



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIÓLOGO

Actividad anti-genotóxica mediante ensayo cometa de la horchata expandida en
los mercados de Loja

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Palacio Arpi, María Alejandra

DIRECTORA: Bailón Moscoso, Natalia Catalina, Ph.D.

LOJA-ECUADOR

2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D. Natalia Catalina Bailón Moscoso

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación, “Actividad anti-genotóxica mediante ensayo cometa de la horchata expendida en los mercados de Loja” realizado por María Alejandra Palacio Arpi; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Octubre de 2016

f).....

Ph.D. Natalia Catalina Bailón Moscoso

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, María Alejandra Palacio Arpi declaro ser autora del presente trabajo de titulación: “Actividad anti-genotóxica mediante ensayo cometa de la horchata expendida en los mercados de Loja” siendo la Dra. Natalia Bailón Moscoso directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f).....

Autora: Palacio Arpi, María Alejandra

Cédula: 1103621122

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico:

A mis padres, gracias a su esfuerzo he podido cumplir las metas que me he propuesto y con sus consejos he aprendido a ser perseverante y seguir adelante día a día.

A mi hermano y a toda mi familia quienes me han dado su apoyo incondicional y han sido una parte muy importante en el proceso de mi carrera.

María Alejandra Palacio Arpi

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Natalia Bailón, por compartir sus conocimientos y permitirme ser parte de los proyectos en los que está trabajando y por todo el apoyo brindado desde que empecé a trabajar en el laboratorio.

A mi tribunal de tesis, por los comentarios sugeridos que me permitieron realizar un buen trabajo de fin de titulación.

Al equipo del Laboratorio de Biología Celular y Genotoxicología por la ayuda brindada.

A los profesores por impartir sus conocimientos que me sirvieron para formarme como Bióloga.

A mis amigos que estuvieron conmigo durante los años de carrera.

María Alejandra Palacio Arpi

INDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
INDICE DE CONTENIDOS	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN.....	5
CAPITULO I.....	7
MARCO TEÓRICO	7
1.1 Medicina tradicional.....	8
1.1.1 Plantas medicinales.....	8
1.1.1.1 Horchata.....	8
1.2 Genotoxicidad.....	9
1.2.1 Biomarcadores para la determinación de actividad genotóxica.....	10
1.2.1.1 Viabilidad celular.....	10
1.2.1.2 Ensayo del cometa.....	10
1.3 Estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno (ROS).....	11
1.3.1 Biomarcadores para la determinación de especies reactivas de oxígeno.....	12
1.3.1.1 Determinación de ROS por fluorometría.....	12
1.4 Modelo biológico.....	12
1.4.1 Cultivos celulares.....	12
1.4.1.1 Línea celular: Chinese Hamster Ovary (CHO-K1).....	12
CAPITULO II.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1 Área y material de estudio.....	14

2.1.1	Preparación de liofilizados de horchata.	14
2.2	Modelo Biológico y cultivo celular.	14
2.3	Tratamiento y controles.	15
2.4	Ensayo del Cometa.	16
2.4.1	Ensayo del cometa: Tratamiento con horchata.	16
2.4.1.1	Siembra y cosecha.	16
2.4.1.2	Viabilidad por FDA-Bromuro de Etidio.	16
2.4.1.3	Preparación de placas para lectura.	16
2.4.1.4	Electroforesis y lectura de placas.	17
2.4.2	Ensayo del cometa: Tratamiento con horchata + H ₂ O ₂	17
2.5	Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).	17
2.5.1	ROS: Tratamiento con horchata.	17
2.5.2	ROS: Tratamiento con horchata + H ₂ O ₂	18
2.7	Análisis estadísticos.	18
2.7.1	Viabilidad por FDA-Bromuro de Etidio.	18
2.7.2	Ensayo del Cometa.	18
2.7.3	Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).	18
CAPITULO III.....		19
RESULTADOS		19
3.1	Viabilidad por FDA-Bromuro de Etidio.	20
3.2	Actividad genotóxica cuantificada mediante Ensayo del Cometa.	21
3.3	Actividad anti-genotóxica cuantificada mediante Ensayo del Cometa.	22
3.4	Inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS).	24
3.5	Inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno.	24
CAPITULO IV		26
DISCUSION.....		26
CONCLUSIONES		30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		31
ANEXOS.....		35

RESUMEN

La medicina tradicional ha sido de gran interés en todo el mundo ya que implica el uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades. En Ecuador, la horchata es una bebida de uso cotidiano elaborada con plantas que poseen propiedades terapéuticas, sin embargo, se sabe que muchas de estas plantas pueden ser tóxicas para la salud. En este trabajo evaluamos la actividad genotóxica y anti-genotóxica de 9 tipos distintos de horchata sobre la línea celular de Ovario de Hámster Chino (CHO-K1) mediante ensayo del cometa y la producción e inhibición de especies reactivas de oxígeno mediante fluometría. Los resultados indican que las horchatas producen efectos genotóxicos en el ADN de las células así como la producción de ROS, sin embargo, al combinarlas con un inductor de daño genotóxico y de ROS, disminuye tanto la genotoxicidad como la producción de ROS, lo que nos permite confirmar que esta bebida tradicional posee actividad anti-genotóxica y antioxidante. Comparamos nuestros resultados con la composición de las horchatas y observamos que la presencia o ausencia de algunas plantas podría estar influyendo para que este efecto ocurra.

Palabras clave: Horchata, Ensayo del Cometa, Especies Reactivas de Oxígeno.

ABSTRACT

Traditional medicine has been of great interest worldwide because it involves the use of medicinal plants for the treatment of diseases. In Ecuador, horchata is a beverage made with everyday household plants that have therapeutic properties; however, it is known that many of those plants may be toxic to human health. In this work we evaluate the genotoxic and antigenotoxic activity of nine different types of horchata on the Chinese Hamster Ovary cell line (CHO-K1) by comet assay and production and inhibition of reactive oxygen species by fluorimetry. Our results suggest that horchata generate genotoxic effects on cell's DNA, as well as production of ROS; however, when combined with an inducer of genotoxic damage and ROS, genotoxic activity and ROS production are reduced, allowing us to confirm that this traditional drink has anti-genotoxic and antioxidant activity. We compared our results with the horchata plant composition and found that the presence or absence of some plants could be influencing for this effect to occur.

Key words: Horchata, Comet Assay, reactive oxygen species

INTRODUCCIÓN

Las plantas que presentan propiedades terapéuticas y producen efectos farmacológicos positivos en el organismo humano se conocen como plantas medicinales, de las cuales se sabe que de forma natural sintetizan y acumulan algunos metabolitos secundarios y han sido empleadas para tratar enfermedades (Motaleb, 2011). Estos metabolitos secundarios confieren una serie de propiedades a las plantas medicinales y no se encuentran siempre en la misma proporción ni en las mismas especies (Sánchez et al., 2000). Antiguamente las culturas indígenas utilizaban las hierbas como rituales de curación, incluso en las escrituras chinas y jeroglíficos egipcios se describían los usos medicinales de las plantas (Motaleb, 2011).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) menciona que el 80% de las personas confían en el uso de las plantas medicinales para su salud, en Estados Unidos ha existido un aumento significativo del uso de hierbas medicinales debido a la insatisfacción de la sociedad con respecto al costo de la medicina recetada y en Alemania una gran cantidad de medicamentos han sido elaborados a base de estas plantas y son prescritos por médicos de este país (Motaleb, 2011). Además en países de América Latina la fitoterapia ha sido practicada por los grupos indígenas y utilizada por la sociedad en general (Bussmann & Sharon, 2006).

En Ecuador una de las tradiciones es el uso de plantas medicinales a manera de infusión, las cuales se mezclan para elaborar una bebida que posee propiedades anti estrés, tónico cerebral, digestiva, hidratante, energizante (Santos, 2015) y antiinflamatoria (Cerón, 2006). Esta bebida se conoce con el nombre de horchata, las plantas que se usan en su elaboración son empleadas para distintos problemas de salud como reumatismo, “nervios”, afecciones al corazón, cólicos, fiebre, gripe, dolor de garganta, presión, colesterol, dolor de cabeza, estomago, gastritis, diarrea (Santos, 2015), inflamaciones del riñón, piel e hígado, tónico cerebral, entre otras (Cerón, 2006).

Debido a que la horchata es una bebida de uso cotidiano en nuestra ciudad, la problemática que presenta este trabajo de fin de titulación radica en conocer si posee actividad genotóxica en células o de lo contrario un posible efecto protector, además contribuirá con información para dar un mejor uso a esta bebida con el fin de mejorar la salud de personas que padezcan enfermedades o evitar su consumo, así mismo aportar información para el desarrollo de futuros estudios relacionados con el tema.

Con lo mencionado anteriormente se han planteado algunos objetivos que se requieren para resolver y dar respuesta a la problemática planteada. El objetivo general es determinar el

efecto genotóxico y/o protector así como la inducción de especies reactivas de oxígeno de la horchata en la línea celular CHO-K1 mediante ensayo cometa y 2'7' diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA), respectivamente. Los objetivos específicos son: Determinar el efecto genotóxico y/o protector de la horchata en la línea celular de ovario de hámster chino (CHO-K1) mediante ensayo cometa y determinar la inducción o disminución de ROS en la línea celular CHO-K1.

CAPITULO I
MARCO TEÓRICO

1.1 Medicina tradicional.

La medicina tradicional se refiere a los conocimientos médicos que las culturas indígenas desarrollaron con el uso de las plantas y animales, y con ello el establecimiento de técnicas y terapias espirituales para tratar una enfermedad (Abbott, 2014). Cada cultura poseía diferentes sistemas médicos tradicionales que se asocian con sus filosofías y orígenes, tal es el caso de la medicina china que se ha extendido en varios lugares del mundo, sin embargo otras, como la medicina tibetana solamente se encuentran en su país de origen (Umashanker & Shruti, 2011). La medicina tradicional ha sido de gran importancia en todo el mundo y su interés ha ido incrementando gracias a los estudios de científicos y la sociedad en general (Azaizeh et al., 2010). Antiguamente el uso de plantas para el tratamiento de enfermedades hizo que estas sean utilizadas con el fin de sustituir la medicina ortodoxa por sus altos costos y escasas (Ayo, 2010).

1.1.1 Plantas medicinales.

Las plantas medicinales son aquellas especies que son empleadas en fitoterapia, poseen actividad medicinal y pueden ser utilizadas en la elaboración de fármacos (Rasool, 2012), para el tratamiento de enfermedades del ser humano (Nostro et al., 2000), incluso se las ha utilizado en la medicina veterinaria, agricultura, alimentación y fabricación de perfumes (Saraswathi et al., 2011). Existen reportes que demuestran que varios extractos obtenidos de las plantas medicinales poseen actividad antiinflamatoria y antioxidante (Prieto et al., 2003), es por eso que han sido estudiadas con el fin de reemplazar los compuestos antiinflamatorios de origen químico (Mascolo et al., 1987). Las plantas medicinales sintetizan y acumulan algunos metabolitos secundarios de forma natural (Motaleb, 2011), estos confieren una serie de propiedades a las plantas y no se encuentran siempre en la misma proporción ni en las mismas especies (Sánchez et al., 2000). Existe una gran cantidad de bebidas o infusiones que son elaboradas a base de plantas medicinales, una de las más tradicionales en nuestro medio es la horchata.

1.1.1.1 Horchata.

La horchata es una bebida refrescante compuesta por especies medicinales, a la cual se le han asignado distintos nombres dependiendo del tipo de elaboración y el país donde la preparan, por ejemplo en México esta bebida es elaborada a base de arroz, vainilla y canela, en España se la conoce como "Horchata de Chufas" y es preparada con raíces de *Juncia avellanada* y en Venezuela se utilizan semillas de sésamo, azúcar y agua para su elaboración (Fernández & Viracucha, 2014). En nuestro país, la horchata constituye una infusión artesanal con propiedades medicinales, es tradicional y propia de nuestra cultura (Torres & Rodríguez,

2011). Las plantas que la conforman se comercializan en la mayoría de los mercados locales, siendo aproximadamente 67 especies, sin embargo no todas son muy comunes de encontrar (Tinitana, 2014). La elaboración de esta bebida es de corto tiempo, consiste en hacer hervir todas las hierbas y agregarle ingredientes adicionales como limón, azúcar, entre otros (Torres & Rodríguez, 2011). Se pueden incluir pétalos, tallos, cortezas, raíces, hojas y semillas, obteniendo así una bebida de color rosa que se debe a las especies *Amaranthus hybridus* y *Aerva sanguinolenta*, la cual se emplea como remedio antiinflamatorio, bebida refrescante o infusión, además se ha comercializado en gran medida de tal modo que también es expendida en presentaciones comerciales de 50 o 100 gramos que contienen una mezcla de las especies secas y trituradas (Tinitana, 2014).

1.2 Genotoxicidad.

La genotoxicidad se define como el efecto que causa destrucción en el material genético de las células (Umang, 2012) como los cromosomas y el ADN y estudia los factores o agentes que causan estos daños, los cuales pueden producir mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, reordenamientos y cambios en el número de cromosomas y amplificaciones de genes, tanto en células somáticas como germinales (Phillips & Arlt, 2009).

El estudio de sustancias o compuestos dentro de la genotoxicidad conlleva a entender el mecanismo de funcionamiento de estos, lo que es importante para evaluar los riesgos de exposición de una persona a un agente genotóxico (Phillips & Arlt, 2009). Estas sustancias que tienen propiedades genotóxicas se las conoce como genotoxinas, sus efectos pueden afectar la información genética, estos son: a) carcinógenos: agentes cancerígenos, b) mutágenos: agentes causantes de mutaciones y c) teratógenos: agentes causantes de defectos en el nacimiento (Umang, 2012).

Actualmente existen autoridades que se encargan de evaluar la seguridad de nuevos fármacos, esto permitirá detectar si el fármaco o droga tiene algún tipo de riesgo o beneficio al momento de ser ingerido (Umang, 2012). Existen instituciones como la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) que explican la clasificación de una gran cantidad de agentes carcinógenos, los cuales según sus reportes han sido considerados en su mayoría genotóxicos, es así que a estos compuestos se les atribuye un mayor riesgo para los seres humanos que los carcinógenos no genotóxicos sobre los cuales es posible establecer un nivel de exposición por debajo del cual no inducen algún tipo de riesgo cancerígeno (Phillips & Arlt, 2009).

Con el fin de conocer los mecanismos de la carcinogénesis se emplean técnicas de laboratorio donde se evalúan los efectos de los compuestos cancerígenos, estas técnicas comprenden

una fase de iniciación donde se aplica un solo tratamiento con el agente genotóxico y una fase de promoción donde se trata a las células con una serie de repeticiones del tratamiento con el agente no genotóxico (Phillips & Arlt, 2009). Se conocen una serie de compuestos que actúan como agentes genotóxicos para las células, como el etilmetanosulfonato (EMS) (Gocke et al., 2009).

1.2.1 Biomarcadores para la determinación de actividad genotóxica.

1.2.1.1 Viabilidad celular.

Las técnicas para evaluar la viabilidad celular permiten medir la proporción de células viables después de un procedimiento potencialmente traumático donde se produce un aumento incontrolado de la permeabilidad de la membrana lo cual influye en la proliferación celular y supervivencia (Freshney, 2010). La viabilidad celular debe ser estimada con pruebas precisas y rápidas que permitan mantener exitosamente los cultivos celulares, con el fin de ser empleados en la evaluación de compuestos citotóxicos o genotóxicos (Jones & Senft, 1985).

1.2.1.2 Ensayo del cometa.

Existen varias pruebas que se han diseñado para la detección de distintas alteraciones genéticas, emplean protocolos que permiten evaluar la genotoxicidad de varias sustancias químicas, físicas o biológicas (Phillips & Arlt, 2009) y han sido utilizadas en carcinogénesis y toxicología ambiental, y sus efectos son evaluados específicamente en células individuales (Singh et al., 1988).

La evaluación del daño genotóxico en el ADN de las células se puede medir mediante una técnica que permite determinar los sitios alcali lábiles y roturas de la cadena de ADN, se lo conoce como Ensayo del Cometa, con el cual se puede visualizar el incremento de daño del ADN a través de la migración del mismo que se asemeja a la forma de un “cometa” que posee una cabeza y una cola (Phillips & Arlt, 2009). Este ensayo además puede detectar un porcentaje bajo de células en apoptosis, las cuales se pueden reconocer porque casi todo el ADN de la célula se encuentra en la cola del cometa y su cabeza es relativamente pequeña, a estos se las conoce como cometas “erizo” (Collins et al., 2014).

Las células expuestas a factores genotóxicos que dañan el ADN presentan cometas con una migración continua (Collins et al., 2008), estos factores modifican las características del ADN más aún cuando se encuentran en grandes cantidades (Camacho et al., 1981).

Algunas de las ventajas que brinda este ensayo son: la necesidad de una muestra pequeña (poca cantidad de células), recopilación de información a nivel individual (célula), alta capacidad de detección de daños en el ADN, el uso de poblaciones celulares de cualquier

organismo (Kumaravel et al., 2009), facilidad de aplicación, bajo costo y corto tiempo (Liao et al., 2009).

1.3 Estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno (ROS).

El estrés oxidativo se define como una situación de desequilibrio en la que aumenta la cantidad de oxidantes o disminuye la de antioxidantes (Sies, 2015). Se produce por una inestabilidad entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) donde se incluyen los radicales libres y peróxidos, y la capacidad de reparación del daño por parte un sistema biológico (Fina, 2009).

Al evolucionar los procesos metabólicos aeróbicos se observó la producción de especies reactivas de oxígeno en peroxisomas, mitocondrias y cloroplastos (Apel & Hirt, 2004), estas especies son producidas en condiciones aeróbicas y el daño que causan en las células es constantemente reparado (Fina, 2009). Son perjudiciales en concentraciones altas ya que oxidan proteínas, lípidos y causan daño en el ADN, pero en concentraciones bajas tienen funciones de señalización (Mittal et al., 2014).

Existen varios tipos de productores de ROS, los más estudiados han sido el anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH^\cdot), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso ($HOCl$) (Mittal et al., 2014). El superóxido y el peróxido de hidrógeno son producidos por células fagocíticas durante el proceso de fagocitosis, sin embargo esto puede convertirse en un problema cuando la producción de ROS es excesiva, esto ocurre en el proceso de inflamación aguda y causa un daño en la membrana de la célula en presencia de metales de transición como hierro y cobre (Trenam et al., 1992).

1.3.1 Biomarcadores para la determinación de especies reactivas de oxígeno.

1.3.1.1 Determinación de ROS por fluorometría.

Para medir las especies reactivas de oxígeno, varios estudios utilizan 2'7' diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) que actúa como una sonda apolar atravesando la membrana plasmática y permite cuantificar la cantidad de H₂O₂ celular, cuando está dentro de la célula las esterasas la hidrolizan convirtiéndola en diclorofluoresceína (DCF) (Gallardo, 2014).

1.4 Modelo biológico.

1.4.1 Cultivos celulares.

Los cultivos celulares son utilizados para realizar diagnósticos en laboratorios moleculares, citogenéticos y bioquímicos, para lo cual se requiere que las líneas celulares sean cultivadas durante algunos días, además su manejo en condiciones de asepsia es importante para el mantenimiento a largo plazo (Wiley, 1998).

1.4.1.1 Línea celular: Chinese Hamster Ovary (CHO-K1).

La línea celular proveniente de Ovario de Hámster Chino (CHO-K1), perteneciente a la especie *Cricetulus griseus*, fue introducida en experimentos de laboratorio para investigación desde 1950 y está implicada en la fabricación de proteínas recombinantes (Camire, 2000; Min et al., 2013). Tienen la capacidad de crecer en cultivos en suspensión libre de suero y en altas concentraciones de células (Min et al., 2013), como también pueden crecer de forma adherente, además son utilizadas en la producción de sustancias terapéuticas complejas y pueden ser modificadas genéticamente (Xu et al., 2011).

CAPITULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área y material de estudio.

Las especies vegetales para la preparación de la horchata fueron donadas por la Dra. Fani Tinitana, docente de la Universidad Técnica Particular de Loja, quién las obtuvo de distintos mercados de la ciudad de Loja, Mercado Mayorista, Centro Comercial y Feria Libre Gran Colombia. Se prepararon 9 horchatas con distintas plantas y composición tal como son vendidas (Anexos, Tabla 1).

2.1.1 Preparación de liofilizados de horchata.

Para la elaboración de la horchata las plantas se pesaron en fresco y se mezclaron para obtener 1 litro de la bebida, posteriormente la mezcla se sometió a ebullición por un periodo de 5 a 10 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. En la cabina de flujo laminar se colocó en frascos estériles (500 mL) la cantidad de 250 mL de horchata y en frascos de 250 mL, la cantidad de 125 mL. Se procedió a congelar las muestras de horchata contenida en los frascos con una inclinación de 45° y luego se las trasladó a un liofilizador (LABCONCO-7754047) hasta obtener el extracto deseado. El contenido liofilizado se trasvasó a un frasco nuevo de 100 mL estéril y posteriormente en tubos eppendorf de 1.5 mL, se los almacenó en refrigeración a 8 °C. Para disolver los liofilizados de horchata se utilizó medio HAM-F12.

2.2 Modelo Biológico y cultivo celular.

Se utilizó la línea celular derivada de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*), cultivada en medio HAM-F12 (GIBCO), suplementado con 10% suero fetal bovino SFB (GIBCO), 1% L-Glutamina (GIBCO) y 1% antibiótico antimicótico (GIBCO). Las células se incubaron a una temperatura de 37° C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂, el tiempo de duplicación de las células es de 16 horas.

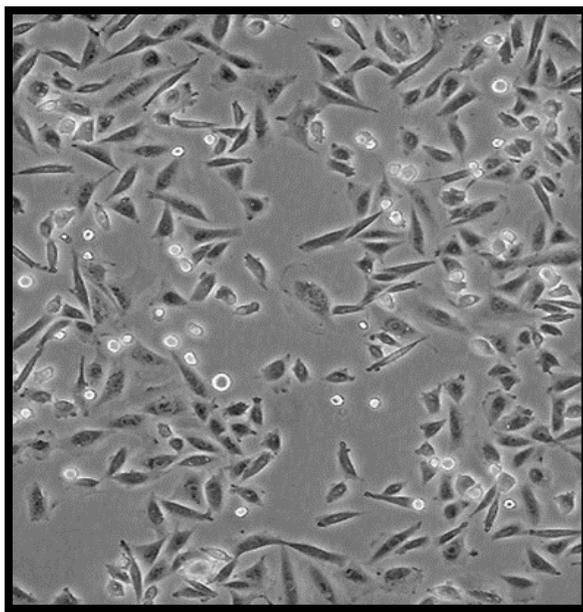


Figura 1. Línea celular CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary).

Fuente: (ATCC, 2014)

2.3 Tratamiento y controles.

El tratamiento con las 9 horchatas se aplicó en tres dosis distintas sobre la línea celular CHO-K1 (Tabla 2).

Tabla 2. Dosis de las horchatas aplicadas a los cultivos celulares para todos los ensayos.

Mercado	Horchatas	Dosis Aplicadas
Mercado Mayorista	1, 6, 7	100, 333 y 1000 $\mu\text{g/ml}$
Centro Comercial	2, 5, 8	100, 333 y 1000 $\mu\text{g/ml}$
Feria Libre Gran Colombia	3, 4, 9	100, 333 y 1000 $\mu\text{g/ml}$

Fuente: Autor

Se utilizó etilmetanosulfonato (EMS) como control positivo a una concentración de 75 μM y como control negativo se aplicó medio HAM-F12 suplementado.

2.4 Ensayo del Cometa.

2.4.1 Ensayo del cometa: Tratamiento con horchata.

2.4.1.1 Siembra y cosecha.

Las células fueron sembradas en cajas de 96 pocillos y se incubaron por 16 horas, pasado este tiempo se aplicaron los tratamientos con el liofilizado de horchata a las concentraciones de 1000, 333 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y los controles, se incubó por 16 horas más. En la cosecha se extrajo todas las células de la caja y se las puso en tubos cónicos de 1.5 mL con su medio de cultivo, se centrifugó por 5 min a 10000 rpm, se desechó el medio y se resuspendió el pellet con 1 mL de medio HAM-F12 suplementado, y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante dejando aproximadamente 40 μL de medio con el pellet, de esta muestra se tomó 20 μL y se lo colocó en tubos de 1.5 ml para viabilidad por FDA-Bromuro de Etidio, y la muestra restante del tubo se utilizó para preparar las placas para la lectura de los cometas.

2.4.1.2 Viabilidad por FDA-Bromuro de Etidio.

Para evaluar la viabilidad de las células se sacaron los tubos almacenados en refrigeración, se les aplicó 20 μL de FDA-Bromuro de Etidio y se homogenizó. Tomamos 20 μL de esta mezcla en portaobjetos y colocamos un cubreobjetos. Se contaron un total de 200 células entre vivas y muertas por placa.

2.4.1.3 Preparación de placas para lectura.

Antes de realizar el ensayo, las placas portaobjetos se prepararon con 150 μL de agarosa de normal punto de fusión 1% (Invitrogen).

Se tomó 20 μL de la suspensión restante obtenida en la cosecha, y se la mezcló con 150 μL de agarosa de bajo punto de fusión 1% (Sigma), de esta mezcla se tomó 75 μL y se la colocó en las placas portaobjetos previamente preparadas, se las cubrió con un cubreobjetos y se las llevó a refrigeración por 10 minutos. Pasado este período de tiempo se retiraron los cubreobjetos, se colocó 130 μL de agarosa de bajo punto de fusión en cada placa y se volvió a cubrir con cubreobjetos para nuevamente someterlas a refrigeración por 10 minutos adicionales. Luego de este tiempo se retiraron los cubreobjetos y se transfirieron las placas a una solución de lisis: 10 % de DMSO (SIGMA) , 1 % tritón X-100 (SIGMA), 2.5 M NaCl (MERCK), 100 mM EDTA (INVITROGEN), 10 mM Tris (INVITROGEN) y pH 10, por un tiempo mínimo de 1 hora y máximo 15 días.

2.4.1.4 Electroforesis y lectura de placas.

Para la electroforesis se dejaron reposar las placas que se encontraban en la solución de lisis en una cubeta de electroforesis con un buffer: 300 mM NaOH (MERCK), 1 mM EDTA (INVITROGEN) y pH >13) durante 20 minutos, luego se realizó la electroforesis en condiciones de 25 V, 300 mA y 20 minutos. Finalizado este tiempo se retiraron las placas de la cubeta y se las colocó en un buffer de neutralización (9.7 g Tris y pH 7.5) y se las deshidrató con metanol para su posterior análisis.

Modificado de: (Tice et al., 2000).

Para visualizar las placas en el microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus) se las hidrató con agua desionizada fría y se las tiñó con 60 µL de Bromuro de etidio (30 µg/ml). El daño del ADN se midió por la longitud de la cola de los cometas y se visualizaron en una computadora con el Software Comet Assay IV.

Modificado de: (Jones & Senft, 1985).

2.4.2 Ensayo del cometa: Tratamiento con horchata + H₂O₂.

Se realizó el mismo procedimiento que en los ensayos donde se aplicó solamente horchata, la diferencia es que se incluyó una dosis de 5 mM de H₂O₂ y se mezcló con cada horchata para aplicar tratamiento sobre la línea celular.

El efecto anti-genotóxico de las horchatas se calculó en porcentaje utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{H_2O_2 - (\text{Horchata} + H_2O_2)}{H_2O_2} * 100$$

2.5 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).

2.5.1 ROS: Tratamiento con horchata.

Las células se sembraron en cajas de 96 pocillos y se incubaron por 16 horas. Se aplicó tratamiento con 2'7' diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) (20 µM) y una solución salina balanceada Hank's (HBSS), se incubó por 30 minutos, transcurrido este tiempo la solución de H₂DCFDA con HBSS se eliminó, se lavaron los pocillos con PBS, se aplicó el tratamiento con HBSS y las 9 horchatas a las concentraciones de 100, 333 y 1000 µg/mL, como control positivo se usó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) con HBSS a las concentración de 5 mM como control negativo se aplicó HBSS en las células y en el blanco solo HBSS sin

células. Se incubó por 2, 4 y 6 horas. La caja multipocillos se leyó en Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher Scientific).

Modificado de: (Jakubowski & Bartosz, 2000).

2.5.2 ROS: Tratamiento con horchata + H₂O₂.

Se realizó el mismo procedimiento que en los ensayos donde se aplicó solamente horchata, la diferencia es que se incluyó una dosis de 5 mM de H₂O₂ y se mezcló con cada horchata para aplicar tratamiento sobre la línea celular.

El efecto anti-oxidante de las horchatas se calculó en porcentaje utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{H_2O_2 - (\text{Horchata} + H_2O_2)}{H_2O_2} * 100$$

2.7 Análisis estadísticos.

2.7.1 Viabilidad por FDA-Bromuro de Etidio.

Para analizar los datos de viabilidad se utilizó el software estadístico GraphPad Prism, se aplicó un test paramétrico ANOVA para determinar si existen diferencias significativas entre las dosis con los tratamientos de las 9 horchatas, y un test de Tukey para determinar diferencias entre cada dosis de los liofilizados de horchata.

2.7.2 Ensayo del Cometa.

El análisis de los resultados se realizó con el software GraphPad Prism. El parámetro que se evaluó para medir la genotoxicidad producida por los 9 tipos horchatas en células CHO-K1 fue la longitud de cola. Se empleó el test de Shapiro Wilk para evaluar si los datos tienen una distribución normal, el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de Dunns para comparar entre columnas.

2.7.3 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).

El análisis de datos de ROS se realizó con el software estadístico GraphPad Prism y se aplicó un test de ANOVA y un post test de Dunnett.

CAPITULO III
RESULTADOS

3.1 Viabilidad por FDA-Bromuro de Etidio.

Antes de comparar la viabilidad de las distintas dosis de los tratamientos con horchata primero se evaluó la uniformidad de los resultados obtenidos en los controles positivos y negativos de todas las horchatas mediante el test de Kruskal Wallis ($p < 0.05$), este nos indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los controles de las distintas horchatas. También encontramos que todos los controles negativos presentaron un porcentaje de viabilidad mayor al 80%, lo que es importante para evitar que aumente la genotoxicidad en nuestro ensayo por muerte celular. El control positivo (EMS) tuvo un porcentaje de viabilidad menor al 50%, lo que indica que de haber habido un efecto citotóxico en las células por las horchatas se vería expresado en los resultados.

Al comparar las tres dosis de todas las horchatas (100, 333 y 1000 $\mu\text{g/mL}$) contra sus respectivos controles negativos mediante un test de ANOVA se encontró diferencias, lo que nos indica que los tratamientos con horchata producen una disminución de la viabilidad. También se observó que el porcentaje de viabilidad disminuye para todos los tratamientos con horchatas conforme aumenta la dosis, es decir, se observó una relación de dosis respuesta.

Al parecer los tratamientos con H1 y H7 presentaron mayor porcentaje de viabilidad en todas las dosis, a diferencia de H3 que presentó la menor viabilidad entre todas las horchatas (Figura 1).

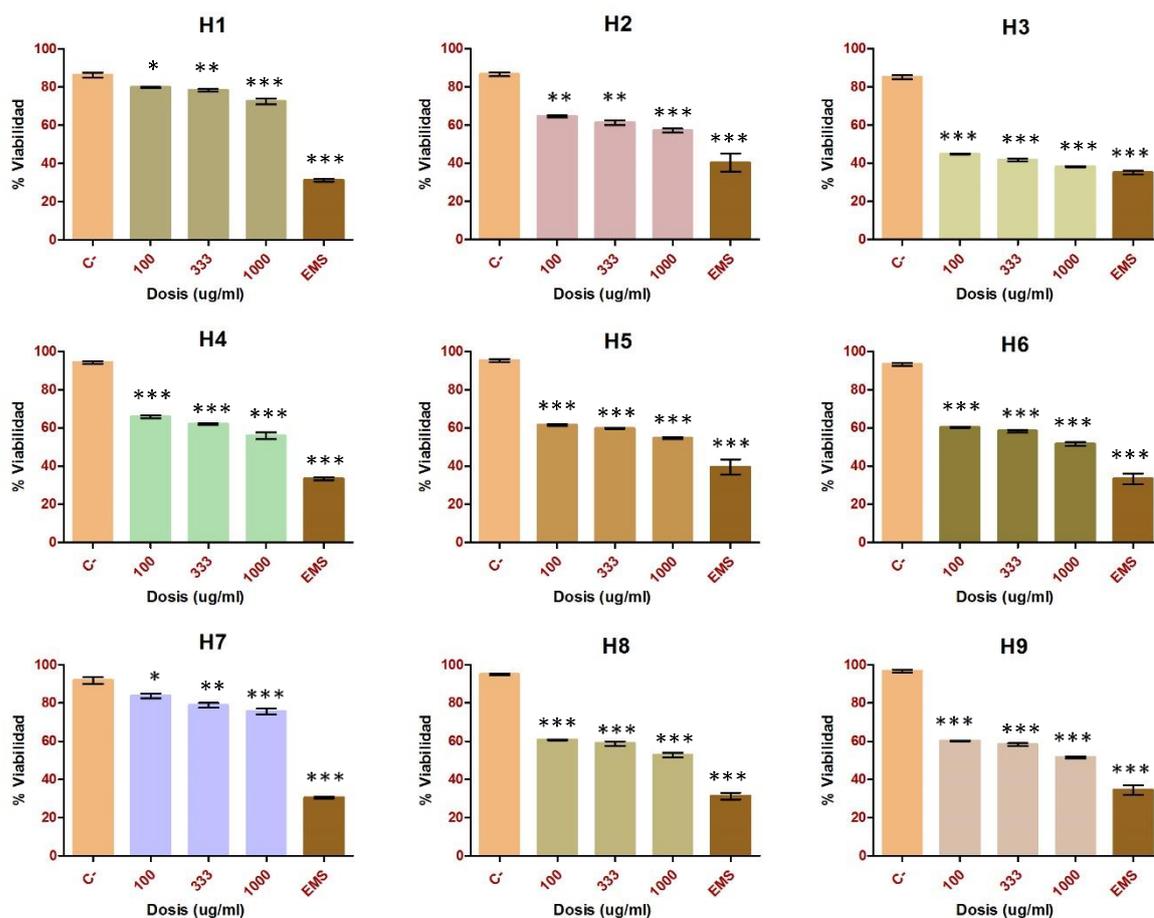


Figura 1. Viabilidad por FDA-Bromuro de Etidio de células CHO-K1 expuestas a dosis de 100, 333 y 1000 µg/ml de 9 horchatas distintas (H1-H9) durante 24 horas. Control positivo: Etilmetanosulfonato (EMS) (75µM). Cada barra representa la desviación típica ± EE. (***: p<0.0001, **: p<0.001 *:p<0.01).

Fuente: Autor

3.2 Actividad genotóxica cuantificada mediante Ensayo del Cometa.

La genotoxicidad de las 9 horchatas fue medida con un análisis de longitud de cola de las células (Figura 2), se observa que el control negativo tuvo diferencias significativas con las tres dosis de las 9 horchatas, a excepción de la dosis de 100 µg/ml de H1 y H7, las cuales fueron las que presentaron menor actividad genotóxica. Con respecto al control positivo (EMS), la dosis más alta (1000 µg/ml) de todas las horchatas (H1-H9) presentaron diferencias significativas con el etilmetanosulfonato.

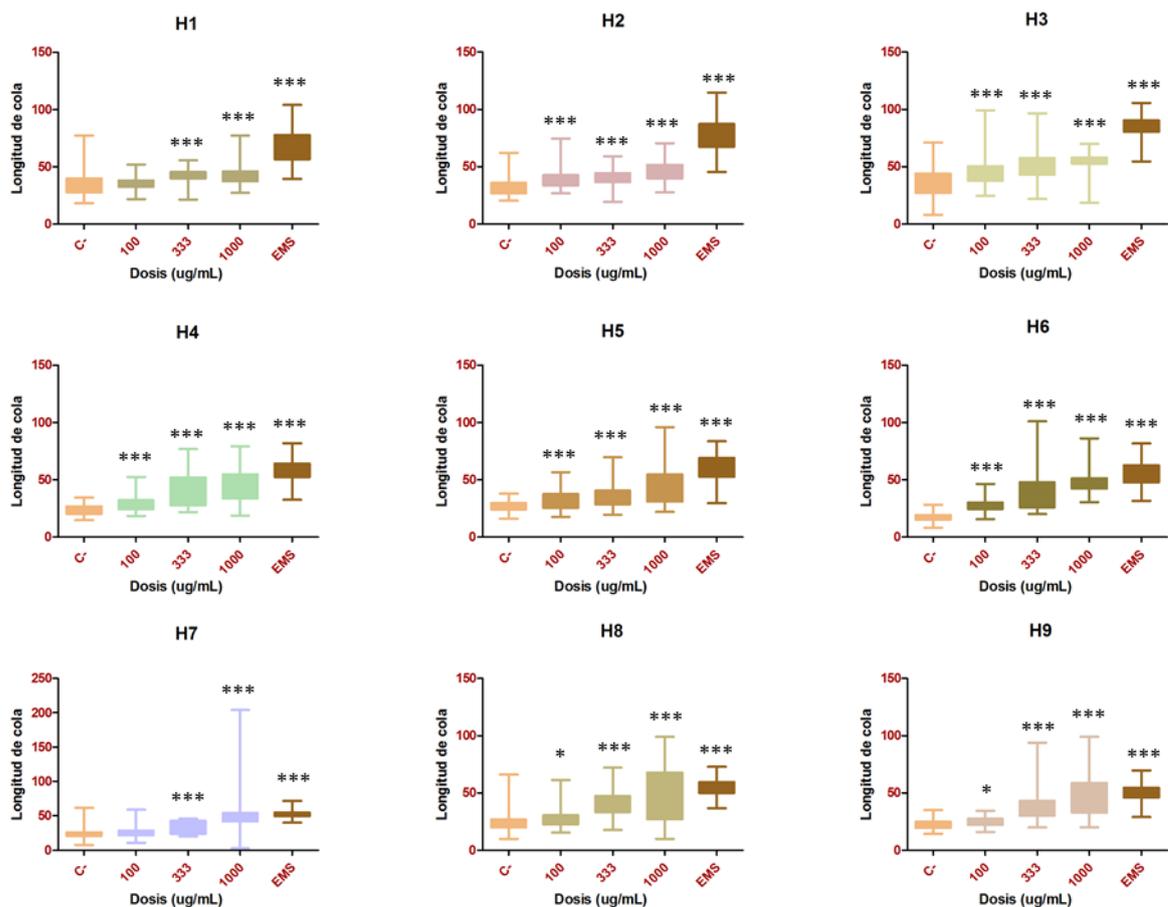


Figura 2. Longitud de cola de células CHO-K1 expuestas a dosis de 100, 333 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ de 9 horchatas distintas (H1-H9) durante 24 horas. Control positivo: Etilmetanosulfonato (EMS) (75 μM). Cada barra representa la desviación típica \pm EE. (***: $p < 0.0001$, **: $p < 0.001$ *: $p < 0.01$).

Fuente: Autor

3.3 Actividad anti-genotóxica cuantificada mediante Ensayo del Cometa.

En los resultados (Figura 3), se observa que el control negativo presentó baja longitud de cola de las células, a diferencia del control positivo (H_2O_2) que produjo longitudes de cola altas. Al comparar los tratamientos con horchata y los tratamientos con horchata + H_2O_2 se observa que al aplicar esta mezcla sobre la línea celular el daño producido por H_2O_2 disminuyó, sin embargo este no llegó a un nivel basal como el indicado por el control negativo; esto se observó en todas las horchatas, aunque en algunas la disminución del daño fue menor como se observa en $\text{H3} + \text{H}_2\text{O}_2$ que presentó valores más altos de longitud de cola en comparación con los demás tratamientos, en cambio en $\text{H1} + \text{H}_2\text{O}_2$, $\text{H2} + \text{H}_2\text{O}_2$, $\text{H4} + \text{H}_2\text{O}_2$ y $\text{H7} + \text{H}_2\text{O}_2$ se visualizó un mayor efecto anti-genotóxico sobre la línea celular, ya que al ser las menos genotóxicas, estas horchatas disminuyeron el daño producido por la horchata. Este resultado

también pudo visualizarse con la fórmula para determinar el porcentaje de actividad anti-genotóxica de cada horchata (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de actividad anti-genotóxica de las 9 horchatas estudiadas cuantificado mediante ensayo del cometa.

% Actividad anti-genotóxica								
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
*	*	+	*			*		
44	40	30	42	38	38	41	37	36

(* Horchatas con mayor actividad anti-genotóxica, + Horchatas con menor actividad anti-genotóxica)

Fuente: Autor

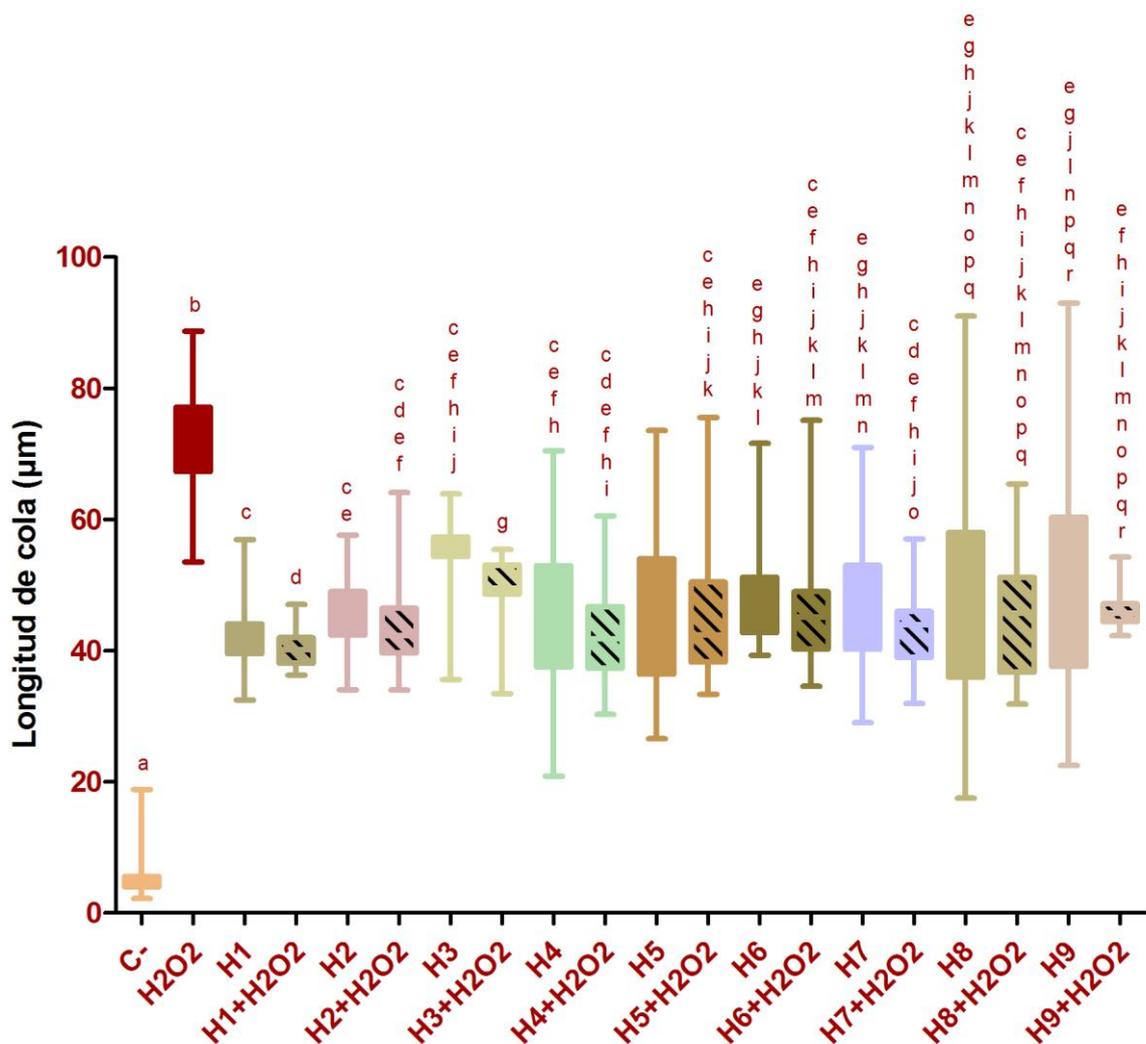


Figura 3. Longitud de cola de células CHO-K1 expuestas a dosis de 1000 µg/ml de las 9 horchatas estudiadas y con una mezcla de horchatas + peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Control positivo: Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) (5 mM). Las letras sobre las barras representan la diferencia significativa entre los tratamientos de acuerdo con el test de Tukey.

Fuente: Autor

3.4 Inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

En la Figura 4 se puede observar un aumento significativo de la cantidad de especies reactivas de oxígeno medidas en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) conforme incrementa la dosis de horchata. Se puede visualizar que H3 presentó una alta cantidad de especies reactivas de oxígeno a la dosis más alta (1000 µg/ml) con respecto a los demás tratamientos. En cambio, H1, H2, H5, H7 y H9 presentaron una menor producción de especies reactivas de oxígeno a la dosis más alta (1000 µg/ml).

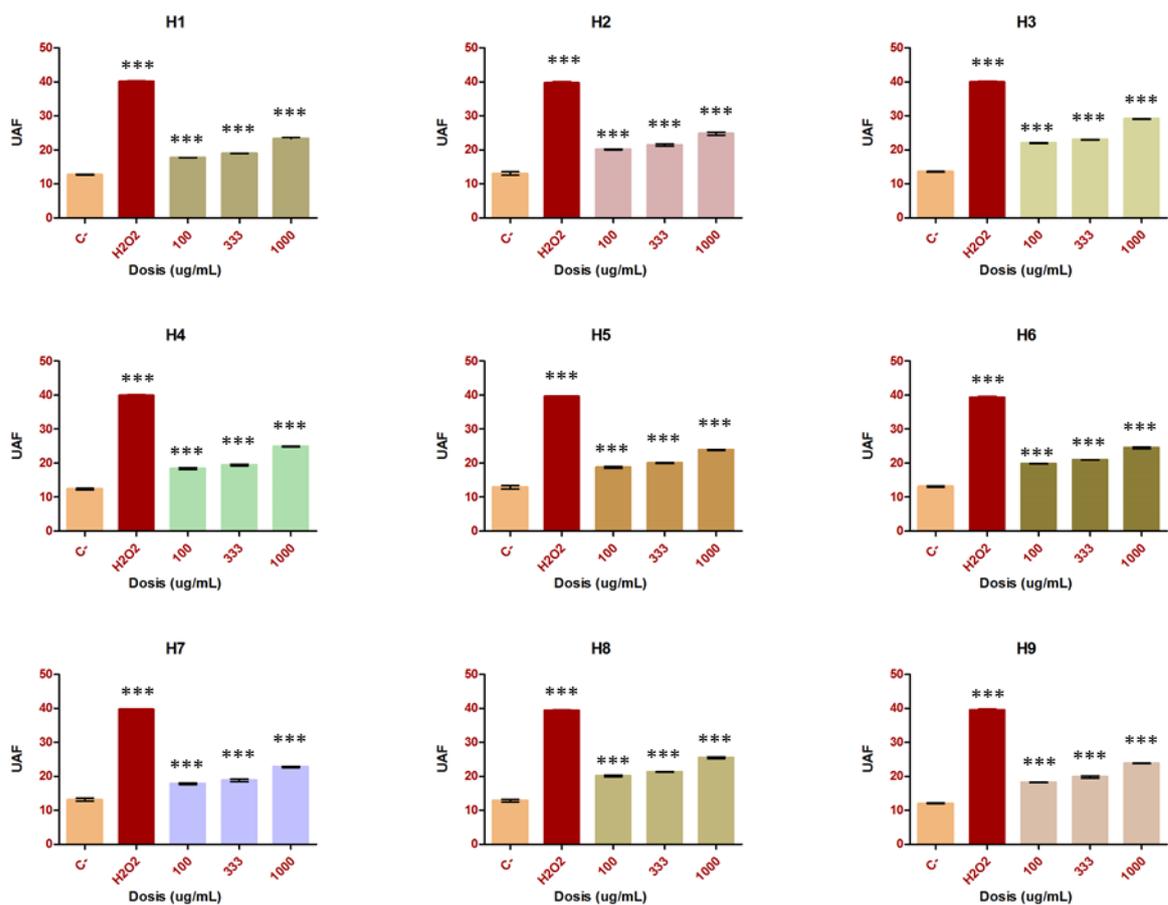


Figura 4. Especies reactivas de oxígeno en células CHO-K1 expuestas a dosis de 100, 333 y 1000 µg/ml de las 9 horchatas estudiadas. Control positivo: Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) (5 mM). UAF (Unidades arbitrarias de fluorescencia). Cada barra representa la desviación típica ± EE. (***:p<0.0001, **: p<0.001 *:p<0.01).

Fuente: Autor

3.5 Inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno.

En la Figura 5 se observa que el control negativo tuvo una baja producción de especies reactivas de oxígeno, y el control positivo una alta producción. Al aplicar los tratamientos de horchata + H₂O₂ se visualizó que la cantidad de ROS producida por H₂O₂ es disminuida al momento de adicionar las horchatas, aunque esta disminución no llega a un nivel basal como el del control negativo. Este efecto fue más evidente en H1+H₂O₂, H2+H₂O₂, H5+H₂O₂, H7+H₂O₂ y H9+H₂O₂, las cuales tuvieron un mayor efecto inhibitorio en la producción de especies reactivas de oxígeno. Este resultado también pudo visualizarse con la fórmula para determinar el porcentaje de inhibición de ROS de cada horchata (Tabla 4).

Tabla 4. Inhibición de las especies reactivas de oxígeno de las 9 horchatas estudiadas cuantificada mediante ensayo ROS.

% Inhibición de ROS								
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
*	*	+		*		*		*
50	48	36	43	49	42	49	39	49

(* Horchatas con mayor actividad anti-genotóxica, + Horchatas con menor actividad anti-genotóxica)

Fuente: Autor

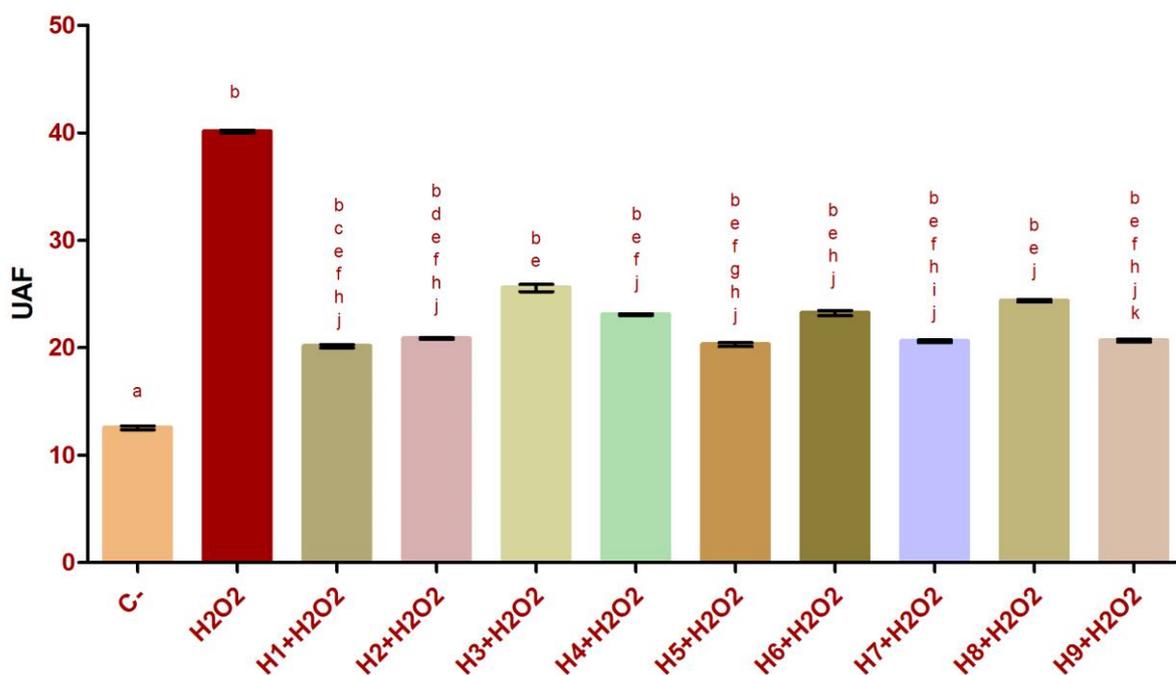


Figura 5. Especies reactivas de oxígeno en células CHO-K1 expuestas a un tratamiento con horchata (1000 µg/ml) + peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Control positivo: Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) (5 mM). UAF (Unidades arbitrarias de fluorescencia). Las letras sobre las barras representan la diferencia significativa entre los tratamientos de acuerdo con el test de Tukey.

Fuente: Autor

CAPITULO IV
DISCUSION

En el ensayo de viabilidad por FDA-Bromuro de Etidio, se observó que entre los controles positivos utilizados para cada tratamiento con horchata no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de viabilidad, lo mismo ocurrió con los controles negativos, esto nos permite determinar la eficiencia del ensayo y comparar los resultados obtenidos de cada tratamiento con los controles. El porcentaje mínimo de viabilidad aceptado es del 70%, valores menores indican citotoxicidad que puede estar inducida por un agente genotóxico (Guarrotxena et al., 2015). En nuestros ensayos las células del control negativo presentaron una viabilidad mayor al 80%, el cual se encuentra dentro del porcentaje de viabilidad aceptado para cultivos celulares. En cambio las células expuestas al control positivo (Etilmetanosulfonato), que ha sido considerado un agente mutagénico en varias pruebas genéticas en mamíferos (Sega, 1984), tuvieron una viabilidad menor al 50%. En las células expuestas a los tratamientos con horchata se observó una disminución de la viabilidad con respecto al control negativo, siendo H3 la que presentó un menor porcentaje de viabilidad, y H1 y H7 las horchatas con mayor porcentaje de viabilidad, sin embargo, se puede concluir que todas las horchatas producen muerte celular, lo cual puede atribuirse a la composición de plantas que cada tratamiento posee, ya que existen plantas que según algunos estudios producen disminución de la viabilidad al exponer a las células a extractos obtenidos de las mismas (Skala et al., 2016).

Las plantas medicinales han sido utilizadas para elaborar infusiones o bebidas empleadas en la terapia contra enfermedades, sin embargo, existe muy poca evidencia científica de los riesgos que pueden causar a la salud (Chichioco-Hernandez et al., 2011), ya que la mayoría sintetizan sustancias tóxicas (Vargas et al., 1991) las cuales pueden causar efectos genotóxicos, mutagénicos y citotóxicos (Celik, 2012). La eficacia y seguridad de los productos o fármacos a base de hierbas depende de su fuente de proveniencia (Chichioco-Hernandez et al., 2011), por lo tanto es importante evaluar la genotoxicidad en extractos o sustancias obtenidos de las plantas antes de su uso (Sponchiado et al., 2016). En este estudio se evaluó la genotoxicidad de 9 horchatas con distinta composición de plantas sobre la línea celular CHO-K1. Los resultados obtenidos permitieron determinar que todos los tratamientos con horchata produjeron daños significativos en el ADN de las células medido por la longitud de cola del cometa, con lo cual se puede confirmar que alguna de las plantas presentes en la horchata o la mezcla de ellas están produciendo efectos genotóxicos sobre las células. Estos resultados se suman a los de otros estudios que confirman potenciales efectos genotóxicos de las plantas probados en líneas celulares (Ananthi et al., 2010; Melo-Reis et al., 2011; Shin et al., 2011). Por otro lado, el análisis de la producción de ROS es un tema importante ya que están involucradas en el desarrollo del cáncer en los seres humanos (Wiseman & Halliwell, 1996; Klaunig et al., 2010), siendo los radicales hidroxilos (OH·) los que producen gran parte

de daños en las bases nitrogenadas del ADN (Wiseman & Halliwell, 1996). Además las especies reactivas de oxígeno pueden provenir de fuentes endógenas como la activación de células inflamatorias y fuentes exógenas como agentes ambientales y fármacos (Klaunig et al., 2010). Es por esto que en este estudio se evaluó la inducción de ROS de las horchatas estudiadas sobre la línea celular, los resultados obtenidos indican que todos los tratamientos con horchata produjeron especies reactivas de oxígeno. Además se observó que las horchatas que tuvieron actividad genotóxica en el ensayo del cometa también indujeron la producción de ROS, siendo H3 la que presentó una mayor genotoxicidad e inducción de ROS en ambos ensayos en comparación con las demás.

Para prevenir problemas en la salud al ingerir estos productos que contienen potenciales carcinógenos, una estrategia es consumir anticancerígenos o antimutágenos naturales o sintéticos que pueden revertir o disminuir la frecuencia de daños en el ADN (De Flora, 1998), sin embargo, el mecanismo de acción de estos no se conoce a fondo (Romero et al., 2005). Lo que han reportado hasta la actualidad es que se encuentran en frutas, verduras y varias especies de plantas (Mitscher et al., 1996). Por esta razón es importante evaluar el potencial anti-genotóxico y antioxidante que algunas especies poseen.

En este estudio se encontró que algunas de las plantas que conforman la horchata o su mezcla poseen actividad anti-genotóxica sobre la línea celular CHO-K1, esto se determinó al observar que la mezcla de horchata + H₂O₂ disminuye el daño producido por H₂O₂, sin embargo, esta disminución no llegó a un nivel basal. Al comparar los resultados con la composición de las horchatas observamos que la presencia o ausencia de algunas plantas podría influir para que este efecto protector ocurra. Es así que se encontró que las especies que están presentes en todas las horchatas son *Iresine herbstii* y *Pelargonium graveolens*. De acuerdo con Dipankar et al. (2011) las hojas de *Iresine herbstii* son utilizadas como un agente anticancerígeno y Schmidt et al. (2009) reportó que esta especie posee efectos antiinflamatorios y actividad antioxidante. De *Pelargonium graveolens* no se encontró información acerca de su genotoxicidad, sin embargo, Dimitrova et al. (2015) informó que ésta especie posee actividad antioxidante. Al relacionar la actividad anti-genotóxica e inhibición de ROS, observamos que las horchatas con mayor potencial anti-genotóxico fueron H1, H2, H4 y H7 e inhibidores de ROS: H1, H2, H5, H7 y H9. Como se observa, H1, H2 y H7 coinciden en los dos ensayos y se podría decir que ambos eventos podrían estar relacionados. En el caso de H4 el efecto anti-genotóxico puede estar relacionado con sistemas de detoxificación ajenos a la producción de ROS (Mishra et al., 2006; Espinoza et al., 2008). En el caso de H5 y H9, se observa una actividad interesante como inhibidoras de ROS, sin embargo al parecer no está relacionado con el efecto protector del ADN. Aunque la actividad inhibidora de ROS puede atribuirse a los antioxidantes presentes en las plantas (Choi et al., 2002), los cuales

proviene de metabolitos secundarios tales como los flavonoides, que según varios estudios tienen la capacidad de eliminar radicales libres (Bors et al., 1990, 1994; Groot & Rauen, 1998), al parecer hay algunos otros componentes en la mezcla que interactúan con el ADN que disminuyen el efecto protector de las H5 y H9.

Por otro lado, como ya se mencionó en H1, H2 y H7 que son las horchatas con mayor actividad anti-genotóxica e inhibición de ROS, las especies *Borago officinalis* y *Mentha spicata* no están presentes. De *Borago officinalis*, se ha aislado alcaloides pirrolizidínicos que poseen actividad genotóxica (Frei et al., 1992) y son mutagénicos (Capasso et al., 2003). Por otro lado, según Bakkali et al. (2008) los aceites esenciales de *Mentha spicata* producen efectos genotóxicos, por lo que se puede decir que la actividad anti-genotóxica en estas tres horchatas podría deberse a la ausencia de las especies mencionadas. Además, la especie *Fuchsia hypoleuca* se encontró solamente en estas horchatas, por lo que podría ser una de las especies causantes de la actividad anti-genotóxica, sin embargo, no existe mucha información acerca de su genotoxicidad, lo que se sabe según Stuessy & Ono (2007) es que varias especies del género *Fuchsia* tienen pigmentos como quercetina, que es un flavonoide que se encuentra en muchas especies de plantas y alimentos de consumo frecuente, tiene actividad antioxidante, antiinflamatoria (Murota & Terao, 2003; Coşkun et al., 2004) y anti-genotóxica (Ohigashi et al., 2013).

Este estudio es un aporte de la evaluación de los efectos citotóxicos, genotóxicos y anti-genotóxicos de los extractos obtenidos de las plantas medicinales constituyentes de la bebida tradicional y de consumo masivo en nuestra provincia como es la horchata. Nuestros resultados sugieren realizar investigaciones más a fondo para conocer los efectos de cada una de las plantas o la mezcla de ellas en el cuerpo humano y así poder darle un uso correcto a esta bebida tradicional.

CONCLUSIONES

La composición de las horchatas puede incrementar tanto el daño en el ADN medido por la longitud de cola en el ensayo cometa como la inducción de ROS. Sin embargo, al combinar las horchatas con un inductor de daño genotóxico y de ROS, las horchatas disminuyen tanto la genotoxicidad como la inducción de ROS, lo que confirma una actividad anti-genotóxica y antioxidante de la horchata. Estos resultados pueden deberse a una planta específica como a la mezcla de ellas, es por ello que se sugiere realizar más estudios toxicológicos de las especies de plantas constituyentes de esta bebida para determinar esta actividad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, R. 2014. Documenting Traditional Medical Knowledge.
- AMÍLCAR, C. 2015. *Ocimum campechianum* (Lamiaceae): su uso en la medicina tradicional. 7: 31–34.
- ANANTHI, R., N. CHANDRA, S.T. SANTHIYA, and A. RAMESH. 2010. Genotoxic and antigenotoxic effects of *Hemidesmus indicus* R. Br. root extract in cultured lymphocytes. *Journal of Ethnopharmacology* 127: 558–560.
- APEL, K., and H. HIRT. 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Plant Biology* 55: 373–99.
- ATCC. 2014. CHO-K1 (ATCC CCL-61). 1–2.
- AYO, R.G. 2010. Phytochemical constituents and bioactivities of the extracts of *Cassia nigricans* Vahl : A review. *Journal of Medicinal Plants Research* 4: 1339–1348.
- AZAIZEH, H., B. SAAD, E. COOPER, and O. SAID. 2010. Traditional Arabic and Islamic Medicine , a Re-emerging Health Aid. 7: 419–424.
- BAKKALI, F., S. AVERBECK, D. AVERBECK, and M. IDAOMAR. 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446–475.
- BORS, W., W. HELLER, C. MICHEL, and M. SARAN. 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. 186: 343.
- BORS, W., C. MICHEL, and M. SARAN. 1994. Flavonoid antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radicals. 234: 420.
- BOURICHE, H., H. MEZITI, A. SENATOR, and J. ARNHOLD. 2016. Anti-inflammatory, free radical-scavenging, and metal-chelating activities of *Malva parviflora*. *Pharmaceutical Biology* 49: 942–946.
- BUSSMANN, R.W., and D. SHARON. 2006. Traditional medicinal plant use in Loja province, Southern Ecuador. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1615866&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- CAMACHO, G., J. MORÁN, N. BETANCOURT, K. MONREAL DE LUNA, and M. BENÍTEZ. 1981. Evaluación por ensayo cometa de daño celular inducido con peróxido de hidrógeno a linfocitos de sangre periférica in vitro.
- CAMIRE, J. 2000. Chinese Hamster Ovary cells for the production of recombinant glycoproteins. 19: 1–2.
- CAPASSO, F., T. GAGINELLA, G. GRANDOLINI, and A. IZZO. 2003. Phytotherapy. Available at: https://books.google.com.ec/books?id=PGsrBgAAQBAJ&pg=PT88&lpg=PT88&dq=genotoxicity+borago+officinalis&source=bl&ots=_3De5rQTm&sig=CJ1F7V6Lyz9mbwyoj00n6U6Oo8&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwihsezSzP3OAhWIVh4KHVPGAqYQ6AEIUjAG#v=onepage&q&f=true.
- CARRIÓN, V. 2012. EL ETNOECOSISTEMA EN LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS MEDICINALES EN LA COMUNIDAD “ EL CARMELO .” Universidad Internacional de Andalucía.
- CELIK, T.A. 2012. Potential Genotoxic and Cytotoxic Effects of Plant Extracts. *In A Compendium of Essays on Alternative Therapy*, 1–302.
- CERÓN, C.E. 2006. Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de los Andes Centrales* 285–293.
- CHICHIOCO-HERNANDEZ, C., J. WUDARSKI, L. GEVAERT, and L. VERSCHAEVE. 2011. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of some Philippine medicinal plants. *Pharmacognosy magazine* 7: 171–175.
- CHOI, C.W., S.C. KIM, S.S. HWANG, B.K. CHOI, H.J. AHN, M.Y. LEE, S.H. PARK, and S.K. KIM. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* 163: 1161–1168.
- COLLINS, A., A. AZQUETA, G. BRUNBORG, I. GAIVÃO, L. GIOVANNELLI, M. KRUSZEWSKI, C. SMITH, and R. ŠTĚTINA. 2008. The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis* 23: 143–151.
- COLLINS, A., G. KOPPEN, V. VALDIGLESIAS, M. DUSINSKA, M. KRUSZEWSKI, P. MØLLER, E. ROJAS, ET AL. 2014. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet

- Project. *Mutation Research* 759: 27–39.
- COŞKUN, Ö., M. KANTER, F. ARMUTÇU, K. ÇETIN, B. KAYBOLMAZ, and Ö. YAZGAN. 2004. Protective Effect of Quercetin, A Flavonoid Antioxidant, In Absolute Ethanol-Induced Acute Gastric Ulcer. *Eur J Gen Med* 1: 37–42.
- DIMITROVA, M., D. MIHAYLOVA, A. POPOVA, and J. ALEXIEVA. 2015. Phenolic Profile , Antibacterial and Antioxidant Activity of Pe L Argonium Graveo L Ens Leaves ' Extracts. 19: 130–135.
- DIPANKAR, C., S. MURUGAN, and P. UMA DEVI. 2011. Review on medicinal and pharmacological properties of iresine herbstii, Chrozophora rottleri and Ecbolium linneanum. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 8: 124–129.
- ESPINOZA, S.E., H. GUO, N. FEDARKO, A. DEZERN, L.P. FRIED, Q.-L. XUE, S. LENG, ET AL. 2008. Glutathione peroxidase enzyme activity in aging. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 63: 505–509.
- FERNÁNDEZ, G., and C. VIRACUCHA. 2014. Guia de bebidas típicas representativas de la Sierra Centro y Sur Ecuatoriana y su maridaje con platos típicos de estas zonas. Universidad de Cuenca.
- FINA, B. 2009. Estrés oxidativo.
- DE FLORA, S. 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 402: 151–158.
- FREI, H., J. LÜTHY, J. BRAUCHLI, U. ZWEIFEL, F.E. WÜRGLER, and C. SCHLATTER. 1992. Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemico-Biological Interactions* 83: 1–22.
- FRESHNEY, R. 2010. Culture of Animal Cells. Sexta Edic. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey Published, Canada.
- GALLARDO, I. 2014. Estudio de las Especies Reactivas del Oxígeno en Cardiomiocitos H9c2. Available at: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/7251/1/TFM-M157.pdf>.
- GOCKE, E., H. BÜRGIN, L. MÜLLER, and T. PFISTER. 2009. Literature review on the genotoxicity, reproductive toxicity, and carcinogenicity of ethyl methanesulfonate. *Toxicology Letters* 190: 254–265.
- GROOT, H., and U. RAUEN. 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 12: 249–255. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-8206.1998.tb00951.x>.
- GUARROTXENA, N., G. ZAIKOV, and A. HAGHI. 2015. Chemical Technology: Key Developments in Applied Chemistry, Biochemistry and Materials Science. CRC Press. Available at: https://books.google.com.ec/books?id=UJS9BwAAQBAJ&source=gbs_navlinks_s.
- IUCN. 2005. A guide of medicinal plants in North Africa.
- JAKUBOWSKI, W., and G. BARTOSZ. 2000. 2,7-Dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: What does it measure? *Cell Biology International* 24: 757–760.
- JONES, K., and J. SENFT. 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 33: 77–79.
- KLAUNIG, J.E., L.M. KAMENDULIS, and B. A HOCEVAR. 2010. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic pathology* 38: 96–109. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.11.028>.
- KUMARAVEL, T., B. VILHAR, S. FAUX, and A. JHA. 2009. Comet Assay measurements : a perspective. *Cell Biology and Toxicology* 25: 53–64.
- LIAO, W., M. MCNUTT, and W.-G. ZHU. 2009. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Elsevier* 48: 46–53. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.02.016>.
- LIM, T. 2013. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Springer Science & Business Media. Available at: https://books.google.com.ec/books?id=Xj1dAwAAQBAJ&dq=matthiola+incana+medicinal+uses&source=gbs_navlinks_s.
- MASCOLO, N., G. AUTORE, F. CAPASSO, A. MENGHINI, and M. PALMIRA. 1987. Biological

- Screening of Italian Medicinal Plants for Anti-inflammatory Activity. *Phytotherapy Research* 1: 28–31.
- MELO-REIS, P., L. BEZERRA, M. VALE, R. CANHETE, and L. CHEN-CHEN. 2011. Assessment of the mutagenic and antimutagenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex by micronucleus test in mice. *Brazilian Journal of Biology* 71: .
- MIN, S., M. SATHYAMURTHY, and G. MIN. 2013. Development of recombinant Chinese hamster ovary cell lines for therapeutic protein production. *Elsevier* 2: 1–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coche.2013.08.002>.
- MISHRA, S., S. SRIVASTAVA, R.D. TRIPATHI, R. KUMAR, C.S. SETH, and D.K. GUPTA. 2006. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere* 65: 1027–1039.
- MITSCHER, L.A., H. TELIKEPALLI, E. MCGHEE, and D.M. SHANKEL. 1996. Natural antimutagenic agents. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 350: 143–152.
- MITTAL, M., M.R. SIDDIQUI, K. TRAN, S.P. REDDY, and A.B. MALIK. 2014. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. 20: 1126–1167.
- MOTALEB, M.A. 2011. Selected Medicinal plants of chittagong hill tracts. Available at: http://cmsdata.iucn.org/downloads/medicinal_plant_11_book.pdf.
- MUROTA, K., and J. TERAQ. 2003. Antioxidative flavonoid quercetin: Implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 417: 12–17.
- NOSTRO, A., M. GERMANÓ, V. D'ANGELO, A. MARINO, and M. CANNATELLI. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. 30: .
- OHIGASHI, H., T. OSAWA, J. TERAQ, S. WATANABE, and T. YOSHIKAWA. 2013. Food Factors for Cancer Prevention.
- PHILLIPS, D., and V. ARLT. 2009. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* 1: 87–110.
- PRIETO, J., M. RECIO, R. GINER, S. MAÑEZ, E. GINER-LARZA, and J. RÍOS. 2003. Influence of traditional Chinese anti-inflammatory medicinal plants on leukocyte and platelet functions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 55: 1275–1282.
- PUERTAS, M., J. ZULETA, and F. RIVERA-ECHEVERRY. 2012. In vitro antioxidant capacity of comfrey (*Symphytum officinale* L.). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 17: 30–36.
- RASOOL, B. 2012. Pharmaceutica Medicinal Plants (Importance and Uses). 3: 4172.
- RÍOS, M., M. KOZIOL, H. BORGTOFT, and G. GRANDA. 2007. Useful Plants of Ecuador: Applications, challenges, and perspectives. Primera Ed. Ecuador.
- ROMERO, M., J. CAMPOS, A. MOHAMED, A. MUÑOZ, and Á. ALONSO. 2005. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 585: 147–155.
- SÁNCHEZ, A., G. FONSECA, N. CAPIRO, and D. FERNÁNDEZ. 2000. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de lantanas medicinales en Cuba. *Revista Cubana de Farmacia* 34: . Available at: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152000000100005&script=sci_arttext&tlng=pt.
- SANTOS, W. 2015. Estudio de factibilidad para la creación de una empresa dedicada a la producción y comercialización de infusiones y bebidas de horchata agroecológica a establecerse en el cantón Nabón. Universidad Politécnica Salesiana.
- SARASWATHI, J., K. VENKATESH, N. BABURAO, M. HAMEED, and A. ROJA. 2011. Phytopharmacological importance of *Pelargonium* species. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 2587–2598.
- SCHMIDT, C., M. FRONZA, M. GOETTERT, F. GELLER, S. LUIK, E.M.M. FLORES, C.F. BITTENCOURT, ET AL. 2009. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *Journal of Ethnopharmacology* 122: 523–532.
- SEGA, G.A. 1984. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 134: 113–142.
- SHIN, I.S., C.S. SEO, H.K. HA, M.Y. LEE, D.S. HUANG, J.I. HUH, and H.K. SHIN. 2011. Genotoxicity assessment of Pyungwi-san (PWS), a traditional herbal prescription. *Journal*

- of *Ethnopharmacology* 133: 696–703. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.050>.
- SIES, H. 2015. Oxidative stress : a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology* 4: 180–183. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>.
- SINGH, N., M. MCCOY, R. TICE, and E. SCHNEIDER. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research* 175: 184–191.
- SKALA, E., P. SITAREK, M. RÓZALSKI, U. KRAJEWSKA, J. SZEMRAJ, H. WYSOKINSKA, and T. SLIWINSKI. 2016. Antioxidant and DNA Repair Stimulating Effect of Extracts from Transformed and Normal Roots of *Rhaponticum carthamoides* against Induced Oxidative Stress and DNA Damage in CHO Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 11.
- SPONCHIADO, G., M.L. ADAM, C.D. SILVA, B. SILVA SOLEY, C. DE MELLO-SAMPAYO, D.A. CABRINI, C.J. CORRER, and M.F. OTUKI. 2016. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *Journal of Ethnopharmacology* 178: 289–296. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.026>.
- STUESSY, T., and M. ONO. 2007. Evolution and Speciation of Island Plants. Available at: https://books.google.com.ec/books?id=am8GHzjuSIC&dq=quercetin+onagraceae+fuchsia&hl=es&source=gbs_navlinks_s.
- TICE, R., E. AGURELL, D. ANDERSON, B. BURLINSON, A. HARTMANN, H. KOBAYASHI, Y. MIYAMAE, ET AL. 2000. Single Cell Gel / Comet Assay : Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 206–221.
- TINITANA, F. 2014. “Composición florística y etnobotánica de las diferentes formaciones vegetales de la provincia de Loja, Ecuador.” Universidad Politécnica de Madrid.
- TORRES, S., and J. RODRÍGUEZ. 2011. Estudio de pre-factibilidad para llevar a cabo la producción y comercialización de la bebida refrescante: Horchata, en la ciudad de Loja. Universidad del Azuay.
- TRENAM, C., D. BLAKE, and C. MORRIS. 1992. Skin Inflammation: Reactive Oxygen Species and the Role of Iron. *The Journal of Investigate Dermatology* 99: 675. Available at: http://ac.els-cdn.com/S0022202X9290619F/1-s2.0-S0022202X9290619F-main.pdf?_tid=4e662bf2-3cef-11e6-87d9-00000aacb35f&acdnat=1467091099_ea7490c54ee64a041e64934159183133.
- UMANG, S. 2012. Importance of Genotoxicity & S2A guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 1: 43–54.
- UMASHANKER, M., and S. SHRUTI. 2011. Traditional Indian Herbal Medicine used as Antipyretic, Antiulcer, Anti-diabetic and Anticancer: A review. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry* 1: 1152–1159.
- VARGAS, V.M.F., R.R. GUIDOBONOT, and J.A.P. HENRIQUES. 1991. Genotoxicity of plant extracts. 86: 67–70.
- WILEY, J. 1998. Basic Techniques for Mammalian Cell. *In Current Protocols in Cell Biology*, 1–10.
- WISEMAN, H., and B. HALLIWELL. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemistry Journal* 29: 17–29.
- XU, X., H. NAGARAJAN, N.E. LEWIS, S. PAN, Z. CAI, X. LIU, W. CHEN, ET AL. 2011. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nature biotechnology* 29: 735–741. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1932>.

ANEXOS

Tabla 1. Especies vegetales utilizadas en la elaboración de las 9 horchatas estudiadas de los tres distintos mercados de la ciudad de Loja.

Familia	Especie	Nombre común	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Propiedades medicinales	Estructura morfológica utilizada	Referencia
			MM	CC	FLGC	FLGC	CC	MM	MM	CC	FLGC			
Adoxaceae	<i>Sambucus nigra</i> L.	Tilo	6.4	0.0	3.8	2.6	0.0	4.7	0.0	0.6	0.0	Nervios, tos, bronquitis, resfrío	Flor, hojas y tallo	(Cerón, 2006) (Ríos et al., 2007)
Amaranthaceae	<i>Amaranthus hybridus</i> L.	Ataco	0.0	5.3	5.7	0.0	0.0	4.2	0.0	11.1	19.7	Nervios, regula la menstruación, limpia la sangre	Inflorescencia	(Santos, 2015) (Tinitana, 2014)
Amaranthaceae	<i>Iresine herbstii</i> Hook.	Escancel	13.2	11.2	8.5	14.7	7.3	33.3	11.3	23.1	12.2	Analgésico, diurético, tonificante	Hojas	(Carrión, 2012) (Tinitana, 2014)
Apiaceae	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Hinojo	0.0	4.4	0.0	0.0	2.9	2.0	6.4	0.0	0.0	Anti-inflamatorio, estomacal	Hojas	(Cerón, 2006) (Tinitana, 2014)
Asteraceae	<i>Matricaria recutita</i> L.	Manzanilla	3.2	0.0	4.7	6.4	6.5	2.0	0.0	0.8	2.6	Anti-inflamatorio, irritación de ojos, estomacal	Planta	(Cerón, 2006) (Ríos et al., 2007)
Boraginaceae	<i>Borago officinalis</i> L.	Borraja	0.0	0.0	12.3	11.3	5.1	18.8	0.0	5.9	41.2	Tos, circulación, gripe, fiebre	Hojas	(Cerón, 2006) (Tinitana, 2014)
Boraginaceae	<i>Symphytum officinale</i> L.	Consuelda	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	Cicatrizante, dolor de articulaciones, músculos, menstruación	Hojas	(Puertas et al., 2012)

Brassicaceae	<i>Matthiola incana</i> (L.) R. Br.	Alhelí	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	0.0	0.0	Diurético, espectorante, estomacal, estimulante	Flor	(Lim, 2013) (Tinitana, 2014)
Cariophyllaceae	<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Clavel	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.3	0.0	0.0	Anti-tusígeno, calmante	Planta	(Carrión, 2012) (Ríos et al., 2007)
Equisetaceae	<i>Equisetum bogotense</i> Kunth	Cola de caballo	6.4	5.9	6.6	5.3	0.0	0.0	1.2	0.9	0.0	Anti-inflamatorio, circulación	Tallo y hojas	(Cerón, 2006) (Carrión, 2012)
Equisetaceae	<i>Equisetum giganteum</i> L.	Cola de caballo	0.0	0.0	0.0	0.0	7.3	0.0	0.0	0.0	0.0	Afecciones del hígado, riñones, sistema inmunitario, diurético, anti-inflamatorio	Hojas, tallo	(Santos, 2015) (Ríos et al., 2007)
Geraniaceae	<i>Pelargonium odoratissimum</i> L.	Esencia de rosa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	4.1	0.0	0.0	Tonificante	Ramas	(Carrión, 2012) (Tinitana, 2014)
Geraniaceae	<i>Pelargonium graveolens</i> L'Hér. ex Aiton.	Malva olorosa (grande)	15.7	5.7	15.1	4.0	8.9	5.3	7.1	16.3	7.2	Tonificante	Hojas	(Carrión, 2012) (Tinitana, 2014)
Lamiaceae	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Albahaca blanca	0.0	6.3	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	Antimicrobiano, antioxidante	Hojas, flor, semilla	(Ríos et al., 2007)
Lamiaceae	<i>Ocimum campechianum</i> Mill.	Albahaca negra	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	Gripe, fiebre, estomacal, reumatismo, epilepsia	Hojas	(Amílcar, 2015) (Ríos et al., 2007)
Lamiaceae	<i>Mentha spicata</i> L.	Menta, hierba buena (pubescente)	0.0	0.0	7.5	4.7	4.5	1.3	0.0	0.6	1.5	Estomacal, cólicos, calambres, tranquilizante	Hojas	(Santos, 2015)

Lamiaceae	<i>Mentha x piperita</i> L.	Menta, menta negra (casa)	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	0.7	2.6	0.0	1.8	Anti-inflamatorio, antiflatulencia, digestivo	Hojas y tallo	(Carrión, 2012) (Ríos et al., 2007)
Lamiaceae	<i>Melissa officinalis</i> L.	Toronjil	4.5	12.2	8.5	0.0	0.0	1.7	0.0	0.8	0.0	Hemorragias, nervios, estomacal, corazón	Hojas	(Cerón, 2006) (Ríos et al., 2007; Tinitana, 2014)
Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i> L.	Linaza	0.0	3.3	0.0	0.0	8.6	2.0	7.3	0.0	3.5	Diurético, anti-inflamatorio	Semilla	(Carrión, 2012) (Ríos et al., 2007)
Malvaceae	<i>Lavatera arborea</i> L.	Malva blanca grande	14.7	12.5	11.3	0.0	14.5	13.6	0.0	9.1	5.8	Anti-inflamatorio, cáncer	Corteza y hojas	(Cerón, 2006) (Tinitana, 2014)
Malvaceae	<i>Malva parviflora</i> L.	Malva coche rosada	0.0	0.0	2.8	20.6	0.0	0.8	16.6	0.0	0.0	Heridas, anti-inflamatorio	Corteza, hojas, flor y ramas	(Bouriche et al., 2016) (Tinitana, 2014)
Onagraceae	<i>Fuchsia magellanica</i> Lam.	Pena pena blanca morada simple	1.9	1.7	0.0	2.6	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	Diurético	Flor	(Tinitana, 2014)
Onagraceae	<i>Fuchsia hypoleuca</i> Hort.	Pena pena blanca rosada	4.0	4.4	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0	0.0	Diurético	Flor	(Tinitana, 2014)
Onagraceae	<i>Fuchsia hybrida</i> Hort.	Pena pena grande	0.0	0.0	0.0	0.0	8.3	0.0	0.8	0.0	0.0	Calmante, tonificante ¹ y diurético	Flor	(Carrión, 2012; Tinitana, 2014) (Tinitana, 2014)
Onagraceae	<i>Oenothera rosea</i> L'Her. ex Aiton.	Shullo	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	0.0	0.0	Anti-inflamatorio, diurético, febrífugo	Tallo, flor y hojas	(Carrión, 2012)
Piperaceae	<i>Peperomia inaequalifolia</i> Ruiz & Pav.	Congona grande	0.0	0.0	0.0	10.9	0.0	0.0	7.7	0.0	0.0	Insomnio, antiparasitario, dolor de oído, anti-inflamatorio	Hojas, flor y tallo	(Cerón, 2006) (Carrión, 2012)

Plantaginaceae	<i>Plantago major</i> L.	Llantén	5.3	12.2	7.5	8.9	10.8	2.0	9.3	6.7	0.0	Anti-inflamatorio, cicatrizante, diurético	Planta	(Carrión, 2012) (Carrión, 2012; Tinitana, 2014)
Poaceae	<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf	Hierba luisa	5.1	0.0	5.7	2.6	6.8	0.0	7.3	9.9	1.2	Nervios, presión, anti-inflamatorio	Hojas	(Cerón, 2006) (Ríos et al., 2007)
Proteaceae	<i>Oreocallis grandiflora</i> (Lam.) R.Br.	Cucharillo	0.0	0.0	0.0	5.5	0.0	0.0	0.0	2.3	0.0	Previene consecuencias de diabetes avanzada	Inflorescencia	(Fernández and Viracucha, 2014) (Tinitana, 2014)
Rosaceae	<i>Rosa canina</i> L.	Rosa simple rosada blanca	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	Gripe. fiebre, tónico, estomacal	Flor	(IUCN, 2005)
Solanaceae	<i>Solanum americanum</i> Mill.	Mortiño	3.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	Sistema respiratorio	Ramas	(Tinitana, 2014)
Tiliaceae	<i>Triumfetta althaeoides</i> Lam.	Cadillo	10.0	9.2	0.0	0.0	0.0	3.3	7.7	10.5	0.0	Astringente, diurético	Flor, hojas y tallo	(Carrión, 2012)
Verbenaceae	<i>Aloysia triphylla</i> (L'Her.) Britton	Cedrón	0.0	5.7	0.0	0.0	0.0	1.3	0.0	1.4	2.3	Presión, nervios, estomacal, anti-inflamatorio	Ramas	(Cerón, 2006) (Tinitana, 2014)

Fuente: Autor

MM: Mercado Mayorista

CC: Centro Comercial

FLGC: Feria Libre Gran Colombia