se almacenarán en bolsas plásticas con selo hermetico y seguidamente la mezcla será asistida por ultra sonido (Park, M; Park, J; Young, N; Gaun, Y; Seok, Y; Gyun, J; Ho, K; Ki, S (1998). Para ello se tomará una cantidad del material de licuefacción, se agregarán 15 ml de etanol y se pasará por un ultrasonido

de marca Branson por un tiempo de 60 minutos manteniendo la temperatura de 65°C, seguidamente se realizará el proceso de filtración

**3.5.2 Caracterización Cromatografía.** La separación cromatográfica de aloína en las muestras de sábila se realizará en un cromatógrafo líquido de alta resolución operado a 293 nm. Como fase móvil se empleará metanol/agua (50:50% v/v) a un flujo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> y como fase estacionaria una columna ZORBAX SB-C18. (Sánchez & Santa, 2009), (Henwimol, Pasavant & Shotipruk, 2006). De igual manera se realizará un estudio de precisión del método en términos de repetitividad y reproducibilidad. Para la obtención del valor de la producción de aloína por planta se aplicará la siguiente fórmula planteada por Molero, Ettiene, y Vilorio (2016):

**Producción de aloína** = Concentración de aloína x masa seca

100.

**3.5.3 Análisis de los datos registrados.** Los datos obtenidos se determinarán con algunas medidas valor máximo, valor mínimo medio.

### **Análisis fisicoquímicos**

**Humedad:** Se determinará el porcentaje de humedad del gel por diferencia de peso secando la muestra en el horno a 105 °C por 24 horas. (Hamman & Viljoen, 2008).

**Cenizas:** El gel se le determinara el porcentaje de cenizas por diferencia de peso, incinerando la muestra en la mufla a 475 °C por 5 horas. (Hamman & Viljoen, 2008).

**pH:** Para la determinación del pH del gel se empleará el método potenciométrico y una relación muestra-agua (1:1). (Hamman & Viljoen, 2008).

**Densidad.** En una propiedad intensiva de la materia que no depende de la cantidad de sustancia analizada, indica la consistencia de una sustancia y varía con respecto a la presión y a la presión.

La densidad se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\rho = m/V \text{ (Dónde: } m = \text{ masa y } V = \text{ volumen).}$$

#### **3.5.4 Genotoxicidad (ensayo test cometa). Preparación de las células**

Se obtendrá una muestra de sangre (3 mL) en un tubo Vacutainer con heparina y se coloca en el agitador hasta que la muestra se encuentre completamente homogenizada, para evitar su coagulación. Con ayuda de la micropipeta, se tomaran alícuotas de 15  $\mu\text{L}$  de la muestra de sangre y se colocan en el fondo de los tubos Eppendorf; después se agregan 225  $\mu\text{L}$  de agarosa de bajo punto de fusión y se homogeniza con el vortex.

De la mezcla se toman 75  $\mu\text{L}$  y se colocan sobre una cama de electroforesis, y enseguida se les coloca un cubreobjetos. Las laminillas se colocan en la charola de aluminio para llevarse a

refrigeración 5 min. Transcurrido el tiempo, se retira de forma delicada el cubreobjetos de la laminilla y se agregan de 75 a 80  $\mu\text{L}$  de agarosa de bajo punto de fusión.

Se coloca un nuevo cubreobjetos y se pone en la charola para llevarse a refrigeración 5 min más. Transcurrido el tiempo, se retira de forma cuidadosa el cubreobjetos y se desecha. Las laminillas se colocan en pares (espalda con espalda) en el vaso Coplin con la solución de lisis

### **Preparación de cámaras de electroforesis**

Para la preparación de las cámaras de electroforesis deben usarse guantes en todo momento. Se colocan las laminillas con el esmerilado hacia arriba en un vaso de precipitado con etanol anhidro, se tapan con papel Parafilm y se dejan por un tiempo mínimo de 30 min, mientras este tiempo transcurre, se cortan trozos de gasa en forma de cuadros y se preparan con aluminio las charolas donde se colocarán las laminillas. Las laminillas se toman con una pinza por el lado esmerilado y se limpian con la gasa, posteriormente se colocan en las charolas y se rotulan por la parte esmerilada. A cada laminilla se le colocan 150  $\mu\text{L}$  de agarosa regular. La agarosa se distribuye por toda la laminilla con la ayuda de la punta del dedo limpio, las laminillas con la cámara de agarosa se colocan en las charolas y se secan en el horno a una temperatura de 65 a 70  $^{\circ}\text{C}$ . Una vez que estén bien secas y frías, pueden ser almacenadas en cajas porta laminillas. Se deben utilizar antes de 2 semanas, de lo contrario se desechan.

### **Preparación de las laminillas**

En la charola se agregan 50 mL de la solución de lisis. Esta solución se vierte con una probeta. El vaso debe almacenarse en el cuarto frío por lo menos 1 h antes de su uso.

Los portaobjetos o laminillas se sumergen en el vaso Coplin por lo menos 1 h antes de pasar a la electroforesis.

### **Electroforesis**

En el cuarto frío se coloca la cámara de electroforesis en la mesa. Debe asegurarse que la cámara este en posición totalmente horizontal, y para ello se verifica que la burbuja indicadora se encuentre en posición centrada; de lo contrario, se ajustan las patas hasta la posición adecuada. Después, la cámara se conecta a la fuente de poder, de acuerdo con el color y la polaridad de los cables (rojo-positivo, negro negativo). El trabajo a partir de este momento debe realizarse en completa oscuridad y solo con ayuda de la lámpara de luz amarilla, con la finalidad de no dañar el ADN con la luz.

Se coloca la solución de electroforesis en la cámara, hasta la plataforma por ambos lados, sin que la solución se junte. Después se colocan las laminillas en la cámara, tomándolas con las pinzas por la parte esmerilada y asegurándose de que estén en la dirección correcta. Se vierte la solución de electroforesis hasta cubrir las laminillas, asegurándose de que no queden burbujas debajo de las laminillas.

Las laminillas se quedan en la solución de electroforesis durante 20 min (tiempo de des enrollamiento). Mientras transcurre este tiempo, se configuran los parámetros de la fuente de poder a 25 V, 300 A y 20 min. Transcurrido el tiempo, se coloca la tapa y se procede a encender la fuente de poder con los parámetros configurados previamente. Se observa unos segundos la formación de espuma y un valor constante de 300A, lo que indica que la electroforesis se está llevando a cabo correctamente. Si el valor de 300 A disminuye, se deberá colocar más solución de electroforesis por un costado de la cámara hasta obtener el valor deseado. Después se coloca la placa metálica que cubre la cámara. Una vez finalizado el tiempo de la electroforesis se debe apagar la fuente, para quitar la tapa. Las laminillas se sacan con las pinzas y se secan por debajo con papel absorbente.

Las laminillas se colocan en la charola de lavados y se les agrega solución de Trisma Base 0.4 M, aproximadamente el volumen completo de una pipeta Pasteur por muestra. Se dejan reposar 5 min y se repite el lavado. Se escurren y se les agrega etanol anhidro, aproximadamente el volumen completo de una pipeta Pasteur por muestra. Se dejan reposar 5 min más y se repite el lavado con etanol.

Finalmente, las laminillas se escurren y son colocadas en el vaso Coplin con etanol anhidro otros 5 min. Se sacan, se limpian por debajo con papel absorbente, se dejan secar y se guardan en una caja porta laminillas.

### **Tinción de las células**

Inmediatamente antes de la observación al microscopio, a la laminilla que se va a leer se le agregan 25  $\mu$ L de la solución de trabajo de bromuro de etidio y se le coloca un cubreobjetos.

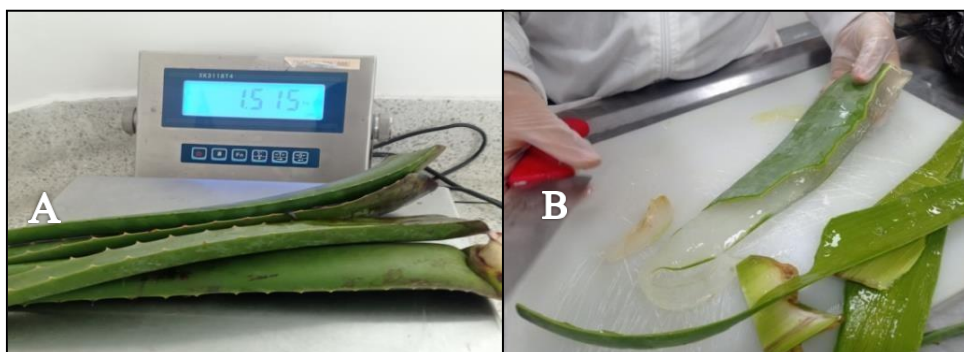
### **Lectura de resultados**

Las laminillas previamente teñidas se colocan en el microscopio, se enfocan con el objetivo de 20X hasta ver de forma adecuada el campo. Posterior a ello se procede a la lectura con la técnica circular (la lectura se inicia en el centro de la laminilla y se continua la lectura en círculos o zig-zag (se empieza a leer la laminilla desde el extremo superior izquierdo hacia el extremo superior derecho y se continua a partir de este punto con movimientos en zig-zag). Así mismo se procederá a tomar las respectivas fotografías de las placas las cuales serán analizadas con el programa Comet Score que permitirá identificar los posibles cometas formados, teniendo en cuenta la degradación del DNA.

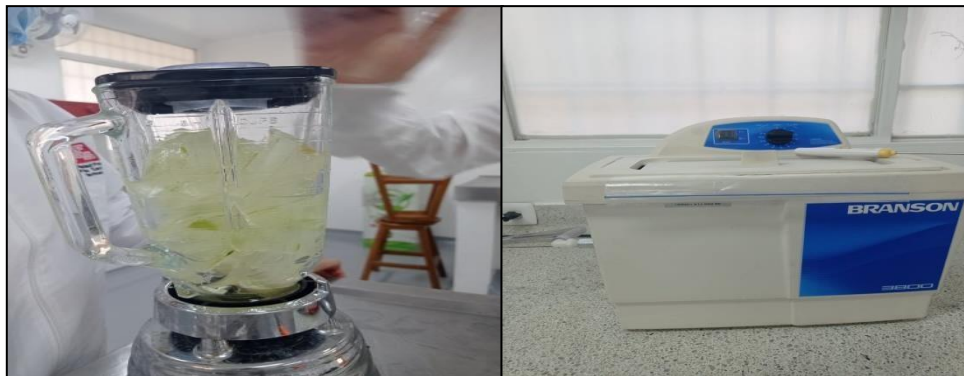
## 4. Resultados y análisis

### 4.1 Extracción de aloína

Para la extracción de aloína se utilizaron 2kg de hojas de Aloe vera, donde se realizaron cortes longitudinales de estas con el fin de extraer el gel del Aloe, posteriormente se realizó un proceso de licuefacción utilizando agua destilada en relación 1:1 de acuerdo a la cantidad de gel obtenida del cual se obtuvo 500 ml de esta solución, posterior a ello se mezclaron con 375 ml de etanol al 96%, que de acuerdo con Tadeo, et al. (2010) los métodos de extracción con solventes orgánicos constituyen los procedimientos más empleados para la extracción de aloína, seguidamente esta mezcla se almaceno en una bolsa ziploc y se sometió a proceso de ultrasonido en un equipo Branson 3800-CPXH 5.7L por un tiempo de 60 minutos a una temperatura de 65°C. Autores como Sánchez y Santa, (2009) y Henwimol et al., (2006), han demostrado que la extracción de aloína con solventes orgánicos asistida por ultrasonido ser mucho más simple, rápida y eficaz que otros métodos convencionales (soxhlet, reflujo y maceración) para extraer los compuestos orgánicos de los vegetales.

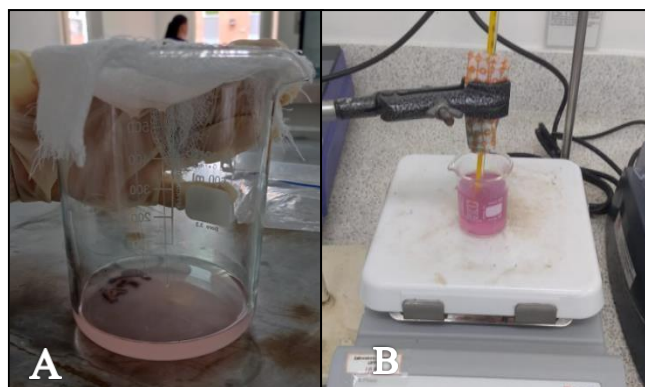






**Figura 3. Proceso de extracción de aloína. A. Pesaje de pencas de *Aloe Barbadensis Miller*. B. Proceso de separación del exocarpio del tejido parenquimático o gel de la penca de *Aloe Barbadensis Miller*. C. Proceso de liquidar el gel de *Aloe Barbadensis Miller* con etanol al 96%. D. Baño de ultrasonido de la mezcla de etanol al 96% y gel de *Aloe Barbadensis Miller*.**

Seguidamente se realizó un proceso de filtración con el cual se obtuvo 160 ml de aloína – etanol, la cual seguidamente se lleva a calentamiento a una temperatura de 70°C, para evaporar el etanol, es importante resaltar que la temperatura para evaporar el etanol es de 78.5°C, Guerreiro 2010, obteniéndose 100ml de la aloína concentrada, la cual se almacena en un refrigerador posteriormente.



**Figura 4. A. Filtrado de la mezcla de etanol al 96% y gel de *Aloe Vera*. B. Técnica de evaporación del etanol en una placa de calentamiento a 70°C**

En cuanto a parámetros fisicoquímicos de la aloína obtenida se midió el pH y los grados Brix los cuales se obtuvieron valores de 5.13 y 3° respectivamente.

### **Identificación cromatografía**

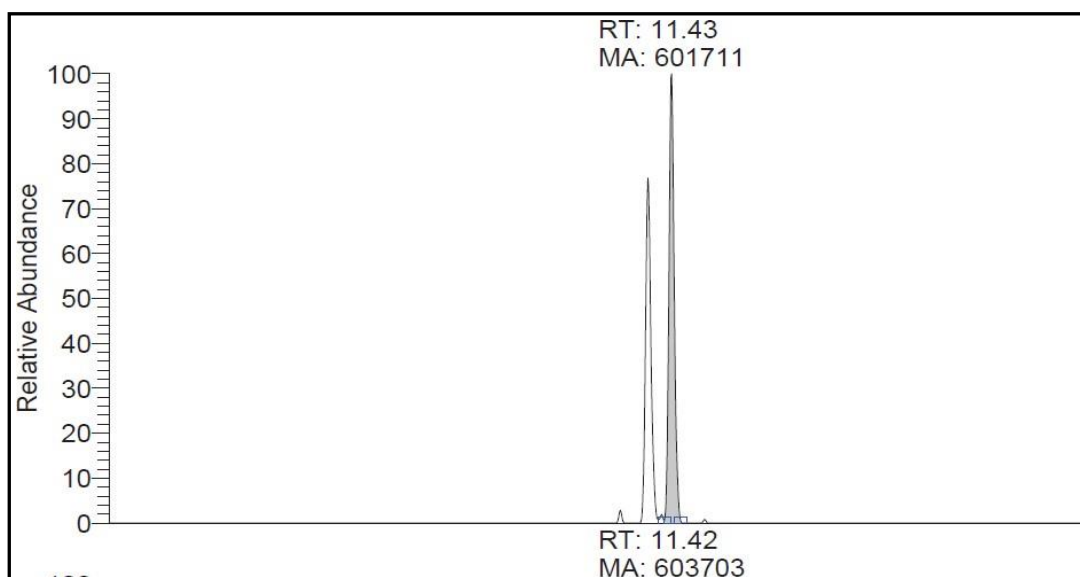
Una vez obtenido la aloína concentrada se realizó el análisis por cromatografía de gases para lo cual se utilizó un equipo (UHPLC), Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.), equipado con una bomba binaria de gradiente (HP G3400RS), un inyector automático de muestras (WPS 300TRS) y una unidad termostada para la columna (TCC 3000). La interfaz del LC-MS fue la electronebulización (ESI) y el espectrómetro de masas fue de alta resolución con un sistema de detección de corrientes de iones Orbitrap, operada en modo negativo con un voltaje de capilar de 4,5 kV, la separación cromatografía se realizó en una columna Hypersil GOLD Aq (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.; 100 x 2.1 mm, 1.9 µm de tamaño de partícula) a 30° C, la fase móvil fue: A una solución acuosa de 1% de ácido fórmico y B acetonitrilo. La condición inicial de gradiente fue de 100% A, cambiando linealmente hasta 100% B (8 min); se mantuvo durante 4 min; el retornó a las condiciones iniciales en 1 min; el tiempo total de corrida fue de 13 min, con 3 min para post-corrída.

La identificación de los compuestos se realizó usando el modo negativo de adquisición full scan y extracción de iones (EIC) correspondientes a los [M-H]<sup>-</sup> de compuestos de interés, medición de masas con exactitud y precisión de  $\Delta\text{ppm} < 1$  y usando una solución de referencia de aloína (sustancia(s) certificada(s) estándar), la tabla 19 se observa la concentración de Aloína presente en gel de aloe el cual presento una concentración de 128.2 mg/kg lo cual demuestra una

concentración alta de aloína, así mismo la figura 5 se permite resaltar la abundancia relativa presente en la muestra con un tiempo de retención de 11.43 respectivamente.

**Tabla 3. Resultados del análisis de aloína por UHPLC-ESI-orbitrap- MS en las muestras enviadas**

Compuesto	$t_R$ , min	NMC, $\text{mg kg}^{-1}$	Concentración en las muestras, $\text{mg kg}^{-1}$ *
			992560-01-EB
Análisis cualitativo de contenido de aloína			
Aloína	11,4	0,1	128,2



**Figura 5. Abundancia relativa de las muestras analizadas**

A si mismo se realizaron los cálculos de la producción de aloína en la planta de sábila que se utilizó para la extracción, estos fueron solo para la sábila utilizada para la investigación ya que la producción de la aloína depende de algunos factores. Según Hazrati, Tahmasebi y Babaei.

(2012), estudios han demostrado que cuando los suelos donde se siembra la sábila se fertilizan con nitrógeno, se logra aumentar la cantidad de aloína producida en la planta.

Otro factor que podría influir en la producción de aloína, es la propia constitución genética de la planta, como se ha visto, el clima y el suelo de cada zona muestreada presentan sus particularidades a las cuales tienen que adaptarse las plantas Sepúlveda Jiménez, et al. (2003).

$$\text{Producción de aloína} = \frac{\text{Concentración de aloína} \times \text{masa seca}}{100}.$$

$$\text{Producción de aloína} = \frac{(128,2\text{mg} \frac{\text{kg}}{\text{d}}) * (1,250 \text{ kg})}{100} = 1.6025$$

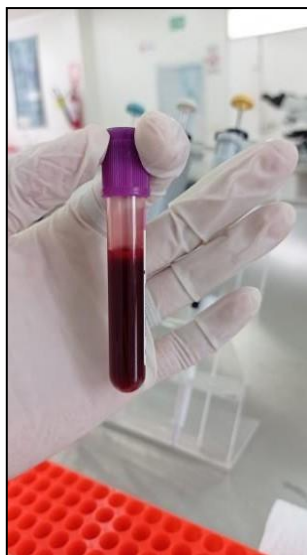
Posteriormente calculamos el rendimiento porcentual del proceso, con PI hace referencia al producto inicial y PF es el producto final.

$$\%R = \frac{PI - PF}{PI} * 100 = \frac{(1250\text{ml}) - (100\text{ml})}{(1250\text{ml})} * 100 = 92\%$$

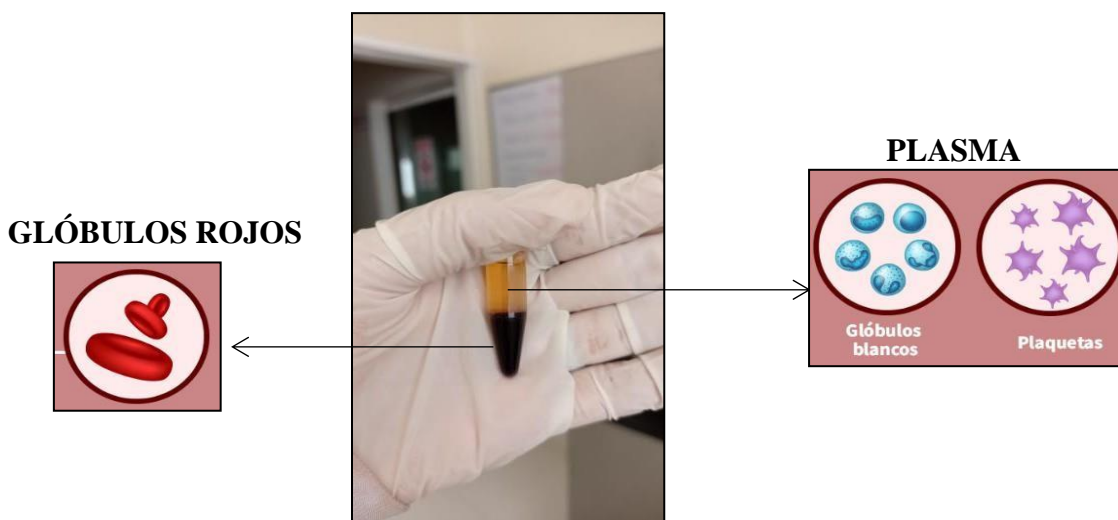
Según Parada, (2021) mientras mayor es el rendimiento, mientras más cercano esté al 100%, la reacción ha avanzado en mayor grado por lo que la mayor parte del producto se puede recuperar y pesar, por lo que el rendimiento obtenido fue de 92%, lo que indica un porcentaje alto de aloína presente en el *Aloe vera*.

## 4.2 Obtención de los linfocitos

Se extrajo con jeringa hipodérmica en un tubo con heparina 3ml de sangre periférica, de un paciente en el rango de edad entre los 25 y 30 años de edad esta extracción se realizó en un laboratorio clínico donde las muestras fueron llevadas laboratorio de biología molecular, sede campos elíseos de la UFPS. (Figura 6). Seguidamente, con la ayuda de una micropipeta se dividió la muestra en dos microtubos de 1.5ml y se procedió a centrifugar la muestra de sangre total a 1000 rpm durante 5 minutos, luego de la formación de tres capas, se extrajo el plasma el cual es la primera capa y se almaceno en otro micro tubo. (Figura 7).



**Figura 6. Obtención de linfocitos. Muestra de sangre**



**Figura 7. Fraccionamiento de la sangre. Plasma: glóbulos rojos y plaquetas. Fracción inferior: glóbulos rojos**

Seguidamente con el plasma obtenido, se realizaron los diferentes tratamientos según concentraciones del extracto de aloína. Estos tratamientos se realizaron en tres concentraciones diferentes 1.0, 1.5 y 2.0.

Se realizaron cálculos para determinar qué cantidad de extracto de aloína a usar en cada tratamiento. Se utilizó la fórmula de dilución donde  $C_1$  es el porcentaje de la concentración de la aloína, el cual se tomó 95% ya que en este caso se tenía la aloína pura, por otro lado, para el volumen inicial ( $V_1$ ) se tomó 50ml de agua destilada y para la  $C_2$  se tuvo en cuenta la concentración a la que se quiere llegar.

$$C1*V1=C2*V2$$

$$\frac{(95\%)*(50\text{ml})}{(1.0\%)} = 4.7\text{ml de aloina}$$

$$\frac{(95\%)*(50\text{ml})}{(2.0\%)} = 2.3\text{ml de aloina}$$

$$\frac{(95\%)*(50\text{ml})}{(1.5\%)} = 3.1\text{ml de aloina}$$

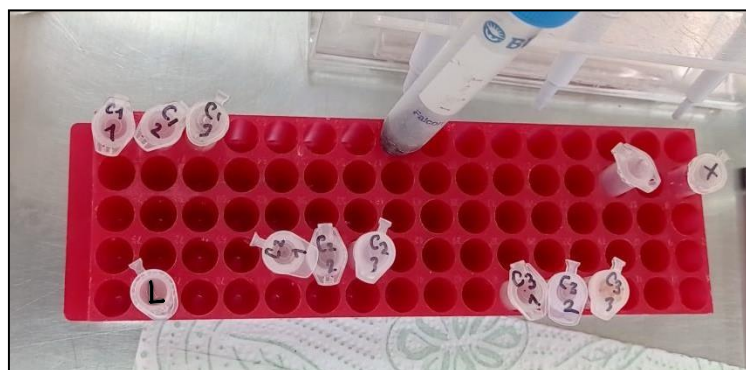
Para el tratamiento con concentración 1.0, en un balón aforado de 50ml se tomó 4.7ml de la extracción de aloína y se aforo con agua destilada, para el tratamiento con concentración de 1.5 de tomo 3.1ml de extracción de aloína y se aforo con agua destilada y para el tratamiento con concentración 2.0 se tomó 2.3ml de extracción de aloína y se aforo (figura 8), para el control negativo se utilizó PBS, ya que ha presentado efectividad en investigación donde las células expuestas al Buffer Fosfato (PBS) no presentaron ninguna migración y mantuvieron su forma esférica. (Catillo, 2012). Por otro lado, para el control positivo se utilizó Peróxido de Hidrógeno 100uM, ya que este es un compuesto químico conocido ampliamente por su poder oxidante. En el material genético produce alteraciones que se expresan a manera de rupturas de cadena sencilla y doble, además de modificaciones de bases sensibles al álcali. (Marnett, 1987). Se escogió como control positivo, ya que es un compuesto altamente utilizado como control positivo en estudios de genotoxicidad dentro de los que se encuentra el ensayo cometa. (Sotil, Alvis, Francia & Shiga, 2007; Soler, Velásquez & Soler, 2008)



**Figura 8. Tratamientos con diferentes concentraciones de 1.0, 1,5 y 2.0 de extracción de aloína**

#### **4.3 Exposición de los linfocitos a las diferentes concentraciones de extracción de aloína**

Se hizo una mezcla de 1:1 con las diferentes concentraciones de aloína y los linfocitos, donde fueron 70ul de linfocitos y 70ul de cada tratamiento, se realizaron 3 repeticiones por tratamiento, para el control negativo se utilizó 70ul de PBS con 70ul de linfocitos y para el control positivo fueron 70ul de peróxido de hidrogeno y 70ul de linfocitos. Estos fueron expuestos por 30 minutos a temperatura ambiente.



**Figura 9. Tratamientos con diferentes concentraciones donde control positivo (+): Peróxido de Hidrógeno 100uM, control negativo (-): PBS, C1: 70u concentración de aloína al 1,0% y**



**70u de linfocitos , C2: 70u concentración de aloína al 1,5% y 70u de linfocitos , C3: 70u concentración de aloína al 2,0% y 70u de linfocitos y L: Plasma (Linfocitos) .**

#### **4.4 Solución de lisis**

Para la elaboración de la solución de lisis en un vaso precipitado se agregó 4ml de Trisma Base (0.5 M), 40ml de EDTA (0,5M, PH 8), 20ml de DMSO, 2ml de Triton x100 1%. En investigaciones realizadas por Vergara, (2010) de acuerdo a los resultados es posible afirmar que es la mejor solución de lisis, ya que fue comparada con otras soluciones de lisis donde se demostró que el SDS no es un detergente tan fuerte como el Tritón X-100, lo cual no garantiza la lisis de los eritrocitos y linfocitos, sin afectar el ADN de estos últimos. (Jiménez & Martínez 2000).

El fundamento bioquímico del empleo de altas concentraciones de sales y detergentes en el proceso está dado por la degradación de las membranas celular y nuclear. Algunos tipos celulares requieren de otros detergentes para la lisis total de membranas. (Mudry y Carballo 2006, Liao et al. 2009, Zúñiga 2009). Posteriormente en una balanza analítica se pesó 29,22g de NaCl y este se le agrego a la mezcla anterior. Después se mezcló hasta que el NaCl se disolviera y se aforo hasta 200ml. Cuando los reactivos están disueltos, se mide el pH, el cual deberá tener un valor de 10, teniendo en cuenta que las soluciones de lisis pueden ser neutras o alcalinas de acuerdo a los objetivos del estudio (Zúñiga, 2009). Se agregó gota a gota la solución de NaOH 10 N para elevar los valores de pH hasta obtener el valor deseado. Se almaceno en un frasco ámbar debidamente etiquetado, posteriormente, se llevó a esterilizar en la autoclave.



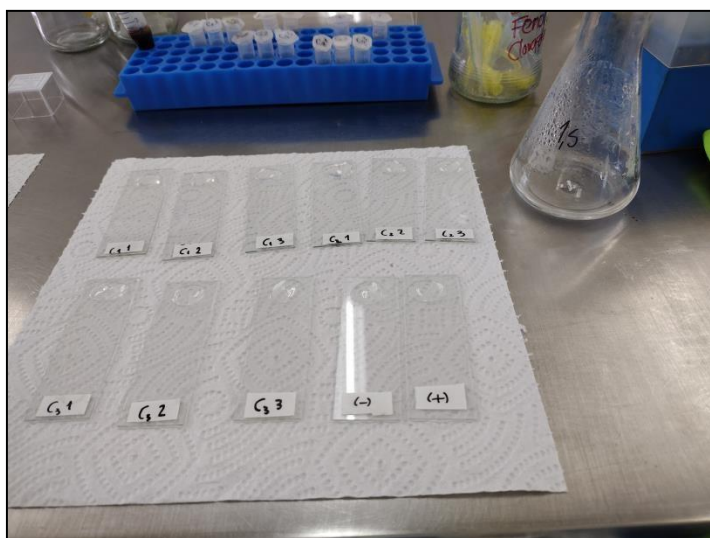
**Figura 10. Solución de lisis**

#### **4.5 Electroforesis alcalina en gel de células (SCGE) o ensayo cometa**

Para llevar a cabo la electroforesis alcalina en gel de células (SCGE) primero se prepararon los portaobjetos donde se llevó a cabo como un procedimiento de dos capas, que de acuerdo con Zúñiga L (2009) estas capas son esenciales por dos objetivos, principalmente el primero brindar un soporte adecuado a las células a analizar y también para lograr la mejor visualización posible. Para cumplir con estas capas se preparó agarosa al 1.5% y al 1.0% en 10ml de buffer, donde para la concentración 1.5 se pesó 0.15g de agarosa y se calentó con 10ml de buffer y para la concentración 1.0 se pesó 0.1g de agarosa y se calentó con 10ml de buffer.

**4.5.1 Primera capa de Agarosa.** En láminas portaobjetos limpias, libres de grasa y con 2cm de un extremo esmerilado, se colocó 140ul de agarosa normal al 1,5% en la parte esmerilada (figura 4.9) y se llevó a refrigerar, hasta que la capa de agarosa solidifique (5 minutos

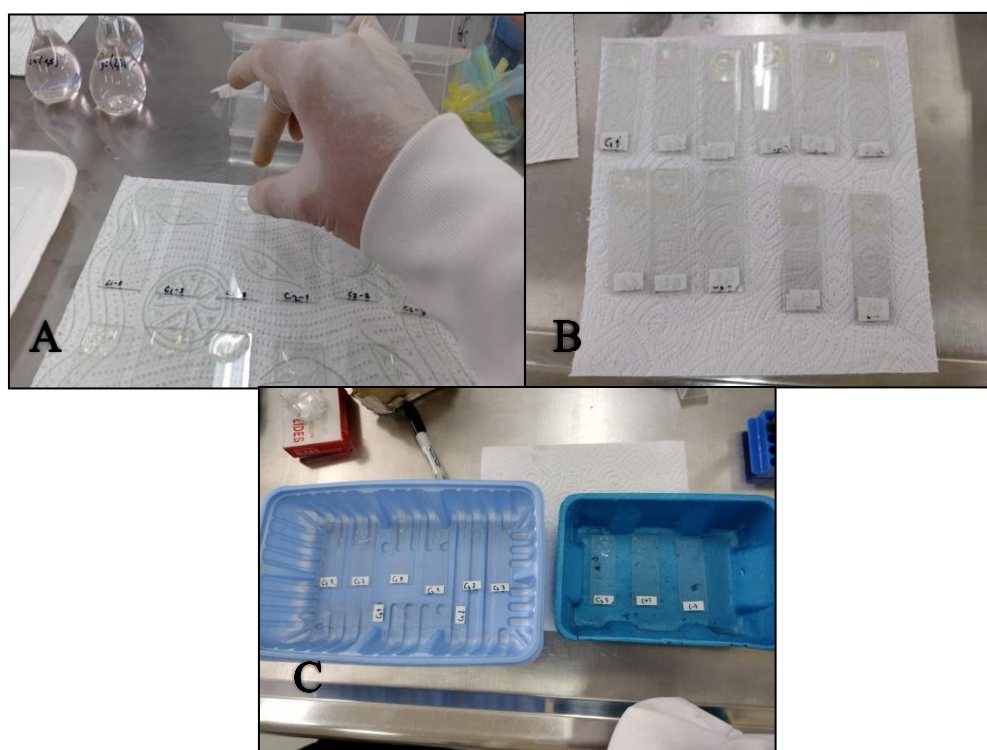
aproximadamente). De acuerdo a Zuñiga L (2009) la primera es una capa de agarosa de punto de fusión normal que sirve de base a la capa celular, para conferirle mejor adherencia, el autor también menciona que el empleo de una sola capa es una posibilidad poco usada actualmente, puesto que su uso requiere de mucho cuidado en la manipulación y además es mayor el trabajo para la visualización de los cometas. Teniendo esto en cuenta se realizó posteriormente la segunda capa.



**Figura 11. Primera capa de agarosa en los portaobjetos**

**4.5.2 Segunda capa de Agarosa.** En la parte esmerilada del portaobjetos se tomó 70ul de cada tratamiento y se mezcló cada uno, suavemente con 140ul de agarosa de bajo punto de fusión al 1%, esto se recubrió con un cubreobjetos. Posteriormente se llevó a refrigerar durante 5 minutos, el tiempo de refrigeración es importante ya que según Ritter y Knebel 2009, Cada capa debe solidificarse antes de agregar una capa superior. Seguido a esto con la primera capa de agarosa se cubrió la segunda capa de agarosa, lo más común es el uso de tres capas de agarosa a modo de sándwich. En este caso las células de interés son suspendidas en agarosa de bajo punto

de fusión, generalmente a 37°C, y colocadas entre una primera y tercera capa (Mudry y Carballo 2006, Liao et al. 2009). La última o tercera capa de agarosa es igualmente de bajo punto de fusión y juega principalmente un papel protector (Zúñiga 2009). Una vez solidificada la última capa se retiró el cubreobjetos y los portaobjetos, dejando solo el portaobjetos con la segunda capa, posteriormente estos se sumergen en un recipiente conteniendo el buffer de lisis (NaCl 2,5M, EDTA 0,1M, Tris HCL 10mM, Tritón X-100) durante 3 horas (figura 12).



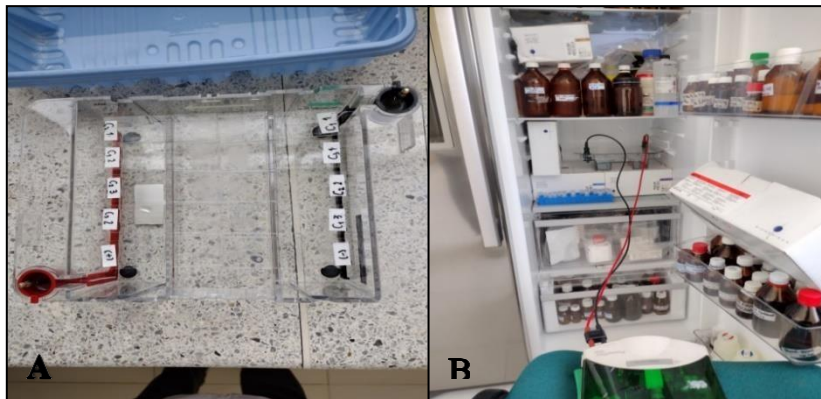
**Figura 12. Segunda capa de agarosa. A. Cubreobjetos en la segunda capa de agarosa. B. Segunda capa encima de la primera capa de agarosa. C. Portaobjetos en solución de lisis.**

#### **4.6 Desnaturalización y electroforesis**

Para el proceso de desnaturalización los portaobjetos se sumergieron durante 20 minutos en el buffer de electroforesis (Disolución tampón formado por Tris, borato y EDTA) a 4°C, el

tiempo de desnaturalización por lo general se mantiene en los distintos laboratorios y solo se modifica en evaluaciones específicas. (Vergara, 2010) También se tuvo en cuenta que el buffer recomendado por Singh et al. (1988) es EDTA 1mM e Hidróxido de Sodio 300 Mm pH 13 (Mudry y Carballo 2006, Liao et al. 2009, Zúñiga 2009). Transcurrido este tiempo, los portaobjetos fueron ordenados de forma horizontal paralelo a los electrodos, seguidamente se sumergen en buffer de electroforesis (TBE) (figura 14. A), posteriormente se realizó el corrido de electroforesis con las siguientes características: 15V, 300mA durante 40 minutos, teniendo en cuenta la electroforesis llevada a cabo en el ensayo cometa, es diferente a las convencionales, pues en este caso se necesita que el ADN migre solo una fracción de milímetros, lo que se consigue con la exposición de los portaobjetos a bajos voltajes por corto tiempo. (Mudry y Carballo, 2006; Liao et al. 2009 & Zúñiga, 2009).

La electroforesis se llevó a cabo en la nevera, ya que necesitábamos temperaturas de 4°C a 15°C (figura 13). Con la electroforesis conseguimos que los daños estructurales en la hebra de ADN generan pequeños fragmentos que migran desde el interior del núcleo al exterior; la cantidad de rompimientos en el ADN en las células se ve reflejado en la formación de cola de migración y este daño en el ADN es directamente proporcional a la longitud de la cola o la cantidad de fragmentos que se encuentren fuera del núcleo. (Anderson et al. 1994; Rojas et al., 1999; McKelvey & Valerie, 1998).



**Figura 13. Electroforesis. A. Portaobjetos en la cámara de electroforesis. B. Proceso de electroforesis**

#### **4.7 Neutralización**

Después de la electroforesis, las muestras fueron sumergidas en PBS 1X por 3 minutos, este paso se lleva a cabo para neutralizar los álcalis presentes en el o los geles de agarosa. (Vergara, 2010). Si se decide realizar preparados permanentes, se pasan las láminas sucesivamente por varios alcoholes, con lo que se logra la deshidratación de los geles. (Klaude et al., 1996).

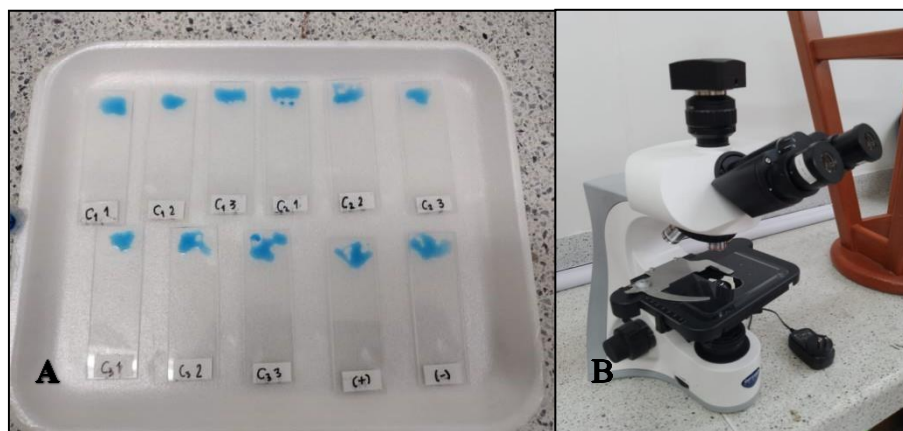
Teniendo esto en cuenta, los portaobjetos se fijaron en alcohol de 96% durante 3 minutos.



**Figura 14. Fijación en alcohol al 96%**

#### 4.8 Coloración y observación de los linfocitos

Para la observación de las células se realizó la coloración con redgel, la tinción o colorante utilizado es específico para ADN. Los colorantes más empleados son el Bromuro de Etidio, el Ioduro de Propidio y el 4,6-Diamino-2 fenil indol (DAPI). (Mudry & Carballo, 2006; Liao et al. 2009; Zúñiga, 2009). Para la investigación se utilizó redgel (Figura 15. A), ya que Echeverry et al, (2013) han comprobado que el uso de este colorante para la tinción de ácidos nucleicos (ADN) ha permitido visualizarlos de forma eficiente. Utilizando este colorante se disminuye la contaminación en los laboratorios de biología molecular por parte del bromuro de etidio. Posteriormente se llevó a observar en el microscopio b-510 series optika italy, con el objetivo 40X, este microscopio tiene una cámara que una vez conectada a un computador y con la ayuda del software optika pro view-digital camare se captura lo observado (Figura 15. B) y así posteriormente se pudo medir el índice de daño con la ayuda de software Comet Score el cual permitio observar los cometas, observar los cometas resultantes de los diferentes tratamientos.



**Figura 15. Coloración y observación de linfocitos. A. Coloración de los linfocitos. B. Microscopio b-510 series optika italy**

## 4.9 Visualización

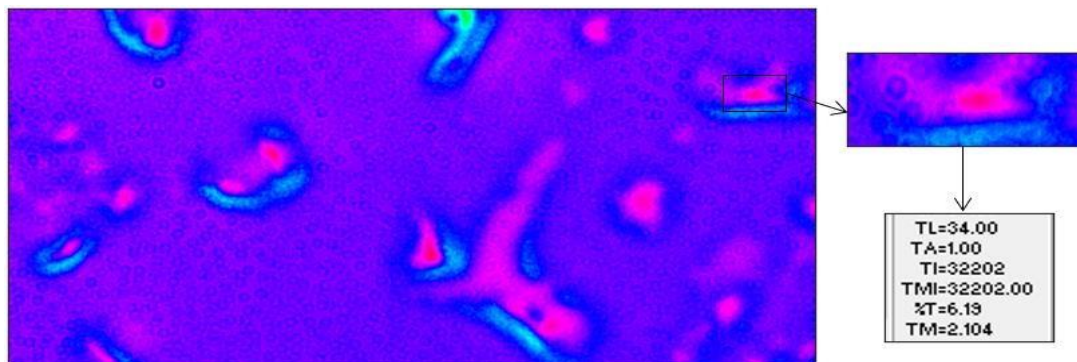
Para la visualización de los linfocitos se utilizó el software Comet Score el cual nos ayuda a analizar el daño midiendo la longitud de migración de ADN (TL), el % de ADN en la cola (%T), el área de la cola (TA) y el momento de la cola (TM), donde los datos que más se tomaron en cuenta en la investigación es TL y %T. Aunque hay un gran número de posibilidades para evaluar y medir la extensión del daño al ADN obtenida en el ensayo cometa y poca la literatura que ajuste esta prueba a un único sistema de valoración. (Vergara, 2013).

Por otro lado, Catillo (2012) en su investigación reporta la rotura de ADN en linfocitos humanos a través de los valores de %ADN de la cola (%T) y el momento de la cola (TM). También es sugerida la evaluación del daño por la relación entre el radio del núcleo y la extensión del cometa, lo cual ya es llevado a cabo por el uso de software especial (Machado, Lima, Alves & Rodríguez. 2009). Estos datos se tuvieron en cuenta para poder analizar 5 células por tratamiento y así determinar el daño por concentración. Como control positivo se utilizó peróxido de hidrogeno 100uM dejando como resultado una degradación mayor y así poder evaluar los demás tratamientos. La longitud de la cola mayor encontrada fue de 34px con un 6.18% de ADN en esta (Figura 16), teniendo en cuenta que la longitud de la cola es directamente proporcional al daño de la célula, con los datos obtenidos de las 5 células evaluadas se pudo determinar daño en todas las células. (Tabla 4).

La cantidad de rompimientos en el ADN en las células se ve reflejada en la formación de cola de migración y este daño en el ADN es directamente proporcional a la longitud de la cola o la cantidad de fragmentos que se encuentren fuera del núcleo (Anderson et al. 1994, Rojas et



al. 1999, McKelvey & Valerie, 1998). Una vez obtenidos estos datos, se tomó en cuenta la longitud de la cola para realizar un resumen estadístico en el software statgraphic, el cual nos indica que en el control positivo el promedio de longitud de cola fue de 21.8 px (píxeles), ya que va de 12px a 34px, esto nos indica daño en todas las células evaluadas. (Tabla 5).



**Figura 16. Control positivo: peróxido de hidrogeno; TL: Longitud de la cola, TA: área de la cola, %T: % de ADN en la cola y TM: momento de la cola**

**Tabla 4. Medidas de los linfocitos en el control positivo**

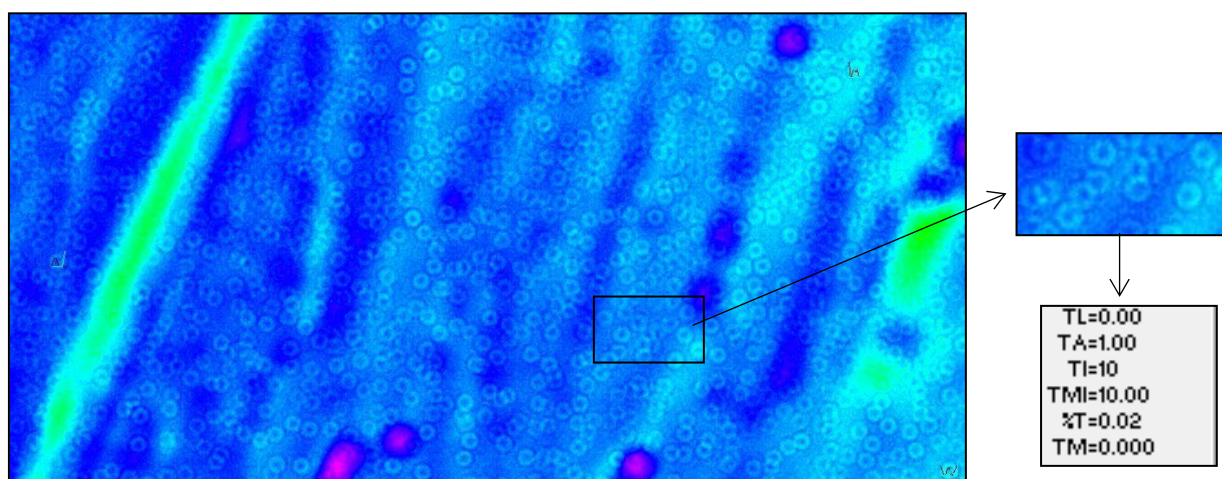
<b>CONTROL POSITIVO (+)</b>				
<b>%ADN de la cabeza(%H)</b>	<b>Longitud de la cola (TL) (PX)</b>	<b>Área de la cola (TA) (PX)</b>	<b>%ADN de la cola (%T)</b>	<b>Momento de la cola (TM)</b>
93.813115	34.000000	1.000000	6.186886	2.103541
94.508624	13.000000	1.000000	5.491376	0.713879
94.219685	25.000000	1.000000	5.780317	1.445079
96.826440	12.000000	1.000000	3.173561	0.380827
89.670068	25.000000	1.000000	10.329933	2.582483

**Tabla 5. Resumen estadístico de la longitud de cola en el control positivo**

<b>RESUMEN ESTADISTICO</b>	
Cantidad	5
Promedio/media	21,8
Desviación estándar	9,25743
Coefficiente de variación	42,4653%

Mínimo	12,0
Máximo	34,0

Para el control negativo se utilizó PBS (Buffer fosfato salino) y cómo podemos ver en la figura 17 no se registra daño, son linfocitos completos donde la longitud de la cola es cero, ver Tabla 6, lo cual significa que no hay degradación. Que de acuerdo con Catillos (2012) en su investigación reporto que las células expuestas al Buffer Fosfato (PBS) no presentaron ninguna migración, mantuvieron su forma esférica.



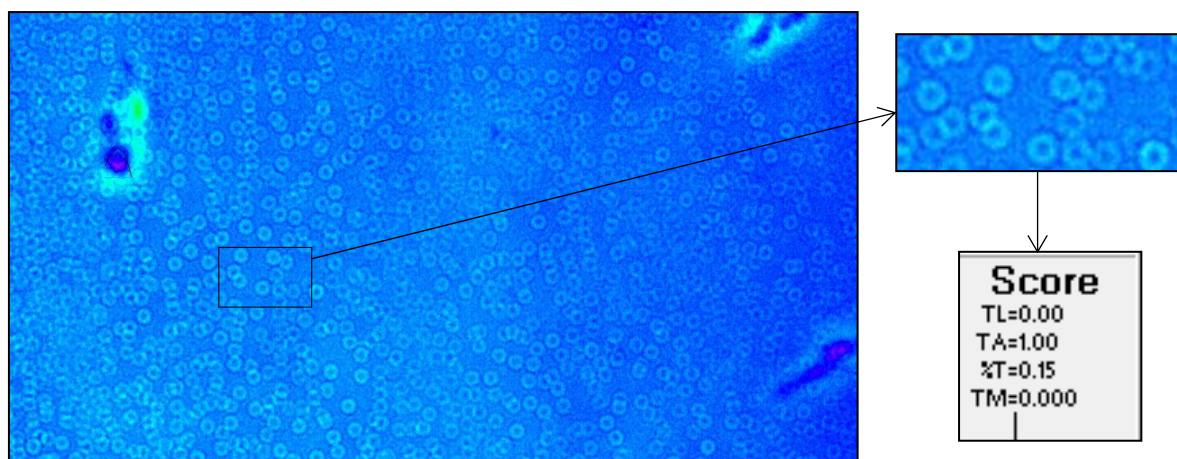
**Figura 17. Linfocitos completos. Control negativo: PBS; TL: Longitud de la cola, TA: área de la cola, %T: % de ADN en la cola y TM: momento de la cola**

**Tabla 6. Medidas de los linfocitos en el control negativo**

<b>CONTROL NEGATIVO (-)</b>				
<b>%ADN de la cabeza(%H)</b>	<b>Longitud de la cola (TL) (PX)</b>	<b>Area de la cola (TA) (PX)</b>	<b>%ADN de la cola (%T)</b>	<b>Momento de la cola (TM)</b>
99.550837	0.000000	1.000000	0.449161	0.000000
99.950582	0.000000	1.000000	0.049417	0.000000
99.850255	0.000000	1.000000	0.149745	0.000000
99.892384	0.000000	1.000000	0.107614	0.000000
99.822223	0.000000	1.000000	0.177775	0.000000

En el tratamiento con concentración 1.0% de aloína (C1) no se registró daño significativo en los linfocitos, se observaron células completas sin una degradación notable (Figura 18), donde se logró observar células esféricas y sin degradación del ADN, se logró medir con la longitud de la cola donde su valor fue de cero fue cero para la mayoría de células evaluadas, en la célula restante se pudo registrar una longitud de 5px pero tomando en cuenta el % de ADN en la cola el cual fue de 0.16% por lo que se puede inferir que el daño no se fue significativo. (Ver Tabla 7).

Con los datos obtenidos se realizó un resumen estadístico donde el promedio de longitud de la cola fue de 1.0px, demostrando así que no hay una degradación completa del ADN.



**Figura 18.** Tratamiento con concentración 1.0% de aloína (C1); TL: Longitud de la cola, TA: área de la cola, %T: % de ADN en la cola y TM: momento de la cola

**Tabla 7. Medidas de los linfocitos en el tratamiento**

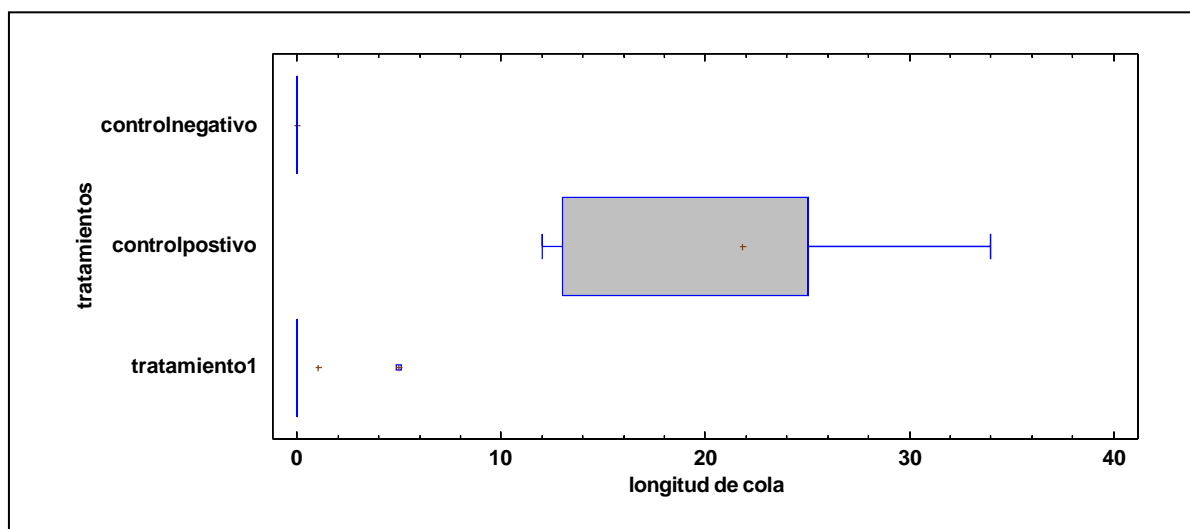
TRATAMIENTO C1				
%ADN de la cabeza(%H)	Longitud de la cola (TL) (PX)	Area de la cola (TA) (PX)	%ADN de la cola (%T)	Momento de la cola (TM)
99.753731	0.000000	1.000000	0.246266	0.000000
99.574012	0.000000	1.000000	0.425989	0.000000
99.603963	0.000000	1.000000	0.396040	0.000000
99.860644	5.000000	1.000000	0.159358	0.006968
99.681455	0.000000	1.000000	0.318546	0.000000

**Tabla 8. Resumen estadístico de la longitud de la cola en tratamiento C1 (1,0%)**

RESUMEN ESTADISTICO	
Cantidad	5
Promedio/media	1,0
Desviación estándar	2,23607
Coficiente de variación	223,607%
Mínimo	0
Máximo	5,0

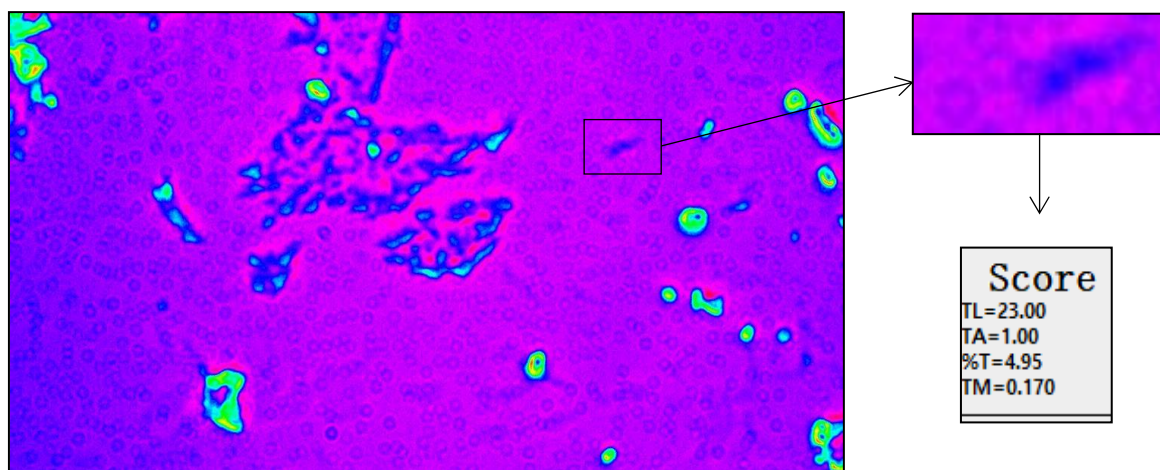
Posteriormente en el software statgraphics se realizó un análisis de varianza respecto al control positivo y el tratamiento C1 para así poder comparar los resultados y determinar la diferencia significativa con el control, esto se determinó teniendo en cuenta el valor-P. Molina (2017) señala que el valor de p es la probabilidad de obtener, por azar, una diferencia tan grande o mayor de la observada, cumpliéndose que no haya diferencia real en la población de la que proceden las muestras. Así, por convenio suele establecerse que si este valor de probabilidad es menor del 5% (0,05) es lo suficientemente improbable que se deba al azar como para rechazar con una seguridad razonable la Hipótesis nula y afirmar que la diferencia es real. Si es mayor del 5%, no tendremos la confianza necesaria como para poder negar que la diferencia observada sea obra del azar.

En el análisis se obtuvo como resultado un valor de P-valor= 0,0012, según el software statgraphics dado que el valor P es inferior a 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la longitud de cola media de un nivel de tratamientos a otro al nivel de confianza del 95,0 %. Esto quiere decir que la media de la longitud de la cola del control negativo tiene una diferencia significativa con la del tratamiento C1 (1,0%) , también fue comparado con el control negativo donde el valor de P-valor fue de 0,3466, dado que el valor P es mayor o igual a 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la longitud media de cola de un nivel de tratamientos a otro al 95,0% de nivel de confianza, esto quiere decir que entre el tratamiento C1 (1,0%) y el control negativo no hay una diferencia significativa. Estas comparaciones fueron reflejadas en un diagrama de caja, donde podemos ver gráficamente las diferencias. (Figura 19) Con esto podemos concluir que en el tratamiento C1 no hubo una degradación significativa del ADN.



**Figura 19. Comparación de las medidas de longitud de cola del tratamiento C1 con el control positivo y negativo**

En el tratamiento con concentración 1.5% de aloína (C2) se registraron 5 linfocitos en diferentes posiciones de cada placa y se pudo evidenciar algunos daños, estos son medidos por la longitud de la cola y el % de ADN en la cola, donde la mayor longitud fue de 23px con 4.95% de ADN en la cola, esto nos muestra un daño mayor que el de C1. (Tabla 9). En este cometa ya se puede ver claramente la degradación de la célula y así formando la cola del cometa. (Figura 20).



**Figura 20.** Tratamiento con concentración 1.5% de aloína (C2); TL: Longitud de la cola, TA: área de la cola, %T: % de ADN en la cola y TM: momento de la cola

**Tabla 9.** Medidas de los linfocitos en el tratamiento C2 (1.5%)

TRATAMIENTO C2				
%ADN de la cabeza(%H)	Longitud de la cola (TL) (PX)	Area de la cola (TA) (PX)	%ADN de la cola (%T)	Momento de la cola (TM)
98.124295	7.000000	1.000000	1.875706	0.131299
97.792143	8.000000	1.000000	2.207856	0.176629
95.042443	23.000000	1.000000	4.957558	0.1704721
97.608590	11.000000	1.000000	2.391412	0.263055
95.860827	12.000000	1.000000	4.139170	0.496700

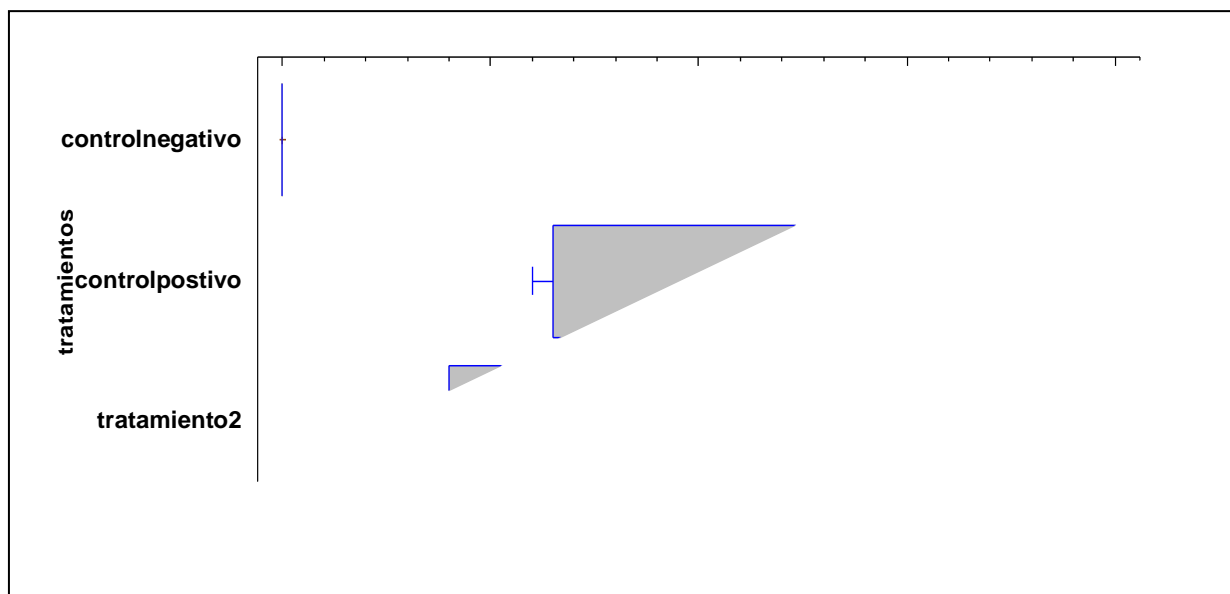
Posteriormente con los datos obtenidos en el software Comet Score para la medición de las células, se realizó un resumen estadístico en el software statgraphics donde el promedio/media de

la longitud de cola del tratamiento C2 fue de 12,2px (Tabla 10), en comparación con el tratamiento C1 se obtuvo una diferencia significativa, dando como resultado el incremento del daño directamente proporcional al incremento de la concentración de la aloína.

**Tabla 10. Resumen estadístico de la longitud de la cola en tratamiento C2 (1,5%)**

RESUMEN ESTADISTICO	
Cantidad	5
Promedio/media	12,2
Desviación estándar	6,37966
Coefficiente de variación	52,2923%
Mínimo	7,0
Máximo	23,0

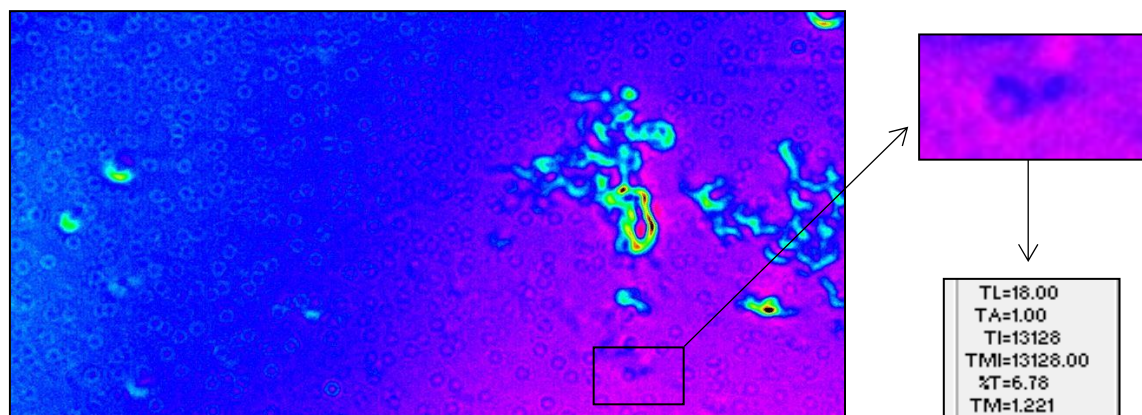
Seguidamente el tratamiento C2 fue comparado con el control positivo el cual dio un P-valor de 0,0926 Dado que el valor P es mayor o igual a 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la longitud de cola y el tratamientos al 95,0% de nivel de confianza. Esto quiere decir que el tratamiento C2 no muestra una gran diferencia del control positivo, en este tratamiento el daño es mayor. También fue comparado con el control negativo el cual dio un P-valor de 0,0027, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de longitud de la cola y el tratamiento evaluado. Estas diferencias las podemos ver en un diagrama de caja (Figura 21) donde nos da como resultado una diferencia altamente significativa contra el control negativo y ante el control positivo no se determina como una diferencia significativa. Con esto podemos concluir que la migración de ADN de las células evaluadas contra el tratamiento C2 es mayor que él las células evaluadas contra el tratamiento C1.



**Figura 21. Comparación de las medidas de longitud de cola del tratamiento C2 con el control positivo y negativo**

Y por último, el tratamiento con mayor concentración (C3) de 2.0% de aloína se realizó igual que los anteriores tratamientos, donde se evaluaron 5 linfocitos de las diferentes placas donde el mayor daño fue de 25px como longitud de la cola con 3.16% de ADN en la cola, esto nos muestra un mayor daño que en los otros tratamientos en cuanto a longitud de cola. (tabla 11). En la figura 22 se puede observar una célula con una migración del ADN notable con 18px de longitud de la cola y con 6.78% de ADN en la cola.





**Figura 22.** Tratamiento con concentración 2.0% de aloína (C3); TL: Longitud de la cola, TA: área de la cola, %T: % de ADN en la cola y TM: momento de la cola

**Tabla 11.** Medidas de los linfocitos en el tratamiento C3 (2.0%)

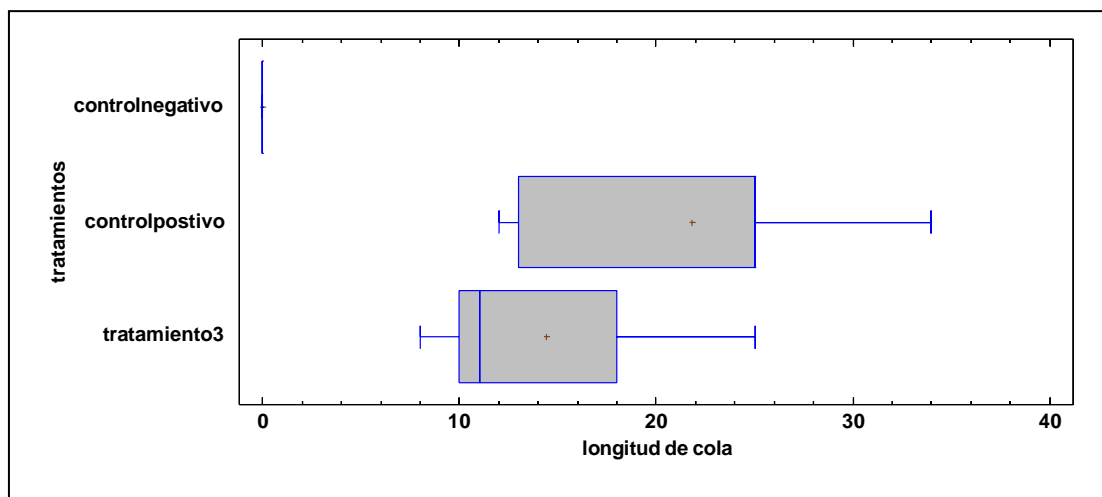
<b>TRATAMIENTO C3</b>				
<b>%ADN de la cabeza(%H)</b>	Longitud de la cola (TL) (PX)	Area de la cola (TA) (PX)	%ADN de la cola (%T)	Momento de la cola (TM)
96.599686	8.000000	1.000000	3.400315	0.272025
97.501922	10.000000	1.000000	2.498079	0.249808
94.170123	11.000000	1.000000	5.829874	0.641286
93.219078	18.000000	1.000000	6.780922	1.220566
96.835732	25.000000	1.000000	3.164269	0.791067

Posteriormente con los datos de la longitud de cola se realizó con resumen estadístico donde se obtuvo una media de 14,4px (tabla 12), el cual fue mayor que la media de los tratamientos C1 y C2.

**Tabla 12. Resumen estadístico de la longitud de la cola en tratamiento C3 (2,0%)**

RESUMEN ESTADISTICO	
Cantidad	5
Promedio/media	14,4
Desviación estándar	7,0214
Coefficiente de variación	48,7597%
Mínimo	8,0
Máximo	25,0

Se realizó la comparación de los datos de longitud de cola con el control positivo el cual dio una P-valor de 0,1922, dado que el valor P es mayor o igual a 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de longitud de cola y el tratamiento al 95,0% de nivel de confianza. Esto quiere decir que el daño de las células evaluadas contra el tratamiento C3 se acerca al daño reportado en el control positivo, afirmando que en el tratamiento C3 hay células con mayor daño que en los demás tratamientos. Por otro lado al realizar la comparación de los datos de longitud de cola con el control negativo la diferencia fue estadísticamente significativa ya que el valor fue de 0,0018, dado que el valor es menor a 0,05, esto nos indica que hay una diferencia estadísticamente significativo entre la media de longitud de la cola y el tratamiento evaluado. Estas comparaciones se graficaron en un diagrama de caja. (Figura 23) donde se pudo ver que los valores de la longitud de cola se interponen con los valores del control positivo, esto nos demuestra lo dicho anteriormente.



**Figura 23. Comparación de las medidas de longitud de cola del tratamiento C3 con el control positivo y negativo**

#### 4.10 Análisis estadístico

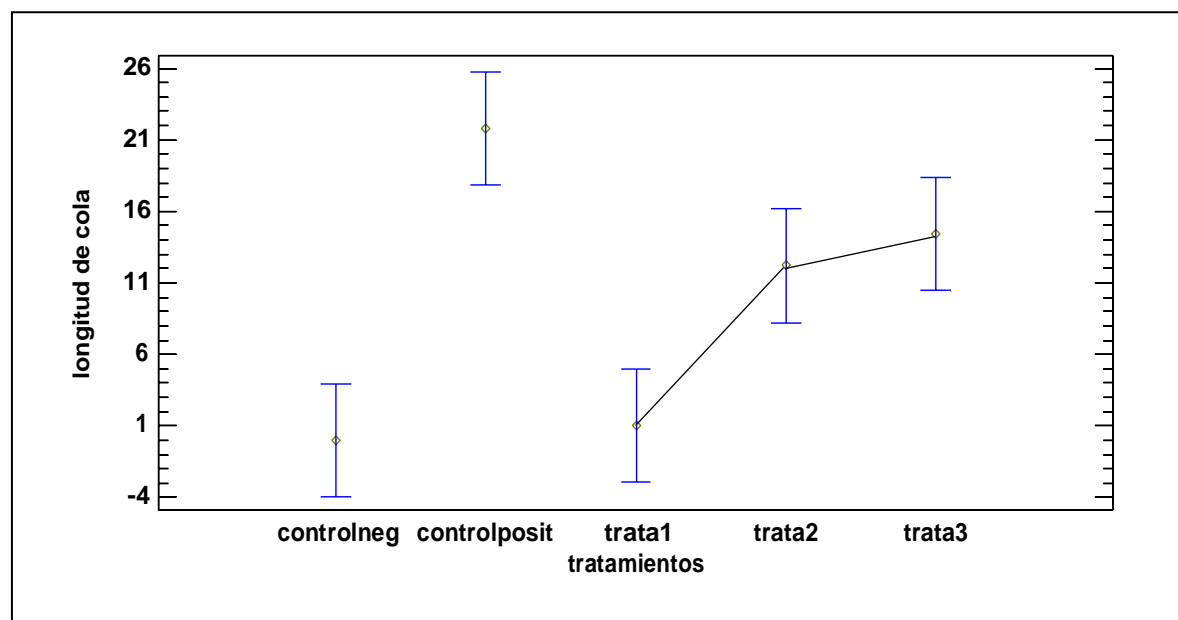
Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con el programa statgraphics, donde se utilizó un factor de los tratamientos que es la longitud de la cola, ya que está es una de las tres medidas cuantitativas más empleadas en estudios del ensayo cometa según lo planteado por Faust et al. (2004), siendo esta una medida directamente proporcional al daño de la célula.

Se examinó la media de la longitud de cola de cada tratamiento y fueron representados en una tabla 13, está también muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos que se muestran actualmente se basan en el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, todo esto realizado por el programa statgraphics. Los intervalos están contruidos de tal manera que si dos medias son iguales, sus intervalos se superpondrán el 95,0% de las veces, ya que estos intervalos se utilizan para determinar qué medias son significativamente diferentes de otras. En la figura 24 podemos ver como el intervalo del tratamiento C2 Y C3 se interponen ya

que sus medias son aproximadas, también se observó que el intervalo del tratamiento C3 y el de control positivo se alcanzan a interponer, demostrando que el tratamiento C2 y C3 son los únicos donde se presentan daño significativo de la célula, ya que estos tratamientos presentan una mayor concentración de aloína podemos decir que el daño de la célula es directamente proporcional a la concentración de la aloína.

**Tabla 13. Media de la longitud de la cola de cada tratamiento con intervalos de cada media**

Tratamientos	Cantidad	Media	Límite inferior	Límite superior
Control negativo	5	0	-3,96553	3,96553
Control positivo	5	21,8	17,8345	25,7655
Trata1	5	1,0	-2,96553	4,96553
Trata2	5	12,2	8,23447	16,1655
Trata3	5	14,4	10,4345	18,3655
Total	25	9,88		



**Figura 24. Intervalo de la media de la longitud de cola de cada tratamiento**

Posterior a esto se realizó un análisis de varianza donde nos ayuda a determinar si las diferencias entre las medias de cada tratamiento son estadísticamente significativas, con la ayuda de este análisis determinaremos si la hipótesis nula se rechaza o se acepta (Tabla 14).

**Tabla 14. Longitud de la cola por Tratamiento. Análisis de varianza**

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F-RATIO	P-VALOR
Entre grupos	1721,84	4	430,46	11,91	0,0000
Dentro de grupos	722,8	20	36,14		
Total (Corr.)	2444,64	24			

Una  $p < 0,05$  significa que la hipótesis nula es falsa y una  $p > 0,05$  que la hipótesis nula es verdadera. (Arias, 2017). La hipótesis nula determina que la aloína como bioinsecticida no tendrá alguna incidencia sobre los linfocitos humanos, puesto que el valor p es 0,0000, la hipótesis nula se rechaza y así concluimos que la longitud de la cola tiene medias diferentes en los tratamientos evaluados. Esto quiere decir que la longitud de la cola es diferente dependiendo del tratamiento, siendo así el daño causado en la célula depende de la concentración de aloína.

La evidencia de un riesgo genotóxico relacionado a la exposición, resulta del intensivo uso de plaguicidas y poco uso de elementos de protección; una relación de dosis-efecto puede ser una hipótesis, lo que revela la necesidad de implementar programas para educar a los agricultores en la reducción del uso de plaguicidas tóxicos e implementar las medidas de protección. (Aristizabal, 2009). Teniendo en cuenta que se obtuvieron resultados que demuestran que el extracto de aloína a mayor concentración causa daño en los linfocitos humanos, los agricultores

expuestos a un bioinsecticida que contenga aloína deben usar correctamente las medidas de protección.

## 5. Conclusiones

La licuefacción es una técnica eficiente para la recuperación de Aloína presente en las hojas de Aloe Vera, dando como resultado el rendimiento de 92%, esto quiere decir que se pudo obtener la mayor parte de aloína de la hoja.

Se logró determinar la concentración del extracto de aloína obtenido por medio de licuefacción de las hojas de Aloe Vera analizado mediante cromatografía líquida de ultra-alta resolución con detector de masas orbitrap el cual detecto una concentración alta de aloína en el extracto de Aloe vera.

Tras el análisis, podemos deducir que la degradación del ADN en linfocitos humanos es directamente proporcional a la concentración de extracto de aloína, conforme a más concentración de aloína contenga el tratamiento mayor daño causara en las células. Dando como resultado mayor daño en las concentración 1,5% y 2,0%, demostrado a través de los parámetros de longitud de cola (TL).

Podemos concluir que el extracto de aloína en mayores concentraciones es un agente genotoxico, ya que se observaron daños al materia genético

## **6. Recomendaciones**

En necesario seguir investigaciones de genotoxicidad de otros componentes con potencial de bioinsecticida y así los trabajadores expuestos no presenten daños en la salud.

Se hace una invitación a la Universidad en seguir investigando sobre la genotoxicidad basados en el uso de la metodología de ensayo cometa, ya que es un método con resultados favorables.



### Referencias bibliográficas

- Alves, D.; Pérez, L.; Estepa, A. & Micol, V. (2004). Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin. *Biochem. Pharmacol.* 66, 549-561.
- Asamenew, G.; Bisrat, D.; Mazumder, A. & Asres, K. (2011). In vitro antimicrobial and antioxidant activities of anthrone and chromone from the latex of *Aloe harlana* Reynolds. *Phytother*, 25, 1756-1760.
- Cameron, M. (2013). *Agentes físicos en rehabilitación, de la investigación a la práctica*. 4ta Edición. El Sevier. España. 23-43, 437.
- Castillo, R (2012). *Cuantificación del daño de ADN por el test del cometa en linfocitos humanos expuestos al extracto etanólico de leucaena trichodes*. Perú: Universidad Nacional de Trujillo
- Castro, L.; García, F. & Serquén, L. (2019). Ensayo cometa. *Exp Med*, 5(3).
- Cedillo Jiménez, C.; Gastélum Barrios y Soto-Zarazúa. (2015). Desarrollo tecnológico de remoción de aloína en sistema continuo de adsorción en columna. *Memorias "3er. Congreso Internacional de Ingeniería y Tecnología"*, Universidad del SABES, San Miguel de Allende, Gto., México, 27-28 de Noviembre, 2015.
- Dagne, E.; Bisrat, D.; Viljoen, A.;Wyk, B. (2000). Chemistry of Aloe Species. *Current Organic Chemistry*. 4. 1055-1078.
- Devine, Gregor J., Eza, Dominique, Ogusuku, Elena, & Furlong, Michael J. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 25(1), 74-100.

- Domínguez-Fernández, R.N. et al., 2012. El gel de aloe vera: Estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), pp.23–43.
- Echeverry, P. et al, (2013). Uso alternativo del colorante Gelred en la tinción de ácidos nucleicos. *Archivos de Medicina*, 13 (2).
- Eshun Kojo y He Qian (2010). Aloe vera: a valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 44
- Favela, A.; Cortez, M.; Ríos, E.; Esqueda, M.; Cadillo, M. & Fuentes, J. (2020). Cuantificación de aloína en mucilago de Aloe vera tratado con ultrasonido de potencia. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 5, 821-824.
- Ferraro.(2009). Revisión de la aloe vera (*barbadensis miller*) en la dermatología actual. *Argent Dermatol*, 90, 218-223.
- Gómez, M. J., & Cáceres G., J. L. (2010). Toxicidad por insecticidas organofosforados en fumigadores de Campaña contra el Dengue, estado Aragua, Venezuela, año 2008. *Bol Mal Salud Amb*, 50(1). Obtenido de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1690-46482010000100012#:~:text=La%20toxicidad%20de%20los%20trabajadores,le%20compara%20con%20trabajos%20similares](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482010000100012#:~:text=La%20toxicidad%20de%20los%20trabajadores,le%20compara%20con%20trabajos%20similares)
- Guevara y col. Electroforesis unicelular (ensayo cometa) como bioindicador de antigenotoxicidad inducida por *amphipterygium adstringens*. 2° Congreso Nacional de Química Médica. Obtenido de <https://docplayer.es/17559404-Electroforesis-unicelular-ensayo-cometa-como-bioindicador-de-antigenotoxicidad-inducida-por-amphipterygium-adstringens.html>

- Hazrati, S; Tahmasebi, Z; Babaei, A. (2012). Enhancing yield and aloin concentration of Aloe vera plants by simultaneous application of N and benzyladenine. *Medicinal Plants Research*, 6 (10):1834-1841.
- Henwinol, S.; Pasavant, A.; Shotipruk, A. (2006). A ultrasonic-assisted extraction on anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13, 543-548
- Iannacone, J. & Lamas, G. (2002). Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, (65), 92 - 101
- Isman, M. (2006). Botanical Insecticides, Deterrents and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World», *Annu. Entomol.* 51, 45-66.
- Jiménez, M. & Martínez, V. (2000). Validación de la determinación de acetilcolinesterasa eritrocítica humana a 340 nm. *Biomed*, 11, 161-168
- Klaude, M, Eriksson, S.; Nygren, J.; Ahnstrom, G. (1996). The comet assay. *Mutat Res*, 363: 89-96
- Liao, W.; McNutt, M.; Zhu, W. (2009). The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 48, 46–53.
- Lozano Urbina, L.; Nova, C.; Mejía Uribe, L. (2011). Estabilización del gel de Aloe Barbadensis Miller y disminución de su concentración por adsorción en columna con carbón activado. *ION*, 24(1), 61-67.
- Machado, A.; Lima, P.; Alves, R.; Rodríguez, R. (2009). Evaluation of Genotoxic Effects of Xenobiotics in Fishes Using Comet Assay—A Review. *Reviews in Fisheries Science*, 17(2), 170–173.

- Martinez, M. (2011). *Caracterización mutagénica, genotóxica e identificación de compuestos orgánicos en el material particulado fracción respirable pm2.5 en Pamplona-Norte de Santander Colombia*. Pamplona: Universidad de Pamplona.
- Martínez, R.; Leyes, E.; Castillo, R.; Fernández, J.; Barrio, G. & Sanabia, María. (2002). Obtención y caracterización preliminar de un extracto de Aloe vera L. con actividad antiviral. *Cubana de Plantas Medicinales*, 7, 32-38.
- Matos, Á. (2011). Producción de aloína en callos y hojas de brotes de zábila (Aloe vera L.) regenerados in vitro. *Bioagro*, 23(2), 79-86.
- Melo A & Vallejo R. (1990). Residuos de insecticidas organoclonados en leche humana y de vaca en Colombia. *Bof of sanit Param* 108(3)
- Molero, T.; Ettiene, G. & Viloría, M. (2016). Determinación de aloína en poblaciones de Aloe vera L. (=Aloe barbadensis M.) del occidente de Venezuela. *Multiciencias*, 16(2), 143-152
- Molina Arias, M. (2017). ¿Qué significa realmente el valor de p?. *Pediatría Atención Primaria*, 19(76), 377-381. Recuperado en 05 de diciembre de 2022, de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1139-76322017000500014&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322017000500014&lng=es&tlng=es)
- Morales, J. (2018). *Determinación del poder coagulante de la sábila para la remoción de turbidez en el proceso de tratamiento de agua para consumo humano – Oxapampa*. Universidad nacional Daniel Alcides Carrión.
- Navarro, D. (2013). *Efecto de los tratamientos de gel de aloe, aplicados en pre- o post-recolección sobre la calidad de frutos de hueso y uva de mesa*. Universidad Miguel Hernández de Elche Escuela Politécnica Superior De Orihuela.

- Navarro-Yepes, Bonilla-Iriarte y I. Trujillo-Correa (2006). Evaluación del potencial enotóxico de fitoproductos autóctonos activos contra leishmania y tripanosoma mediante el test de Ames y el ensayo cometa. *Actual Biol*, 28 (85), 139-153.
- OMS (1993). *Plaguicidas y salud en las Américas*. Washington: División Salud y Ambiente.
- Parada, I. (2021). *Conceptos en química: el porcentaje del rendimiento o rendimiento porcentual*.
- Parra, G., García, C., Cotes, J. (2007). Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. *CES Med*; 21(1), 47-54.
- Paullier, J. & Folch, C. (2012). Primer insecticida biológico formulado en Uruguay. *INIA*, (30)
- Pérez López, E. (2012) Plaguicidas botánicos: una alternativa a tener en cuenta. *Fitosanidad*, 16(1), 51-59. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal La Habana, Cuba.
- Pérez, Y., Jiménez Ferrer, E., Zamilpa, A., Hernández Valencia, M., Alarcón Aguilar F.J., Tortoriello, J. and Román Ramos, R (2007). Effect of a polyphenol-rich extract from Aloe vera gel on experimentally induced insulin resistance in mice. *The American Journal of Chinese Medicine*. 35:1037-1042.
- Pritam, A. y Kale, P. G. (2007). Alteration in the antioxidant potential of Aloe vera due to fungal infection. *Plant Pathology Journal* 6, 169-173.
- Quijano Monica, Quijano Alfonso y Melendez Ivan (2017). Evaluación genotóxica del aire de Pamplona-Colombia por el ensayo cometa. *Colombiana de Tecnologías de Avanzada*. 2(30).
- Restrepo, J., & Aristizábal, I. (2010). Conservación de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch cv. Camarosa) mediante la aplicación de recubrimientos comestibles de gel mucilaginoso de penca

sábila (*Aloe barbadensis miller*) y cera de Carnaúba. *Vitae*, 17(3), 252-263. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v17n3/v17n3a03.pdf>

Reynolds, T. & Dweck, A. (1999). Aloe vera Leaf Gel: A Review Update. *Ethnopharmacology*, 68, 3-37.

Rivero Martínez, R.; Rodríguez Leyes, E.; Menéndez Castillo, R.; Fernández Romero, J.; Barrio Alonso, G.; González Sanabia, M. (2002). Obtención y caracterización preliminar de un extracto de Aloe vera L. con actividad antiviral. *Cubana de plantas medicinales* 7(1), 32-38<sup>a</sup>

Rocha-Estrada, J. y García-Carreño, F. (2008). Insecticidas clásicos y biopesticidas modernos: avances en el entendimiento de su mecanismo de acción. *BioTecnología*, 12(1).

Rodríguez-Rey, A., Noris-García, E. & Fundora Torres, M. (2016). Principios y relevancia del ensayo cometa. *Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(2), 184-194.

Salas, M. (2014). Evaluación de la genotoxicidad utilizando el ensayo cometa en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de Dimetil Sulfoxido (DMSO). Lima: Universidad Ricardo Palma.

Sánchez Machado, D.; López-Cervantes, Sendón, R.; Sanches-Silva, A. (2017). Aloe vera: Ancient knowledge with new frontiers. *Trends in Food Science & Technology*, 61, 94-102.

Sepúlveda Jiménez, F.; Porta Ducoing, H.; Rocha Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Mexicana de Fitopatología*, 21, 355-363.

Shaposhnikov, S, E. Frengen, A. Collins (2009). Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization- a review. *Mutagenesis*, 24: 383-389

- Silva, G., Lagunes, A., Rodríguez, C., Rodríguez, D. (2002). Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*,(66),4 - 12.
- Soler, W.; Velásquez, N.; Soler, J. (2008). Baja genotoxicidad de extracto orgánico de agua de mar de Coveñas (Sucre, Colombia). *Vitae*, 15(1),96- 102
- Sotil, G.; Alvis, R.; Francia, J. & Shiga, B. (2007). Aplicación de dos biomarcadores para el análisis de lesiones en el DNA de bivalvos marinos. *Peru Biol*, 13(3),249–253.
- Tandeo, J; Sanchez Brunete, C; Albero, B; Garcia Valcárcel, A (2010). Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Review Journal Chromatography A*, 1217:2415-2440
- Tian, B. and Hua, Y. (2005). Concentration-dependence of prooxidant and antioxidant effects of aloin and aloe-emodin on DNA. *Food Chemistry*, 91, 413-418.
- Urbina, L. et al., 2011. Estabilización del gel de Aloe Barbadensis Miller y disminución de su concentración por adsorción en columna con carbón activado. *ION*, 24, 61–67.
- Valverde, D.; Navarro, S.; Castillo, H.; Díaz-Mula, F.; Guillén, D.; Martínez-Romero, P.; Zapata. (s.f.). Tratamientos con luz ultravioleta estimulan la producción de aloína en las hojas de Aloe vera. Dept. Tecnología Agroalimetaria. Universidad Miguel Hernández. *Actas de horticultura*, 60
- Vega, A., Ampuero, N., Díaz, L. & Lemus, R. (2010). El Aloe Vera (Aloe barbadensis Miller) Como Componente de Alimentos Funcionales. *Chilena de Nutrición*, 32(3).
- Vergara, A. (2010). *Estandarización del ensayo del cometa alcalino en células de sangre periférica*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.

Zúñiga L. 2009. Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana. Universidad Autónoma de Barcelona.