

EFFECTO GENOTÓXICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO Y ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Satureja brevicalyx* Epling "Wayra Muña" EN MODELO ANIMAL, AYACUCHO 2017

Edwin C. Enciso Roca, Enrique J. Aguilar Felices, Pablo W. Común Ventura

Unidad de Investigación e Innovación de Ciencias de la Salud

E-mail: encisoqf@hotmail.com

RESUMEN

Satureja brevicalyx es una planta medicinal aromática con propiedades antiespasmódica, analgésica, digestiva y antioxidante, por lo que caracterizar su potencial tóxico es de gran importancia para avalar su empleo como agente terapéutico. El objetivo planteado fue evaluar el efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico y del aceite esencial extraídos de las hojas en ratones. La planta fue recolectada en el Centro Poblado de Quicato del distrito de Acocro, departamento de Ayacucho, ubicado a 3100 msnm. El ensayo de toxicidad aguda oral se llevó a cabo en ratones mediante el método de dosis límite a 2000 mg/kg de peso y el efecto genotóxico mediante la inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón, según el test N° 474 de la OECD. El ensayo de toxicidad aguda no mostró signos tóxicos ni causó la muerte de los animales ni alteración en el peso corporal clasificándose en la categoría 5 para ubicarse en el rango de toxicidad de una $DL_{50} > 2000$ mg/kg de peso. En los estudios de genotoxicidad no hubo variación estadística significativa en comparación con el control negativo del porcentaje de micronúcleos en sangre como en médula ósea. Se concluye que el extracto hidroalcohólico y aceite esencial de *Satureja brevicalyx* "wayra muña" no presentan efecto genotóxico por ensayo de micronúcleos en ratones.

Palabras clave: *Satureja brevicalyx*, toxicidad aguda, genotoxicidad, micronúcleos.

GENOTOXIC EFFECT OF THE HYDROALCOHOLIC EXTRACT AND ESSENTIAL OIL OF THE LEAVES OF *Satureja brevicalyx* Epling "Wayra Muña" IN ANIMAL MODEL, AYACUCHO 2017

ABSTRACT

Satureja brevicalyx is an aromatic medicinal plant with antispasmodic, analgesic, digestive and antioxidant properties, so characterizing its toxic potential is of great importance to guarantee its use as a therapeutic agent. The objective was to evaluate the genotoxic effect of hydroalcoholic extract and essential oil extracted from leaves in mice. The plant was collected in the Quicato Town Center of the Acocro district, department of Ayacucho, located at 3100 meters above sea level. The oral acute toxicity test was carried out in mice using the limit dose method at 2000 mg / kg of weight and the genotoxic effect by the induction of micronuclei in mouse bone marrow, according to the OECD Test No. 474. The acute toxicity test showed no toxic signs or caused the death of animals or alteration in body weight, being classified in category 5 to be in the toxicity range of an $LD_{50} > 2000$ mg/kg of weight. In the genotoxicity studies there was no significant statistical variation compared to the negative control of the percentage of micronuclei in blood as in bone marrow. It concluded that the hydroalcoholic extract and essential oil of *Satureja brevicalyx* "wayra muña" have no genotoxic effect by micronucleus test in mice.

Keywords: *Satureja brevicalyx*, acute toxicity, genotoxicity, micronuclei.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales constituyen la primera fuente de tratamiento en diversas regiones de nuestro país y una alternativa accesible a la población, sin embargo, la carencia de estudios de toxicidad y genotoxicidad constituyen un peligro para tratamientos prolongados. Entre los efectos genotóxicos se puede señalar las mutaciones genéticas y las aberraciones cromosómicas, las cuales pueden producir procesos cancerosos y alteraciones genéticas a la descendencia (Preston y Hoffman, 2006).

Según informaciones etnobotánicas y etnofarmacológicas *Satureja brevicalyx* es usada para resolver problemas gastrointestinales y para la corrección de desórdenes menstruales. Es digestivo, carminativo, contra la gastritis, flatulencia y antiespasmódica. También es usado como analgésico soasando las hojas en caso de dolores musculares y tortícolis (Carhuapoma, 2002; Soto, 1999 y Diez, 2002).

Los resultados publicados en la revista Journal of Etnofarmacology han mostrado la existencia de una amplia diversidad de ensayos sobre genotoxicidad del extracto crudo (material de la planta sin tratar) de las plantas. Estos indican un elevado porcentaje de resultados positivos para la genotoxicidad. Estos investigadores enfatizan la importancia de incluir ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*. Además consideran importante emplear en los ensayos de evaluación de estas plantas tanto especies bacterianas como células de mamíferos. De esta manera se podrá comprobar la existencia o ausencia de daños en el ADN (Sponchiado *et al.*, 2016).

El ensayo de MN es una alternativa al test de aberraciones cromosómicas convencional, en el que se analizan las alteraciones presentes en metafases mitóticas y permite detectar aberraciones cromosómicas que responden a alteraciones de tipo estructural (efecto clastogénico) o alteraciones numéricas (efecto aneugénico) del agente en estudio. Para llevar a cabo una adecuada evaluación genotóxica es necesario emplear un ensayo *in vivo* con el

objetivo de que propiedades metabólicas y toxicocinéticas estuvieran en condiciones semejantes al hombre, para esto se seleccionó el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón, prueba validada internacionalmente que detecta daño cromosomal (Sponchiado *et al.*, 2016).

En las últimas décadas, la integridad genética de la población humana se ha visto comprometida por la gran actividad industrial, que provoca la exposición a productos químicos, plantas medicinales y agentes genotóxicos. Además, existen otros factores capaces de influir en la integridad cromosómica tales como el estilo de vida, los cambios climáticos (debido al progresivo debilitamiento de la capa de ozono), los tratamientos médicos, algunos polimorfismos genéticos, etc. Es importante, por todo ello, determinar qué se conoce como un nivel "aceptable" de daño genético en una población concreta, realizar ensayos de genotoxicidad de manera rutinaria y monitorizar aquellos individuos que, por su ocupación laboral o estilo de vida, se encuentran más expuestos o con mayor riesgo de sufrir alteraciones capaces de modificar su estabilidad genética (Fenech, 1993).

Por este motivo se ha evaluado el efecto genotóxico del extracto hidroalcohólico y aceite esencial de las hojas de *Satureja brevicalyx* Epling "wayra muña" en ratones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ubicación

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Salud.

Población

Hojas de la planta *Satureja brevicalyx* Epling "wayra muña", que fueron recolectadas en el centro poblado de San Pedro Quicato del distrito de Acocro, departamento de Ayacucho, ubicado a 3100 msnm.

Muestra

Cinco kilogramo de hojas de *Satureja brevicalyx* Epling "wayra muña", muestreadas por conveniencia en horas de la mañana, se seleccionaron las hojas que no estaban dañadas ni maltratadas. Una vez recolectados fueron limpiados y almacenados en bolsa de papel para su traslado al laboratorio de Farmacia, donde se procedió a su secado bajo sombra por siete días.

Métodos para la recolección de datos

Obtención del extracto hidroalcohólico

500 g de hojas secas trituradas fueron macerados con 3 litros de alcohol al 80% por siete días con agitación constante para su distribución homogénea de la muestra (Aguilar, 2007).

Concentración

El extracto hidroalcohólico fue concentrado en baño maría a 50 °C y guardados en frascos de color ámbar para su posterior análisis.

Pruebas fitoquímicas

La caracterización fitoquímica se basó en el agrupamiento de metabolitos estructuralmente semejantes, para identificarlos por su comportamiento químico frente a reacciones estandarizadas. Se realizaron las pruebas de coloración al extracto etanólico de las hojas de *Satureja brevicalyx* que se fundamentan en los cambios estructurales ocasionados en los

metabolitos presentes, como aparición o desaparición de una coloración, formación o dilución de un precipitado o desprendimiento de gas (Lock de Ugaz, 1994; Migdalia, 2000).

Obtención del aceite esencial

El aceite esencial de las hojas fue extraído a través del método de arrastre de vapor de agua a partir de 2 kilogramos de muestra fresca, utilizando un equipo especialmente diseñado y adaptado (Lock de Ugaz, 1994; Miranda y Cuellar, 2000).

La determinación del porcentaje de rendimiento de aceite esencial (%RAE), se realizó a escala de laboratorio.

$$\%RAE = \frac{\text{Vol. AE (mL)}}{\text{P muestra (g)}} \times 100$$

Donde:

Vol. AE: Volumen del aceite esencial obtenido en mililitros.

P muestra: Peso de la muestra a destilar en gramos.

Determinación de las constantes fisicoquímicas

Se determinó las principales constantes físicas como índice de refracción, por polarimetría; densidad, por picnometría; índice de éster e índice de acidez, por titulación (Miranda y Cuellar, 2000).

Material biológico

Conformado por ratones hembras y machos, que fueron adquiridos en el Instituto Nacional de Salud Chorrillos, los cuales fueron transportados al Bioterio de Farmacia para su adaptación por siete días a temperatura ambiental con dieta balanceada y agua a voluntad.

Toxicidad aguda oral en ratones

Método: Test N° 423 Método clásico (OECD, 2001).

El ensayo se llevó a cabo según el método de la clase tóxica aguda descrito en la normativa N° 423 de la OECD, para lo cual previamente los animales fueron aclimatados y alojados con libre acceso a agua y alimento con temperatura ambiental entre 21-25 °C y 50 y 60% de humedad con 12 horas de luz/oscuridad. Posteriormente, los animales fueron sometidos a ayuno con libre acceso de agua seis horas antes del ensayo. Se formó un grupo de 10 animales conformado por machos y hembras, a los cuales se le administró por vía oral la sustancia de prueba a la dosis de 2000 mg/kg de peso corporal, y a otro grupo de 10 animales se les administró 0,3 ml de agua destilada (grupo control).

La administración del extracto hidroalcohólico se llevó a cabo, previo ayuno de 6 h, en una sola dosis disolviendo 2 g del extracto en 10 ml de agua destilada.

Los animales fueron observados constantemente durante las primeras 24 h y después una vez al día hasta los 14 días; se registró la aparición y duración de cualquier síntoma tóxico, el peso corporal se anotó al inicio del estudio y semanalmente. Al concluir el período experimental se sacrificaron los animales por sobredosis de pentobarbital sódico.

Evaluación del efecto genotóxico

Método Test N° 474 (ensayo de micronúcleos en eritrocitos de mamífero 1997) (OECD, 1997; Arroyo y Cisneros, 2012).

El ensayo de micronúcleos se realizó en ratones (*Mus musculus*) albinos procedentes del Instituto Nacional de Salud, de 25 a 30 g de peso corporal, para lo cual se formaron siete grupo de seis animales cada uno de ambos sexos. Los grupo estuvieron formados por (control negativo, control positivo, y 3 de 100, 250, 500 mg/kg para el extracto hidroalcohólico y dos de 250 y 500 mg/kg para el aceite esencial).

Durante el experimento recibieron agua y comida (ratonina peletizada) sin restricción y se mantuvieron en condiciones de humedad y temperaturas convencionales.

Como control positivo se utilizó ciclofosfamida a una dosis única de 40 mg/kg, lo cual se diluyó en solución salina al 0,9%, administrándose inmediatamente después de ser resuspendido por vía intra peritoneal.

Los tratamientos fueron administrados dos veces al día durante 48 horas, para luego proceder a eutanizar con pentobarbital 100 mg/kg, este tiempo de estudio está basado en la cinética de maduración de los eritrocitos en ratones.

Se tomó pequeñas muestra de sangre con lo cual se realizó frotis, para luego ser teñidos con colorante Giemsa al 5% previa fijación etanol de 95°.

Las muestras de médula ósea obtenidas se recogieron en 0,5 ml de suero fisiológico, luego se realizó frotis, se fijó con etanol al 95% (v/v) durante 5 min y se secaron al aire libre por una hora. Posteriormente se tiñeron con Giemsa al 5% (v/v) en agua corriente durante aproximadamente 20 min. Se contó a aproximadamente 1000 eritrocitos por individuo, en campos oculares a 400 aumentos a fin de observar la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos maduros o inmaduros. Los datos fueron expuestos en porcentaje de micronúcleos.

Diseño de investigación

Se empleó el diseño de posprueba únicamente, varios grupos y uno de control (Hernández, Fernández y Baptista, 2008).

RG ₁	X ₁	O ₁
RG ₂	X ₂	O ₂
RG _c	-	O _c

G _{1,2}	: Grupo tratamiento
G _c	: Grupo control
X	: Tratamiento
O	: Medición

Análisis de datos

Los datos obtenidos se expresaron en forma de medias y error estándar, y se representaron mediante tablas y figuras. La significancia estadística del peso corporal de los ratones, se estimaron haciendo uso de la prueba t-Student y el porcentaje de micronúcleos mediante la prueba de Dunnett con un nivel de confianza del 95%, utilizando el software SPSS versión 21.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para realizar el presente estudio, se utilizó extracto hidroalcohólico y aceite esencial extraído de las hojas *Satureja brevicalyx* Epling “wayra muña” con un rendimiento de 16,4% para el extracto y 0,95% para aceite esencial.

En la tabla 1 se observa los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* caracterizados según la técnica de Lock de Ugaz y Miranda, siendo fenoles y/o taninos, triterpenos y/o esteroides, flavonoides, catequinas, lactonas sesquiterpénicas y azúcares reductores.

Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* “wayra muña”.

Metabolitos Secundario	Ensayo	Resultado	Observación
Fenoles y/o Taninos	Cloruro férrico	+++	Coloración verde intensa
Triterpenos y/o Esteroides	Lieberma nn-Burchard	++	Coloración verde oscura
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración roja
Catequinas	Catequina	++	Coloración verde carmelita a luz UV
Lactonas Sesquiterpénicas	Baljet	++	Coloración naranja
Azúcares reductores	Benedic	++	Coloración roja

Tabla 2. Constantes físico – químicas del aceite esencial obtenido de las hojas de *Satureja brevicalyx* Epling “wayra muña”.

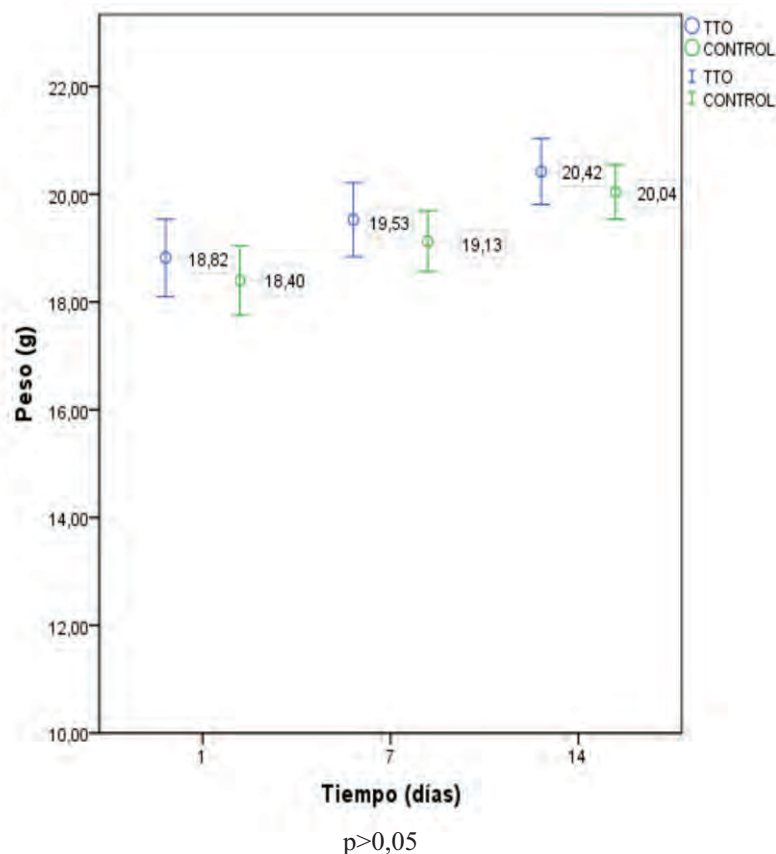
Característica	Resultados
Densidad	0,897 g/ml
Índice de refracción	1,471
Índice de acidez	3,16 KOH/g AE
Índice de éster	6,74 mg KOH/g AE

En la tabla 2 se aprecian que el aceite esencial obtenido es de color amarillo pálido con olor suigéneris, cuya densidad es de 0,897 g/ml, índice de refracción de 1,471, índice de

acidez de 3,16 KOH/g AE e índice de éster de 6,74 mg KoH/g AE.

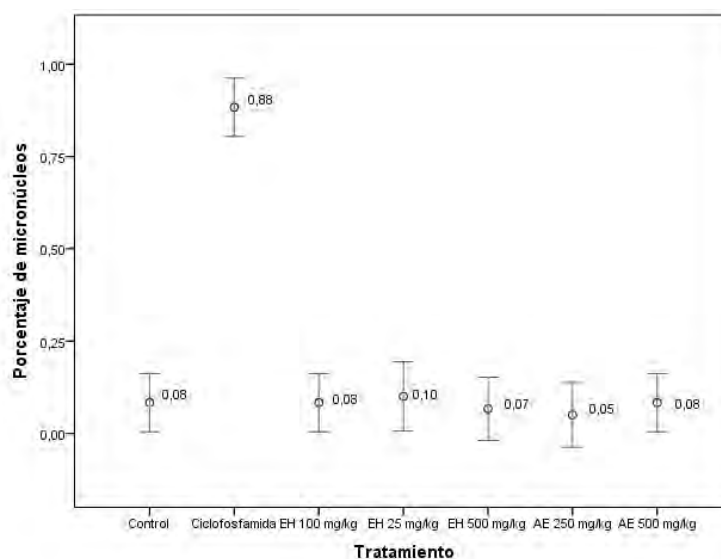
Tabla 3. Comportamiento general de los ratones a la dosis de 2000 mg/kg con extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epling “wayra muña”.

Dosis/Comportamiento general	Grupo control	Extracto 2000 mg/kg
Disminución actividad motora	0/10	1/10
Aumento de actividad motora	0/10	0/10
Perdida de reflejos de enderezamiento	0/10	0/10
Lagrimación	0/10	0/10
Mucosas pálidas	0/10	0/10
Mucosas hiperémicas	0/10	1/10
Erección de la cola	1/10	2/10
Piloerección	1/10	2/10
Diarrea	0/10	0/10
Agresivo	1/10	1/10
Atemorizado	0/10	0/10

**Figura 1.** Variación de peso corporal de los ratones por efecto de la administración de 2000 mg/kg peso corporal del extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epling “wayra muña”.

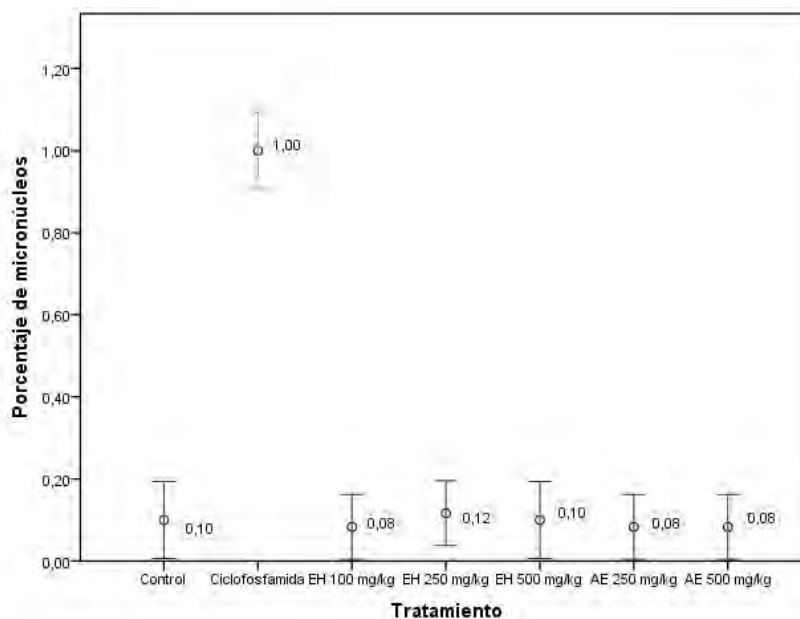
En la figura 1 se observa la variación de peso corporal de los ratones por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico a 2000 mg/kg p.c., donde se aprecia que la ganancia peso corporal, tanto del grupo tratamiento como del

grupo control es creciente en función del tiempo, siendo estadísticamente no significativos según la prueba de t-Student a los 7 y 14 días.



EH: extracto hidroalcohólico; AE: aceite esencial.
p>0,05

Figura 2. Porcentaje de micronúcleos en sangre de ratón por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico y aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling “wayra muña”.



EH: extracto hidroalcohólico; AE: aceite esencial.
p>0,05

Figura 3. Porcentaje de micronúcleos en médula ósea de ratón por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico y aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling “wayra muña”.

La seguridad del extracto hidroalcohólico se evaluó por estudios de toxicidad aguda y genotoxicidad en ratones. El ensayo de toxicidad aguda por vía oral en ratones mostró que el extracto posee un bajo potencial tóxico, dado la ausencia de mortalidad, ausencia de signos tóxicos a la dosis de 2000 mg/kg como se observa en la tabla 3 y ganancia de peso corporal a través del tiempo. Por otra parte, la ganancia de peso corporal a los 7 y 14 días del grupo tratado con el

extracto en comparación con el grupo control, como se observa en la figura 1 no presentaron diferencias estadísticas significativa (p>0,05). Los animales no llegaron a presentar convulsiones o incoordinación motora, no se detectó diarrea ni piloerección marcada, presentando un solo animal disminución de la actividad motora, uno mucosa hiperémicas, dos erección de la cola y piloerección y un solo animal se comportaba como agresivo de los diez

animales expuestos y en la necropsia efectuada al término del estudio no se observaron alteraciones en el análisis macroscópico de las vísceras, hígado, bazo, riñón y pulmones de los animales. Los estudios anatomopatológicos macroscópicos no mostraron ninguna alteración en los órganos estudiados.

Los resultados de estudios de toxicidad aguda para el extracto en la presente investigación indican que, la Dosis letal 50 (DL50) estaría encima de los 2000 mg/kg de peso corporal, clasificándose en la categoría 5 según el Sistema Globalmente Armonizado, calificándose como “No clasificada” (SGA, 2005).

Respecto al estudio de genotoxicidad se puede observar los resultados en la figura 2 sobre el porcentaje de micronúcleos en sangre de ratón por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico y aceite esencial de *Satureja brevicalyx* “wayra muña”, no presenta diferencia estadística significativa en relación al control negativo, ($p > 0,05$); de la misma forma se puede observar en la figura 3 que el extracto hidroalcohólico y aceite esencial no indujo en forma significativa la formación de micronúcleos en médula ósea de ratón.

El efecto genotóxico por formación de micronúcleos se considera positivo si hay un aumento estadísticamente significativo en los eritrocitos micronucleados y es dependiente de la dosis. Si no se cumple ninguna de las condiciones anteriores, la respuesta de prueba se clasificará como negativa (Hayashi *et al.*, 1994).

El ensayo *in vivo* de micronúcleos en mamíferos se emplea para detectar lesiones provocadas por la sustancia de ensayo en los cromosomas o el aparato mitótico de eritroblastos mediante el análisis de eritrocitos tomados de la médula ósea y/o la sangre periférica de animales (por lo general roedores), por ende determina daño en los cromosomas en un sistema vivo. Tiene por objeto determinar las sustancias que ocasionan lesiones citogenéticas que dan lugar a la formación de micronúcleos con fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros retardados (Hayashi *et al.*, 1994).

Los micronúcleos son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear, se corresponden con material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular, reflejan aberraciones cromosómicas y se originan por roturas cromosómicas, por errores durante la replicación y posterior división celular del ADN y/o por la exposición a agentes genotóxicas. Existen factores capaces de influir o modificar el número de micronúcleos presentes en una célula (edad, género, vitaminas, tratamientos médicos, exposición diaria a agentes genotóxicos, etc.) (Zalacain, Sierrasesúmaga y Patiño, 2005).

Siendo la genotoxicidad la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, origina efectos biológicos adversos no solo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentren relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula (Holmberg, Högberg y Johanson 2001).

Cuando los eritroblastos de la médula ósea se transforman en eritrocitos policromáticos, el núcleo principal es expulsado y el micronúcleo, caso de haberse formado, puede permanecer

en el citoplasma, que de lo contrario quedaría anucleado. Resulta más fácil visualizar los micronúcleos en estas células, pues carecen de núcleo principal. El aumento de la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de animales tratados es indicativo de la existencia de lesiones cromosómicas inducidas (Arencibia *et al.*, 2009). En este ensayo se emplea habitualmente médula ósea de roedores, pues es en ese tejido donde se forman los eritrocitos policromáticos. La detección de eritrocitos inmaduros policromáticos micronucleados en la sangre periférica también puede llevarse a cabo en otras especies en las que se haya demostrado que el bazo no es capaz de eliminar los eritrocitos micronucleados o que son suficientemente sensibles para detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales. Entre los diversos criterios para distinguir los micronúcleos figura la determinación de la presencia o la ausencia de centrómero o de ADN centromérito en los mismos. El parámetro principal es la frecuencia de eritrocitos inmaduros policromáticos micronucleados (Gollapudi y McFadden, 2000).

Arroyo *et al.* (2018), al evaluar el efecto antimutagénico del aceite de las semillas de *Plukenetia volubilis* “sacha inchi” en ratones encontró que no presenta efecto mutagénico al no inducir la formación de micronúcleos en sangre y médula ósea de ratón.

Con relación a la ausencia de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico y del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* “wayra muña”, se debe a que los componentes presentes no tienen efecto sobre los procesos hereditarios como reporta al evaluar el efecto genotóxico de los extractos fluidos de *Plantago lanceolata* L. (llantén menor) y *Matricaria recutita* L. (manzanilla) (Vizoso *et al.*, 2005).

En conclusión el extracto hidroalcohólico y aceite esencial extraídos de las hojas de *Satureja brevicalyx* Epling “wayra muña”, no presentan efecto genotóxico en ratones, debido a que no produce variación significativa del porcentaje de micronúcleos en sangre y médula ósea de ratón y la dosis letal media se encuentra por encima de 2000 mg/kg de peso corporal, clasificándose en la categoría 5 según el Sistema Globalmente Armonizado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar Felices, E. (2007). *Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de Smallanthus sonchifolius (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunomoduladora*. [Tesis de Maestría]. UNMSM.
- Arencibia, D., Rosario, L., Morffi, J. y Curveco, D. (2009). *Estrategias en las evaluaciones genotóxicas*. Revista de toxicología en línea, 3(3), pp. 23-40.
- Arroyo Acevedo, J. y Cisneros Hilario, C. (2012). *Modelos experimentales de investigación farmacológica*. Asdimor publicaciones SAC, pp. 139-140.
- Arroyo-Acevedo, J., Herrera-Calderón, O., Cisneros-Hilario, C., Chávez-Asmat R., Anampa-Guzmán, A., Enciso-Roca, E., Condorhuaman-Figueroa, M. y Pari-Olarte B. (2018). *Antimutagenic effect of Plukenetia volubilis (Sacha inchi) Oil in BALB/c Mice*. Annual Research & Review in Biology. 24(3), pp. 1-8.

Carhuapoma Yance M. (2002). *Plantas Medicinales Aromáticas Nativas de la Provincia de Huamanga y sus Perspectivas Económicas*. [Tesis de pregrado], UNSCH.

Diez Macavilca, J. (2002). *Efecto antiespasmódico de la wayra muña *Satureja brevicalyx* Epl sobre intestino aislado de cobayo*. UNSCH.

Fenech, M. (1993). *The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations*. *Mutat Res.* 285, pp. 35-44.

Gollapudi, B. y McFadden, G. (2000). *Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test*. *Mutation Res* 354(2), pp. 97-99.

Hayashi, M., Tice, R., MacGregor, J. y Anderson, D. (1994). *In Vivo, Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay*. *Mutation Res.* 312(2), pp. 293-304.

Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2008). *Metodología de la investigación*. 4ª. Edición. México: McGraw Gill Interamerica.

Holmberg B, Högberg J, Johanson G. (2001). *Toxicología, Principios generales de la toxicología: Definiciones y conceptos* In: Silbergeld E, editor. *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*, pp. 33.3-.5.

Lock de Ugaz, O. (1994). *Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de los Productos Naturales*. 2a. edición. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, pp. 114-133.

Miranda, M. y Cuellar A. (2000). *Manual de prácticas de laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales*. La Habana - Cuba: Editorial Instituto de Farmacia y Alimentos – Universidad de la Habana, pp. 23-33.

OECD. (1997) Organization for economic co-operation and development. *Guideline for testing of chemicals. Mammalian Erythrocyte Micronucleus. Test N° 474*, pp. 1-10.

OECD. (2001). Organization for economic co-operation and development. *Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class. Test N° 423*, pp. 1-14.

Preston, J. y Hoffman G. (2006). *Toxicología genética: En Casarrett y Doull fundamentos de toxicología*. México: McGraw-Hill Interamericana.

SGA. (2005). *Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos*. 1ª. ed. Naciones Unidas. Nueva York y Ginebra, pp. 115-291.

Soto Vásquez, M. (1999) *Estudio fitoquímico y determinación de la actividad analgésica en diferentes extractos de la *Satureja brevicalyx* Epl “wayra muña”*. [Tesis de pregrado], UNSCH.

Sponchiado, G., Adam, M., Dadalt, C., Silva B., Mello-Sampayo, D., Almeida C, Januário, C. y Fleith, M. (2016). *Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review*, *Journal of Ethnopharmacology*, 178, 289-296.

Vizoso, A., Ramos, A., Villaescusa, A., Décalo, M. y Betancourt J. (2005). *Evaluación del efecto genotóxico en extractos fluidos de *Plantago lanceolata* L. (llantén menor) y *Matricaria recutita* L. (manzanilla)*. *Rev Cubana Plant Med.* 5 (2).

Zalacain, M., Sierrasesúмага, L. y Patiño, A. (2005). *El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos*. *Anales Sis San Navarra.* 28(2).