



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD DE EXTRACTOS DE *Aloe vera* (L.)
Burm. f. EN MERISTEMAS RADICALES DE *Allium cepa* L.
(Modalidad: Tesis de grado)

RISMAINY DEL VALLE MILLÁN SOTO

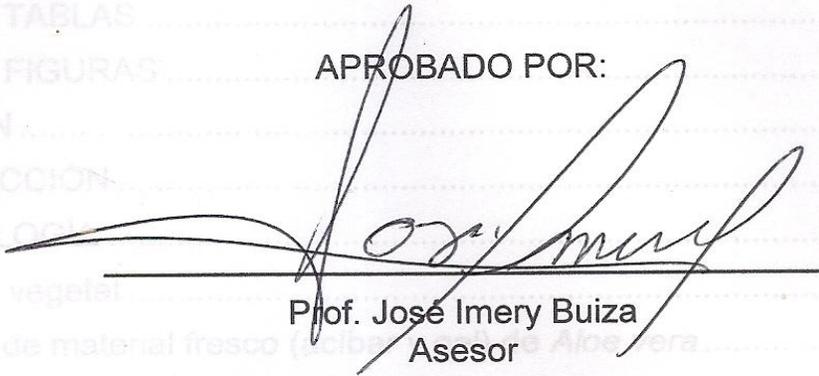
TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CUMANÁ, 2018

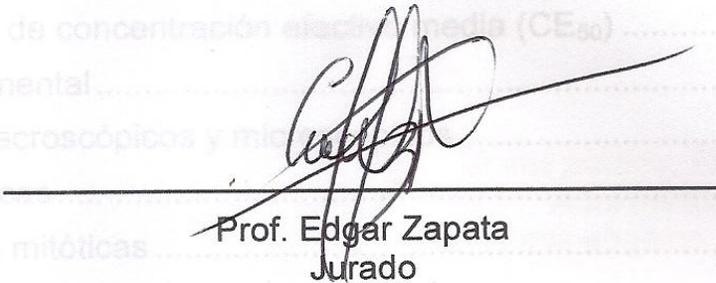
GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD DE EXTRACTOS DE *Aloe vera* (L.)
Burm. f. EN MERISTEMAS RADICALES DE *Allium cepa* L.

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
LISTA DE TABLAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMEN	IX
INTRODUCCION	1
METODOLOGIA	9
Material vegetal	9
Colecta de material fresco (<i>Allium cepa</i> L.)	10
Estimacion de la dosis de acibar fresco	11
Pretratamiento de los bulbos de <i>A. cepa</i>	11
Determinación de concentración efectiva media (CE ₅₀)	12
Diseño experimental	13
Parámetros macroscópicos y microscópicos	14
Fases mitóticas	14
Alteraciones mitóticas	15
Alteraciones en cromosomas somáticos	16
Análisis estadístico	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
CONCLUSIONES	71
RECOMENDACIONES	73
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	74
HOJA DE METADATOS	79

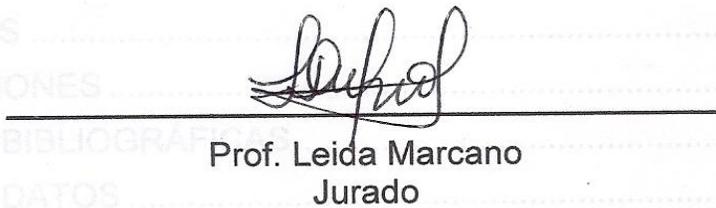
APROBADO POR:



Prof. José Imery Buiza
Asesor



Prof. Edgar Zapata
Jurado



Prof. Leida Marcano
Jurado

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS	II
LISTA DE TABLAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMEN	IX
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	9
Material vegetal	9
Colecta de material fresco (acíbar y gel) de <i>Aloe vera</i>	10
Estimación de la dosis de acíbar fresco	11
Pretratamiento de los bulbos de <i>A. cepa</i>	11
Determinación de concentración efectiva media (CE ₅₀)	12
Diseño experimental	13
Parámetros macroscópicos y microscópicos.....	14
Fases mitóticas	14
Alteraciones mitóticas	15
Alteraciones en cromosomas somáticos.....	16
Análisis estadístico	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
CONCLUSIONES	71
RECOMENDACIONES	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
HOJA DE METADATOS	79

DEDICATORIA

*A mis padres, Richard y Amarilys
A mi hermano Richard José
A mis abuelos Lucas y Edelmira*

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a San Miguel Arcángel.

A mi asesor y padre académico José Imery Buiza por su dureza cuando fue necesario, sus innumerables consejos, infinitas y arduas explicaciones, su tiempo, atenciones y su valiosa amistad. Gracias por prepararme ante la vida profesional.

A mis padres Richard, Amarilys y a mi hermano Richard José por todo su apoyo, darme fuerzas cuando sentí que no podía y dar más de lo que podían darme. Este logro es para ustedes ¡Los amo!

A Eduardo Gómez, por todo su apoyo y estar cada vez que lo necesité. Gracias por recordarme que vale la pena luchar por lo que tanto deseamos, hoy comparto éste logro contigo.

A mis abuelos Lucas y Edelmira que aún teniendo ideales profesionales distintos para mí, respetaron mis decisiones y las apoyaron convirtiéndose finalmente en los mejores cómplices.

A mis hermanos de vida Cruz E. Soto, José Rojas, Arturo Ortiz y Francisco Salazar por su apoyo incondicional y consejos. Gracias por creer en mí.

A la familia Rojas Figueroa y Ortiz Figueroa, especialmente a Elizabeth y Ninfa por su apoyo incondicional.

A Gilberto Enrique Gómez y a Eneida Ortiz de Gómez, gracias por todo y por tanto.

A mi amiga, compañera de laboratorio y hermana Amarilis Andrade, por estar las veces que la he necesitado, creer en mí, apoyarme en mis locuras y ser más que mi mejor amiga.

A la Prof. María Iabichella por convertirse en una madre académica, gracias por sus consejos llenos de cariño y su enorme ayuda a lo largo de mi carrera.

A Wendy Ozols por acogerme en su seno familiar, cuidar de mí las veces que fue necesario y ser una madre/amiga dentro y fuera de la Universidad. Gracias infinitas por estar siempre.

A mis amigos y compañeros: Marianny Malavé, Nellys Andrade, Cindy, Nelmit, Carmen Cecilia, Manuel A., Rafael, Rolando, Lederle, Leidy, Yanecy y Orangel por todo el apoyo que pudieron brindarme y su cariño fraterno.

A los profesores: Víctor Franco, Elena Marcano, Fanny Medina, Rossana Valerio, Saraí Acuña y Patricia Velásquez por cada conocimiento impartido, sus consejos y principalmente, su amistad.

A la Universidad de Oriente, por haberme formado y convertirse en mí segundo hogar.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diferencial de masa por solubilización del acíbar de <i>Aloe vera</i> en muestras frescas y en los laxantes naturistas “producto 1” y “producto 2”.	18
Tabla 2. Frecuencia de alteraciones citológicas halladas en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a distintas concentraciones de extractos de <i>Aloe vera</i> por tres periodos de tiempo (24, 48 y 72 h).	35
Tabla 3. Frecuencia de anomalías mitóticas halladas en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a distintas concentraciones de extractos de <i>Aloe vera</i> por tres periodos de tiempo (24, 48 y 72 h).	47
Tabla 4. Alteraciones mitóticas y celulares halladas en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> tratadas con seis concentraciones de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	61
Tabla 5. Alteraciones mitóticas y celulares halladas en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> tratadas sometidas a concentraciones altas de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Productos naturistas a base de acíbar deshidratado de *Aloe vera*, seleccionados para esta investigación..... 9
- Figura 2. Corte transversal de la roseta foliar de *Aloe vera* por encima del ápice caulinar para la extracción del acíbar fresco, siguiendo el procedimiento artesanal realizado por la industria productora de este recurso..... 10
- Figura 3. Ensayo preliminar para estimar la CE₅₀ de los productos naturistas a base de acíbar deshidratado de *Aloe vera*. 12
- Figura 4. Batería de tratamientos con extractos de *Aloe vera* sobre meristemas radicales de *Allium cepa* (segundo ensayo)..... 14
- Figura 5. Concentración efectiva media (CE₅₀) de los extractos deshidratados de *Aloe vera* presentes en los productos naturistas a base de acíbar deshidratado determinadas sobre el sistema radical de *Allium cepa*. 17
- Figura 6. Extracto naturista “producto 2” visto bajo microscopio estereoscópico. Las flechas indican partículas fibrosas y los asteriscos (*) los conglomerados de acíbar deshidratado.. 19
- Figura 7. Longitud (cm) de raíces de *Allium cepa* sometidas a distintas concentraciones de un producto comercial de *Aloe vera* “producto 1” por tres periodos de tiempo (24, 48 y 72 h)..... 20
- Figura 8. Longitud (cm) de raíces de *Allium cepa* sometidas a distintas concentraciones de un producto comercial de *Aloe vera* “producto 2” por tres periodos de tiempo (24, 48 y 72 h)..... 21
- Figura 9. Longitud (cm) de raíces de *Allium cepa* sometidas a distintas concentraciones de gel de *Aloe vera* por tres periodos de tiempo (24, 48 y 72 h)..... 21
- Figura 10. Raíces de *Allium cepa* sometidas a soluciones del producto naturista 1 durante 48 h..... 24
- Figura 11. Meristemas radicales tratados con el producto 1 al 200 % durante 72 h.. . 25
- Figura 12. Raíces de *Allium cepa* sometidas a distintas concentraciones del producto naturista 2 al cabo de 48 h..... 25
- Figura 13. Estado de meristemas radicales sin ser sometidos a los extractos de *Aloe vera* (tratamiento control). 26
- Figura 14. Raíces de *Allium cepa* tratadas con soluciones de gel de *Aloe vera* al transcurrir 72 h de exposición.. 26
- Figura 15. Células meristemáticas de raíces de *Allium cepa* sometidas a condiciones experimentales normales (H₂Od – tratamiento control).. 28

Figura 16. Áreas celulares en meristemas de <i>Allium cepa</i> sometidos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición a extractos de <i>Aloe vera</i> ..	29
Figura 17. Áreas nucleares en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición a extractos de <i>Aloe vera</i> ..	30
Figura 18. Áreas citoplasmáticas en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición a extractos de <i>Aloe vera</i>	30
Figura 19. Citoplasmas voluminosos en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas por 24 h a productos naturistas a base de acíbar deshidratado de <i>Aloe vera</i>	31
Figura 20. Alteraciones citológicas en meristemas radicales de <i>Allium cepa</i> sometidos por 24 h a extractos de <i>Aloe vera</i> ..	32
Figura 21. Alteraciones citológicas en meristemas de <i>Allium cepa</i> sometidas por 24 h a extractos de <i>Aloe vera</i> ..	32
Figura 22. Alteraciones citológicas en meristemas de <i>Allium cepa</i> sometidas por 48 h a extractos de <i>Aloe vera</i> ..	32
Figura 23. Alteraciones citológicas en meristemas radicales de <i>Allium cepa</i> sometidos por 72 h a extractos de <i>Aloe vera</i> ..	33
Figura 24. Citoplasmas contraídos en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas por 72 h a extractos de <i>Aloe vera</i>	33
Figura 25. Células mitóticas en meristemas radicales de <i>Allium cepa</i> sometidos a condiciones experimentales normales (H ₂ O _d – tratamiento control).....	36
Figura 26. Índice mitótico en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición a extractos de <i>Aloe vera</i> ..	37
Figura 27. Índice de profase en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición a extractos de <i>Aloe vera</i> ..	38
Figura 28. Índice de metafase en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones de extractos de <i>Aloe vera</i>	38
Figura 29. Índice de anafase en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones de extractos de <i>Aloe vera</i>	39
Figura 30. Índice de anafase en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes tiempos de exposición a extractos de <i>Aloe vera</i> ..	39
Figura 31. Índice de telofase en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición a extractos de <i>Aloe vera</i> ..	40
Figura 32. Anormalidades mitóticas más frecuentes en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a un extracto de <i>Aloe vera</i> (producto naturista 1) a una concentración de 50 % respecto a la CE ₅₀ a las 24 h de exposición.....	41

Figura 33. Anormalidades mitóticas en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a un extracto de <i>Aloe vera</i> (producto naturista 1) a una concentración de 25 % respecto a la CE ₅₀ a las 24 h..	42
Figura 34. Anormalidades mitóticas de baja frecuencia en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a dos productos naturistas de <i>Aloe vera</i> por 24 h..	42
Figura 35. Anormalidades mitóticas más frecuentes en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a extractos de <i>Aloe vera</i> a las 48 h de exposición..	43
Figura 36. Cromosomas rezagados en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a extractos de <i>Aloe vera</i> por 48 h de exposición..	43
Figura 37. Anormalidades mitóticas en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a extractos de <i>Aloe vera</i> por 48 h de exposición..	44
Figura 38. Anafases alteradas en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a extractos de <i>Aloe vera</i> por 48 h de exposición.....	44
Figura 39. Anormalidades mitóticas en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a extractos de <i>Aloe vera</i> por 48 h de exposición..	45
Figura 40. C-metáfase en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas al producto naturista 1 al 200 % de la CE ₅₀ por 72 h de exposición.	45
Figura 41. C-metáfases en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a extractos de <i>Aloe vera</i> por 72 h..	46
Figura 42. Cariotipo de <i>Allium cepa</i> bajo condiciones experimentales normales (control negativo - H ₂ O _d)..	50
Figura 43. Cariotipo de <i>Allium cepa</i> una vez que los meristemas radicales fueron expuestos al extracto correspondiente al producto naturista 1 al 25% por 24 h de exposición..	51
Figura 44. Cromosomas de <i>Allium cepa</i> provenientes de meristemas radicales sometidos al producto naturista 1 al 50 % de la CE ₅₀	52
Figura 45. Cromosomas de <i>Allium cepa</i> provenientes de meristemas radicales sometidos al producto comercial 2 al 25%.....	52
Figura 46. Cromosomas de <i>Allium cepa</i> en células meristemáticas sometidas al producto comercial 2 al 25 % de la CE ₅₀ por 72 h..	53
Figura 47. Cromosomas de <i>Allium cepa</i> en células meristemáticas sometidas al producto comercial 2 al 50 % de la CE ₅₀ por 72 h..	54
Figura 48. Células colchinizadas de meristemas radicales de <i>Allium cepa</i> sometidas a gel de <i>Aloe vera</i> al 25 % de su CE ₅₀ por 72 h.....	55
Figura 49. Cromosomas de <i>Allium cepa</i> cuyos meristemas radicales fueron sometidos a gel de <i>Aloe vera</i> al 50 % de su CE ₅₀ por 72 h.....	55

Figura 50. Índice mitótico en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas por 48 h a diferentes concentraciones de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	57
Figura 51. Índice de profase en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	57
Figura 52. Índice de metafase en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	58
Figura 53. Índice de anafase en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	58
Figura 54. Índice de telofase en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	59
Figura 55. Áreas celulares en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	60
Figura 56. Áreas nucleares en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	60
Figura 57. Áreas citoplasmáticas en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	61
Figura 58. Citoplasmas contraídos en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a distintas concentraciones de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	62
Figura 59. Alteraciones con menor frecuencia en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a distintas concentraciones de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	62
Figura 60. Índice mitótico en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a concentraciones altas de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	63
Figura 61. Índice de profase en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones altas de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	64
Figura 62. Índice de metafase en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones altas de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	64
Figura 63. Índice de anafase en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones altas de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	65
Figura 64. Índice de telofase en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones altas de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	65
Figura 65. Áreas celulares en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones altas de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	66
Figura 66. Áreas nucleares en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones altas de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i>	67
Figura 67. Áreas citoplasmáticas en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> sometidas a diferentes concentraciones altas de acíbar fresco de <i>Aloe vera</i> . s.	67

- Figura 68. Citoplasmas contraídos en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a cinco concentraciones altas de acíbar fresco de *Aloe vera*. 68
- Figura 69. Alteraciones generadas en células meristemáticas de *Allium cepa* al ser sometidas a cinco concentraciones altas de acíbar fresco de *Aloe vera*. 69

RESUMEN

Las plantas medicinales han influido en culturas y pueblos de todo el mundo, en algunos casos con la sobreutilización de productos vegetales, lo cual fomenta la realización de ensayos de toxicidad para corroborar las consecuencias que pueden generar sobre un organismo vivo. En este sentido, la presente investigación evaluó los posibles efectos genotóxicos y citotóxicos de *Aloe vera* mediante el test de *Allium cepa*. Se realizó un ensayo previo para determinar la concentración de dos productos naturistas a base de acíbar deshidratado de *A. vera* que generó una disminución del 50 % en la longitud radical de *A. cepa* (CE₅₀) y para el gel de esta planta medicinal se tomó la CE₅₀ sugerida por Ilbas *et al.* (2012) de 20 % v/v. Se establecieron tres concentraciones de estudio: alta (200 % CE₅₀), media (50 % CE₅₀) y baja (25 % CE₅₀) durante tres tiempos de exposición (24, 48 y 72 h) en donde se evaluaron: longitud, color y forma de la raíz y parámetros microscópicos: índice mitótico, índices de fases y posibles alteraciones en el número y estructura de los cromosomas. A pesar de que se registraron diferentes efectos, muchos de estos fueron determinados en bajas frecuencias, por lo cual, fue necesaria la realización de dos ensayos exploratorios en donde se evaluaron los efectos del acíbar fresco de esta planta (exudado principal del contenido de los productos naturistas) a concentraciones de (0, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/l) y (0, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/l) por 48 h cada uno. Se emplearon bulbos uniformes de *A. cepa* (cebolla blanca), previamente enraizados por 72 h en agua destilada y luego sometidos a las sustancias experimentales de *A. vera*: gel fresco, acíbar deshidratado contenido en dos productos naturistas (“producto 1” y “producto 2”) y acíbar fresco. Durante el segundo ensayo, se visualizaron cambios en el color de las raíces y alteraciones de longitud al cabo de 48 y 72 h. Mediante la evaluación microscópica se observó que los efectos sobre el índice mitótico no llegan a ser significativos; sin embargo, sí se generan cambios sobre los índices de fases, ralentizando el proceso de división con un marcado desplazamiento hacia profase. Asimismo, los tratamientos con *A. vera* afectan significativamente la morfometría celular y nuclear en interfase, siendo los citoplasmas voluminosos los más frecuentes. Las alteraciones mitóticas presentadas con mayor frecuencia fueron las C-metafases, micronúcleos y anafases alteradas. El cariotipo de *A. cepa* no fue afectado en el número cromosómico, pero sí fue observada cierta pegajosidad en los mismos. Al evaluar el acíbar fresco en los ensayos exploratorios se hallaron alteraciones celulares y mitóticas que involucraban tanto el índice mitótico y de fases, así como ciertas perturbaciones como citoplasmas contraídos, núcleos amorfos y efectos clastogénicos, aunque en baja frecuencia. A pesar que *A. vera* es una de las plantas medicinales con mayor utilidad en el mundo, el uso de sus componentes principales (gel y acíbar) debe de ser moderado, mediante los resultados obtenidos se puede mencionar, que un consumo excesivo puede acarrear severas consecuencias, por lo cual se sugiere la toma de precauciones y consulta de la información requerida para consumir dichos productos de forma adecuada.

Palabras claves: CE₅₀, genotoxicidad, citotoxicidad, *Aloe vera*, *Allium cepa*, meristemas radicales.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de sustancias tóxicas posee sus orígenes desde la prehistoria, donde el hombre primitivo implementaba diferentes extractos para actividades rutinarias como la caza, garantizando su supervivencia en la naturaleza (Andrioli, 2011). Estas actividades condujeron al conocimiento básico de propiedades de extractos que podían ser perjudiciales o benéficos, corroborándose así el empleo de productos vegetales como los primeros componentes tóxicos manipulados (Repetto y Repetto, 2009).

Durante años, el uso de plantas y sus propiedades farmacológicas han jugado un papel esencial en culturas y pueblos a lo largo de todo el territorio nacional e internacional, siendo la base terapéutica en el tratado de diferentes afecciones de salud, constituyendo a veces el único recurso de carácter medicinal (Vizoso *et al.*, 2000; Sturbelle *et al.*, 2010).

Los ingredientes activos presentes en las plantas han sido empleados como materia prima para la elaboración de muchos productos, principalmente de carácter terapéutico. El empleo de estas mezclas complejas en las que también pueden estar presentes compuestos mutagénicos capaces de desencadenar efectos carcinogénicos y teratogénicos debe venir acompañado por previos estudios de toxicidad como requisito fundamental para su posterior comercialización y consumo humano (Vizoso *et al.*, 2000; Muñoz y Guerrero, 2012).

A partir de las investigaciones de Müller sobre mutaciones causadas por rayos X en *Drosophila* en el año 1927, surgió una amplitud de experimentos que se basaron en estudiar la acción de agentes mutagénicos, los cuales han permitido el desarrollo de una disciplina científica conocida como genética toxicológica, que indaga sobre el estudio de los posibles efectos genotóxicos que pueden causar muchas sustancias de origen vegetal. En 1962, Joshua Lederberg propuso la realización de ensayos que permitieron determinar los posibles riesgos mutagénicos de sustancias químicas al entrar en contacto con

algún organismo, esta idea fue adoptada como doctrina en muchos países, conllevando a la necesidad de instaurar ensayos vinculados sobre la evaluación mutagénica además de los ya establecidos para la fecha (Andrioli, 2011).

La genotoxicología fue reconocida como ciencia en el año 1969, siendo una erudición transdisciplinaria, se utiliza un vocablo de carácter genético y también incorpora términos de toxicología; sin embargo, existe cierto acoplamiento o fusión entre ambas áreas de estudios, lo cual ha permitido la obtención de resultados más amplios que aquellos alcanzados como ciencia unitaria (Paz y Miño *et al.*, 2001).

Los ensayos toxicológicos para evaluar los distintos efectos de extractos naturales, sintéticos, componentes presentes en el suelo y agua incluyen sistemas a corto plazo, dentro de los cuales se pueden destacar: inducción de segregación mitótica en el hongo *Aspergillus nidulans* D-30, ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón (Vizoso *et al.*, 2000), prueba de micronúcleos en *Vicia faba* (Olivares *et al.*, 2015), ensayo de inhibición de la luminiscencia en *Vibrio fischeri*, ensayo de *Tradescantia* sp, ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna* S. (De la Peña y Herrero, 2005), ensayo de toxicidad aguda con *V. fischeri*, ensayo de mutagenicidad con *Salmonella typhimurium*, ensayo de genotoxicidad con la lombriz de tierra *Eisenia andrei* (Cuevas *et al.*, 2008; Pica y Trujillo, 2008; Sandoval, 2008), entre otros.

En la evaluación directa en seres vivos se utiliza generalmente a roedores como unidades modelos debido a su cercanía taxonómica con el ser humano (Andrioli, 2011); no obstante, estudios recientes reconocen a algunas plantas superiores como modelos genéticos fiables para determinar compuestos con potencial tóxico (Valencia *et al.*, 2013). Entre las especies vegetales ampliamente utilizadas en pruebas de toxicidad se pueden mencionar: *Lactuca sativa* L. (lechuga), *Tradescantia* sp (cucarachita) (De la Peña y Herrero, 2005), *Vicia faba* (haba), *Allium cepa* (cebolla blanca) (Valencia *et al.*, 2013), entre otras.

A. cepa, es una planta herbácea perteneciente a la familia Liliaceae, con 16 cromosomas somáticos ($2n=2x=16$) de gran tamaño y muy simétricos (Mesi y Kopliku, 2011; Sharma y Vig, 2012). Es una planta de origen asiático, cuya propagación se extendió a Europa y finalmente a América; este organismo ha sido utilizado desde épocas remotas en la dieta y costumbres culinarias, e incluso, en la medicina alternativa dada sus propiedades. Del mismo modo, es una planta formadora de bulbos, los cuales pueden llegar a ser muy variados fenotípicamente, clasificándose principalmente por su color; no obstante, también pueden diferenciarse de acuerdo a su forma, usos, tamaño, entre otros (Rothman y Dondo, 2007).

La cebolla blanca es utilizada en un bioensayo de genotoxicidad conocido como “*Allium* Test” o “Test de *Allium cepa*”, aplicado por vez primera por Levan en 1938 para evaluar los efectos citotóxicos de la colchicina (Gohil y Kaul, 1983) y desde entonces se convirtió en un sistema estándar para determinar efectos mutagénicos y citotóxicos de una amplia gama de sustancias, este ensayo fue aprobado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 1997 (Cano *et al.*, 2002), lo cual ha conducido a la aplicación de este test en muchos centros de investigación y universidades (Andrioli, 2011).

Esta especie vegetal es lo suficientemente sensible, teniendo cierta correlación con los estudios realizados en mamíferos (Macedo *et al.*, 2012), además es un vegetal fácilmente manejable y de gran disposición para el montaje de los ensayos, resultando sencillo establecer un diseño experimental con dicha especie (Mesi y Kopliku, 2011).

Mediante el empleo de *A. cepa* como unidad experimental se pueden observar manifestaciones externas de daño tóxico a través de parámetros macroscópicos como la presencia, forma y el color de las raíces y la longitud que estas alcanzan sometidas a diferentes condiciones experimentales (Mesi y Kopliku, 2011). De igual manera, el test de *A. cepa* es una prueba biológica que puede ser fácilmente reproducible y aporta resultados fidedignos en cortos

periodos de tiempo (Andrioli, 2011).

Asimismo, se toman en consideración signos internos que finalmente ayudan a generar información de la inducción de alguna alteración a nivel celular, sobre el material genético y en el proceso mitótico (Muñoz y Guerrero, 2012). Esta evaluación microscópica viene dada por el índice mitótico, índices de fases, alteraciones en el proceso mitótico y en el cariotipo de la especie experimental (Mesi y Koplilu, 2011).

Por medio del índice mitótico (IM%) se puede examinar el efecto directo sobre la división celular somática. La inhibición de este aspecto microscópico (IM%), pone de manifiesto una respuesta genotóxica en el tejido de la especie vegetal (meristema radical) por el ambiente creado, siendo sinónimo de un incremento en el tiempo de duración de la interfase, dicha evaluación debe sustentarse a través del estudio de los índices en cada una de las fases mitóticas: profase, metafase, anafase y telofase (Andrioli, 2011). De igual manera, puede existir una correlación entre la longitud que alcanza la raíz al culminar el tiempo de exposición con respecto a los valores obtenidos en el índice mitótico, aunque no siempre se genera este efecto (Sharma y Vig, 2012).

La obtención y posterior análisis de los índices de fases para cada uno de los contextos experimentales puede evidenciar retrasos en la maquinaria mitótica en comparación al control, lo cual en estadios como anafase, la dinámica de polimerización de las fibras del huso pueden verse notoriamente afectadas por la exposición a sustancias mutagénicas (Andrioli, 2011).

Alteraciones a nivel del material genético puede conducir a manifestaciones citológicas y, por consiguiente, a errores en la maquinaria mitótica que puede conllevar a la inducción de aberraciones cromosómicas, destacándose dentro de estas: micronúcleos, puentes anafásicos, deleciones, translocaciones, fragmentos, c-mitosis, alteraciones en el núcleo de las células meristemáticas interfásicas, entre otros (Berrocal *et al.*, 2013). Detectar cada uno de los cambios que puede generar una sustancia sobre la especie es de vital importancia, por este motivo, la realización de bioensayos toxicológicos

como el test de *A. cepa* se ha convertido en una alternativa rutinaria y concluyente de otras pruebas, e incluso, como ensayo unitario para determinar los niveles de toxicidad de un determinado producto.

A. cepa es considerado un excelente modelo *in vivo*, por lo cual se le ha conferido una mayor importancia en los últimos años, al ser una prueba en donde el tejido meristemático está en contacto directo con la sustancia de interés (que se desea evaluar) por un tiempo determinado. Esto ha permitido predecir los posibles riesgos que se pueden generar en el material genético de organismos eucariotas, por lo tanto, los resultados pueden ser extrapolados en animales y plantas (Bosio y Dail, 2012).

La aplicabilidad de este bioensayo es muy amplia, ha sido de utilidad para la evaluación de productos farmacológicos como la adriamicina (antibiótico), el metrodinazol (antiparasitario), en la industria de alimentos para examinar los efectos de edulcorantes, colorantes artificiales, conservantes, en estudios de monitoreo ambiental de suelos y aguas, también, en la evaluación de biocidas y productos naturales. En este sentido, Ilbas *et al.* (2012) evaluaron el gel de *Aloe vera* a diferentes concentraciones, obteniéndose una disminución en las longitudes de las raíces de *A. cepa* y en el índice mitótico a medida que la concentración de gel aumentaba. Sin embargo, Vizoso *et al.* (2000), estudiaron esta misma sustancia a concentraciones diferentes del trabajo anterior, aplicando dos ensayos: uno *in vivo* utilizando el modelo de *Aspergillus nidulans* D-30 y otro *in vitro* (ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón), y para efectos de su investigación no hallaron resultados que afirmen daño genético y celular.

A. vera es una planta perenne, monocotiledónea, incluida actualmente dentro de la familia Asphodelaceae, suculenta, nativa de la región entre el noreste de África y la península de Arabia, hallándose naturalizada en zonas tropicales y sub-tropicales de todo el mundo (Imery y Ozols, 2017). En América, fue introducida por los españoles y desde entonces su cultivo se ha propagado por varios países, desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Chile y

Argentina (Imery y Cárdenas, 2006).

Molero *et al.* (2013) señalan que en Venezuela dicha especie fue introducida directamente a la región peninsular y costera del estado Falcón, así como también, presumen que las primeras plantaciones comerciales de importancia tienen sus orígenes en el año 1870 y a partir de 1920 estas extendieron sus cultivos en esa zona. En la década de 1930, los cultivos de *A. vera* se expandieron a otras poblaciones del estado Falcón y de allí a los estados Lara y Zulia.

Las plantaciones de *A. vera* también se ubican en los estados Sucre y Anzoátegui, en esta área geográfica se reseña que llegó por vía marítima como consecuencia del intercambio comercial con las islas del Caribe (ICE, 1990). Desde ese tiempo, el *A. vera* ha sido explotado de manera artesanal por pequeñas corporaciones agroindustriales dedicadas a la extracción de acíbar y gel (Piña, 2004). En Venezuela, la producción de esta especie vegetal está principalmente dirigida a la elaboración de productos naturistas, cosméticos y bebidas nutracéuticas en pequeñas empresas nacionales; y en mayor escala, la materia prima estabilizada y conservada se exporta a corporaciones transnacionales en EE.UU., Francia, Alemania y Japón (Imery y Ozols, 2017).

El mucílago contenido en el hidroparénquima de las hojas de *A. vera* ha sido blanco de estudios debido a sus diversas propiedades. Vizoso *et al.* (2000) señalan que a este gel y, por tanto, a muchos de sus productos derivados se le ha comprobado propiedades antivirales, gastro-protectoras (Sturbelle *et al.*, 2010; Domínguez *et al.*, 2012), cicatrizantes (Chithra *et al.*, 1998), antiinflamatorias, inmunomoduladoras (Reynolds y Dweck, 1999; Strubelle *et al.*, 2010) entre otras; no obstante, diversos investigadores también le han conferido propiedades antivirales y antibacterianas al acíbar, que es otro de los componentes del *A. vera* (Domínguez *et al.*, 2012; Barnola, 2016).

El acíbar, es una sustancia de color amarillo, de sabor amargo, caracterizado por la presencia de constituyentes fenólicos como las cromonas y las antraquinonas (Domínguez *et al.*, 2012). La aloína es el principal

componente antraquinónico del acíbar que la planta secreta como mecanismo de defensa para alejar a los depredadores por su olor y sabor desagradable; sin embargo, también se pueden resaltar antraquinonas como la barboleína y emodina (Imery, 2007; Domínguez *et al.*, 2012). A estos compuestos orgánicos del acíbar se le han conferido propiedades estimulantes de secreciones estomacales y digestivas, generando un efecto catártico debido a que aceleran la motilidad intestinal. Su uso en altas concentraciones pueden provocar efectos laxantes, lo cual ha sido aprovechado en la industria para la elaboración de fármacos estimuladores del sistema digestivo, promoviendo la defecación (Barnola, 2016).

El acíbar de *A. vera* en altas proporciones pueden generar efectos significativamente tóxicos en el ser vivo debido a la acción de sus compuestos antraquinónicos (Cui *et al.*, 2008). En este sentido, Imery (2007) señaló los posibles efectos endogenotóxicos de las antraquinonas durante la formación de células madres del polen en plantas de *A. vera* cultivadas en regiones de baja disponibilidad de humedad edáfica, elevada temperatura y radiación solar, condiciones ambientales que propician la mayor concentración de estas sustancias.

Las sustancias que han sido confirmadas como laxantes de origen natural o sintético, deben ser utilizadas de forma moderada, pues el abuso de las mismas ha sido asociado, en algunos estudios, con parálisis intestinales, hemorroides, pérdida de la función intestinal, pancreatitis, desarrollo de tumores no cancerígenos y carcinogénesis (Herrera *et al.*, 2015).

A pesar de los avances científicos en el área toxicológica sobre diversos fármacos, productos alimenticios y extractos de plantas, la evaluación de la toxicidad en sus diferentes niveles que pueden generar los componentes de *A. vera* no ha sido ampliamente estudiada. La importancia de la evaluación profundizada en esta área sobre *A. vera* y sus componentes, radicó en que representa una de las plantas con mayor utilidad a nivel mundial, dado sus aportes en la salud humana. Del mismo modo, el desconocimiento por parte de

la población sobre las consecuencias que pueden desencadenarse por una sobreutilización de estos componentes naturales, promueve el estudio de los posibles efectos genotóxicos y citotóxicos de extractos *A. vera* (gel y acíbar) sobre atributos morfológicos y citogenéticos, empleando a la cebolla (*A. cepa*) como modelo. Por tal motivo, los resultados obtenidos brindan un soporte científico que contribuye, por ejemplo, a proyectar las concentraciones no perjudiciales para la salud humana.

METODOLOGÍA

Material vegetal

Esta investigación involucró a dos especies vegetales: la primera, sábila (*Aloe vera*) como fuente de extractos: gel, acíbar frescos y dos productos comerciales de cápsulas laxantes con acíbar deshidratado (Figura 1) para estudiar su posible toxicidad; y la segunda, cebolla blanca (*Allium cepa*) que se cultivó bajo condiciones *in vitro* como organismo modelo. El acíbar fresco se obtuvo de plantas naturalizadas en un bosque muy seco tropical de “Cerro Colorado”, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre; el gel fresco, provino de plantas cultivadas en el vivero del Laboratorio de Genética Vegetal, Departamento de Biología. Ambos grupos de *A. vera* se derivaron de una población naturalizada en el sector “Tras de la Vela”, península de Araya, conservada *ex situ* como material de estudio a partir del trabajo de Albornoz e Imery (2003).



Figura 1. Productos naturistas a base de acíbar deshidratado de *Aloe vera*, seleccionados para esta investigación.

Los dos productos laxantes fueron adquiridos en tiendas naturistas de la ciudad de Cumaná, ambas marcas seleccionadas por ser las de mayor distribución y consumo. Los bulbos de *A. cepa*, variedad “gran Texas 502” se obtuvieron en un comercio local y seleccionados según su buen estado fitosanitario, sin raíces activas, tamaño similar (4-5 cm de diámetro), siguiendo la metodología descrita por Fiskesjö (1985), con ciertas modificaciones descritas en la presente investigación.

Colecta de material fresco (acíbar y gel) de *Aloe vera*

El acíbar fresco fue extraído de plantas en condiciones de estrés hídrico, cortando transversalmente toda la roseta foliar de *A. vera* a 10 cm por encima del ápice caulinar, inmediatamente se colocaron las hojas dentro de un envase plástico limpio de 20 L para colectar el acíbar recién drenado. Esta colecta se realizó entre 5:00 y 6:00 a.m., según indicaciones técnicas de Piña (2004) (Figura 2).



Figura 2. Corte transversal de la roseta foliar de *Aloe vera* por encima del ápice caulinar para la extracción del acíbar fresco, siguiendo el procedimiento artesanal realizado por la industria productora de este recurso.

En el caso del gel, se seleccionaron plantas de tres o más años de cultivo en condiciones de vivero, se cortaron hojas enteras y basales con dimensiones mínimas de 60 cm de longitud, 10 cm de ancho y 2 cm de espesor, a fin de cumplir con las especificaciones requeridas por la agroindustria (Imery,

2012). Las hojas recién cortadas se colocaron verticalmente sobre una superficie plana con el corte hacia abajo para drenar la mayor cantidad de acíbar durante una hora. Seguidamente, a estas hojas se les fue removido todo el mesófilo con cuchillo de acero inoxidable y de esta manera se obtuvo el hidroparénquima, el cual fue sumergido en agua fría de 5 °C durante 24 h para diluir cualquier remanente de acíbar. El hidroparénquima se enjuagó con agua corriente por 3-5 segundos, se dejó escurrir y se homogenizó con licuadora doméstica a alta velocidad durante dos minutos en vaso de vidrio estéril para obtener una solución madre de gel. Finalmente, dicha solución fue filtrada al vacío con malla de nilón (diámetro de poro 180 μm).

Estimación de la dosis de acíbar fresco

El acíbar recién colectado fue filtrado y se le midió volumen y peso, se depositó en cápsulas de Petri y se deshidrató en una estufa marca Memmert a 50 °C por 48 h. Se pesó el polvo que quedó en el fondo de las cápsulas de Petri y con esta medición se estableció la relación entre el volumen de acíbar fresco y el acíbar deshidratado en el laboratorio. A partir de estos cálculos se determinó la relación equitativa de los tratamientos con el acíbar en polvo contenido en los dos productos comerciales. El cálculo de estas dosis se realizó con anterioridad al ensayo realizado para estimar la concentración efectiva media (CE_{50}); aquella que generó una disminución del 50 % en el crecimiento radical y del diseño experimental donde se establecieron concentraciones (baja, media y alta).

Pretratamiento de los bulbos de *A. cepa*

El pretratamiento de los bulbos de cebolla constó de la eliminación de catáfilas protectoras y raíces presentes. Posteriormente, estos bulbos fueron lavados con una solución de hipoclorito de sodio al 1 % v/v y luego se sometieron a agua corriente por un minuto para eliminar los remanentes de esta solución. Los bulbos desinfectados se colocaron por 48 a 72 h sobre frascos de vidrio con agua destilada, de este modo se humedeció ligeramente la zona

basal y se promovió el crecimiento radical. Una vez que las raíces se regeneraron y alcanzaron entre 1,0 - 1,5 cm de longitud, los bulbos se expusieron a las diferentes condiciones experimentales.

Determinación de concentración efectiva media (CE₅₀)

Para estimar la CE₅₀ fue necesaria la realización de un ensayo previo que permitió obtener, mediante la aplicación de la fórmula descrita por Berrocal *et al.* (2013), el coeficiente de inhibición a partir de los cuales luego se estimó gráficamente la CE₅₀ para los productos naturistas.

$$\text{Coeficiente de inhibición (\% CI)} = 100 \times (\text{Lc} - \text{Lt})/\text{Lc}$$

Donde:

Lc = Longitud de las raíces en el control (agua destilada).

Lt = Longitud del tratamiento (extractos de *A. vera*).

Para ello, 63 bulbos de *A. cepa* fueron sometidos inicialmente a un pretratamiento de enraizamiento por 72 h en envases de compota bajo condiciones de laboratorio (24 ± 2 °C, HR 82 %, fotoperiodo 12/12 con 5000 lux de luz natural indirecta) de los cuales sólo 36 fueron expuestos a los diferentes tratamientos (acíbar deshidratado de *A. vera*) a distintas concentraciones por triplicado y durante 48 h (Figura 3).



Figura 3. Ensayo preliminar para estimar la CE₅₀ de los productos naturistas a base de acíbar deshidratado de *Aloe vera*.

Las dosis estuvieron representadas por: 0; 100, 200; 300; 400 y 500 mg/l. Para el gel de *A. vera* se tomó en consideración la concentración efectiva media señalada por Ilbas *et al.* (2012) de 20 % v/v. Al momento de trasladar los bulbos desde el medio de enraizamiento con agua destilada hacia los tratamientos experimentales con extractos de *A. vera*, se raleó el nuevo sistema radical de los bulbos, dejando únicamente las tres raíces más largas. Se dejó transcurrir el tiempo de exposición a los tratamientos, se llevó a cabo la medición de tres raíces y finalmente se aplicó una operación mediante la cual se obtuvo el porcentaje del efecto de inhibición.

Debido a que se obtuvieron CE_{50} distintas en ambos productos naturistas fue necesaria la incorporación de una prueba adicional para determinar la pureza de los mismos.

Se tomó en cuenta que el acíbar es un látex vegetal hidrosoluble, por lo tanto, se dedujo que el sobrenadante de color oscuro que quedaba en los contenedores eppendorf (1,5 ml) luego de centrifugar (10 000 rpm, 24 °C), contenía el acíbar disuelto, el cual fue descartado, dejando únicamente el precipitado con otros componentes menos solubles. Cabe destacar que dicho precipitado fue lavado y centrifugado tres veces con agua destilada para extraer la mayor cantidad de acíbar, se secó en estufa (60 °C por 48 h) y luego se determinó el diferencial de peso con el cual se estimó el contenido de acíbar extraído en las muestras analizadas.

Diseño experimental

En un segundo ensayo donde se emplearon 30 bulbos de *A. cepa* uniformes en envases de compota bajo condiciones de laboratorio (24 ± 2 °C, HR 82 %, fotoperiodo 12/12 con 5000 lux de luz natural indirecta), los tratamientos a evaluar consistieron de un control negativo representado por agua destilada y tratamientos con extractos de *A. vera* (gel fresco y acíbar deshidratado de ambos productos naturistas) en proporciones de 25, 50 y 200 % v/v con respecto a la CE_{50} por triplicado y por tres tiempos de exposición (24, 48 y 72 h) (Figura 4).



Figura 4. Batería de tratamientos con extractos de *Aloe vera* sobre meristemas radicales de *Allium cepa* (segundo ensayo).

Cabe destacar que se llevaron a cabo dos ensayos además del anteriormente mencionado, correspondientes a acíbar fresco de *A. vera*, donde se utilizaron 18 bulbos para cada una de las pruebas. En un primer ensayo con este extracto vegetal se emplearon concentraciones de: 0, 10, 20, 30, 40 y 50 (mg/l) con sus respectivos triplicados durante 48 h de exposición y otro donde fueron evaluadas concentraciones de: 0, 100, 200, 300, 400 y 500 (mg/l) por triplicado por 48 h (Figura 5). Estos ensayos fueron realizados debido a que este exudado es el principal componente de los productos laxantes evaluados en la presente investigación al cual Imery (2007) sugirió un posible efecto endogenotóxico, asimismo, fue necesaria la incorporación de los mismos en vista de que se registraron perturbaciones en los diferentes extractos (gel y acíbar deshidratado) en bajas frecuencias.

Parámetros macroscópicos y microscópicos

Como parámetros macroscópicos se tomaron en cuenta las variables: longitud de la raíz más larga en cada bulbo, color y forma del sistema radical, y como parámetros microscópicos se estudió la morfometría de células meristemáticas interfásicas, índice mitótico, índice de cada fase mitótica y posibles alteraciones en el número y estructura de los cromosomas.

Fases mitóticas

Después del tratamiento, la mitad de las raíces de cada bulbo fueron fijadas en solución Carnoy I (3:1 etanol; ácido acético glacial) durante 24 h.

Para esta evaluación se colectaron las raíces en la hora mitótica de este organismo que va de 7:45 – 8:15 A.M. (Singh, 2003). Una vez transcurridas las 24 horas, las raíces fueron lavadas con agua destilada por 10 minutos para eliminar el exceso de fijador, posteriormente se hidrolizaron en HCl 1N por 10 minutos con el fin de disgregar la lamela media y finalmente, se trataron una segunda vez en agua destilada para eliminar los remanentes del ácido fuerte. El tejido meristemático fue macerado sobre una lámina portaobjetos, se coloreó con 1-2 gotas de orceína lactopropiónica 1,5 % m/v durante tres minutos, se colocó el cubreobjetos y se aplicó la técnica de squash o aplastamiento (Mata-Sucre *et al.*, 2017). La preparación se observó al microscopio óptico, donde se analizaron cuatro láminas por día, se contabilizaron las diferentes fases mitóticas (profase, metafase, anafase y telofase) y células interfásicas en etapa G₁ del ciclo celular. Se determinó el índice mitótico (% IM) que estima el porcentaje de células existentes en división dentro de un tejido meristemático y que, por tanto, es una medida de su potencial proliferativo, así como también, el índice de fases mediante las siguientes fórmulas:

Índice mitótico (% IM) = $100 \times \frac{\text{N}^\circ \text{ de células en mitosis}}{\text{N}^\circ \text{ de células meristemáticas}}$.

Índice de fases (profase, metafase, anafase y telofase) = $100 \times \frac{\text{N}^\circ \text{ de células en cada fase}}{\text{N}^\circ \text{ de células mitóticas}}$.

Alteraciones mitóticas

Las anormalidades que pueden generarse a causa de los tratamientos experimentales, tales como: micronúcleos, fragmentos, puentes anafásicos, cromosomas vagantes, cromosomas rezagados, pegajosidad, rupturas cromosómicas, entre otras, según Sharma y Sharma (1999), se determinaron mediante el análisis de al menos diez meristemas por tratamiento, en donde se identificaron y contabilizaron las células con anormalidades y posteriormente se calculó su frecuencia con relación al resto de las células en el mismo estadio.

Alteraciones en cromosomas somáticos

Se analizó el cariotipo del organismo experimental para dilucidar alguna alteración con respecto a la cariología normal que posee *Allium cepa* ($2n=2x=16$). Para esta evaluación microscópica se colectó la otra mitad de las raíces a la misma hora que las anteriores, pero con la diferencia de que a éstas se les aplicó un pretratamiento con el mitostático, colchicina (0,05 % m/v), durante 90 minutos para facilitar la observación de cromosomas dispersos. Para la preparación de láminas temporales se ejecutaron los mismos pasos seguidos para el estudio de mitosis, según Mata-Sucre *et al.* (2017). Se prepararon cuatro láminas por día, se visualizaron detalladamente al menos 30 células con cromosomas dispersos y bien definidos para determinar la existencia de posibles alteraciones en el cariotipo.

Los ensayos y sus evaluaciones se desarrollaron en el Laboratorio de Genética Vegetal (EC-518) del Departamento de Biología en la Universidad de Oriente. Para todas las variables macroscópicas y microscópicas se llevaron registros fotográficos con una cámara digital Panasonic Lumix 14 mp que permitió su análisis posterior con los programas SigmaScanPro 5 y PhotoImpact 12.

Análisis estadístico

Los resultados cuantitativos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA), previa revisión del cumplimiento de los supuestos y se aplicó prueba *a posteriori* de rangos múltiples de Duncan a variables con diferencias significativas entre los tratamientos. A aquellas variables donde no se cumplieron los supuestos se les aplicó análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis con posterior prueba de mínima diferencia significativa (LSD). Todos los cálculos estadísticos se realizaron con $\alpha=0,05$, empleando el programa estadístico Statgraphic Centurión 15,0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las pruebas de toxicidad de los diferentes extractos de *A. vera* revelaron valores de CE_{50} de 250 mg/l para el producto naturista 1 y de 400 mg/l para el segundo producto (Figura 5). En el caso del gel fresco de *A. vera*, se tomó en consideración la concentración efectiva media reportada por Illbas *et al.* (2012) de 20 % v/v, posteriormente se comparó sus toxicidades frente a *A. cepa*.

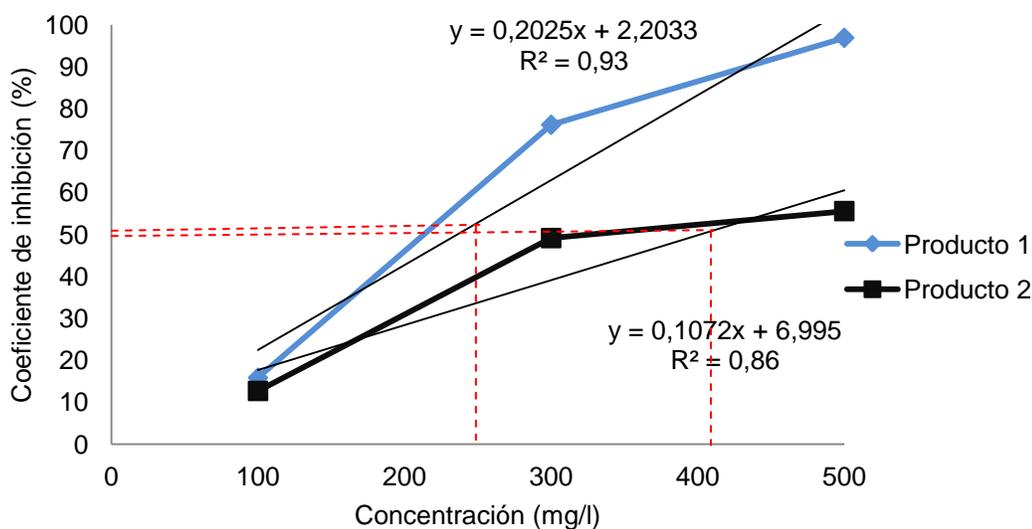


Figura 5. Concentración efectiva media (CE_{50}) de los extractos deshidratados de *Aloe vera* presentes en los productos naturistas a base de acíbar deshidratado determinadas sobre el sistema radical de *Allium cepa*.

La obtención de diferentes concentraciones efectivas medias en ambos productos naturistas (producto 1 y producto 2) a base de acíbar deshidratado de *A. vera* puede estar relacionada con la naturaleza de ambas presentaciones sólidas, siendo el producto 2, más heterogéneo que el producto 1. Partiendo de la idea de que ambas marcas indican en sus especificaciones al consumidor que contienen acíbar de *A. vera*, y considerando que este conglomerado de metabolitos es el principal responsable de generar el efecto laxante (Domínguez *et al.*, 2012).

Los resultados indican que las muestras del “producto 1” presentan mayor cantidad de acíbar que las muestras del “producto 2”. Aunque en ambos casos no se solubilizaron totalmente los deshidratados comerciales, en el producto 1 se extrajo un promedio de 15,13 % más de acíbar que en el producto 2 (según cálculos derivados de la Tabla 1), lo que advierte de la menor proporción de elementos solubles en ésta última marca, y por consiguiente, menos acíbar acompañado de gran heterogeneidad de componentes fibrosos.

Al examinar el producto 2 bajo un microscopio estereoscópico se denotaron partículas de diversa índole, siendo las más recurrentes unos agregados celulósicos de color marrón claro y semejante a pequeños palillos engrosados (Figura 6). Estas partículas gruesas presentaron áreas comprendidas entre los 84 981 y 1 105 217 μm^2 ($383\,058 \pm 260\,319 \mu\text{m}^2$). Otros componentes fibrosos, mucho más pequeños, se presentaron en forma de polvillo liviano adherido a los conglomerados sólidos de acíbar (de color pardo a negro). El análisis de superficie, empleando fotomicrografías y el programa SigmaScanPro 5, determinó que, al menos, un 16,4 % del producto deshidratado 2 está compuesto por material fibroso visible al microscopio, y un estimado de otro 5-10 % está conformado por fibras o componentes pulverizados más difícil de precisar. Se estima entonces que alrededor de 20-25 % del contenido de las cápsulas de este laxante está compuesto por materiales fibrosos, coincidiendo someramente con la tendencia arrojada por la prueba de solubilización del acíbar (Tabla 1).

Tabla 1. Diferencial de masa por solubilización del acíbar de *Aloe vera* en muestras frescas y en los laxantes naturistas “producto 1” y “producto 2”.

Productos	Masa inicial (g)	±DE	Masa final (g)	±DE	Mi-Mf (g)	±DE
Producto 1	1,0445	0,012162	1,0333	0,011179	0,0153	0,000212
Producto 2	1,0468	0,011458	1,0337	0,012216	0,0131	0,000777
Acíbar fresco	2,0634	0,008041	2,0285	0,012070	0,0348	0,005054

±DE: desviación estándar, Mi-Mf: masa inicial - masa final.

Las diferencias entre ambas determinaciones (15 Vs 20-25 %), puede

deberse al remanente de acíbar no solubilizado en ambos productos naturistas, sensiblemente reflejado en los análisis de superficie.

Existen muchos productos naturistas a base de acíbar de *A. vera*, algunos son combinados con derivados de otras plantas (ejemplo *Aquilaria agallocha*) (EINE, 2006), o con partes de la misma planta, como debe ser el caso del extracto foliar del producto 2. En este laxante naturista se visualizan partículas de diversos tamaños y colores, indicando que debe tratarse de conglomerados de acíbar deshidratado y restos secos de mesófilo foliar; mientras que su equivalente “producto 1” es mucho más homogéneo.

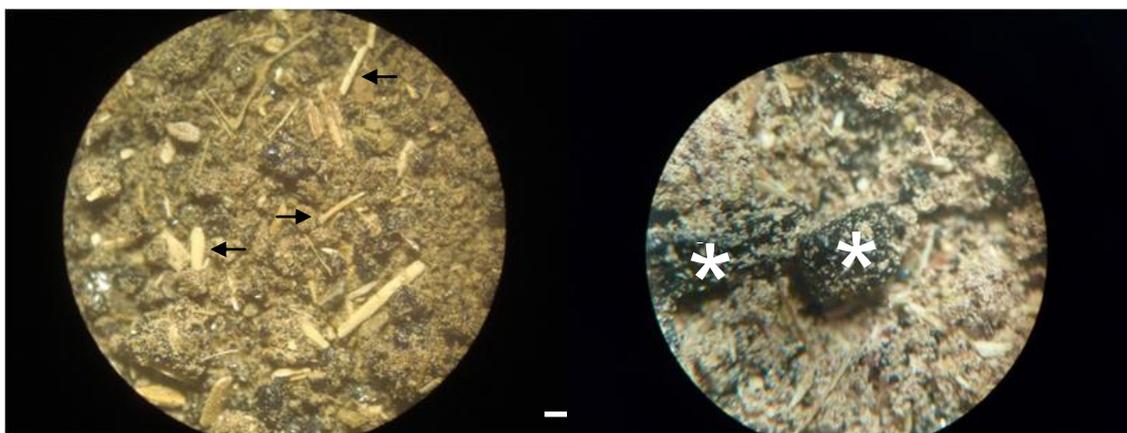


Figura 6. Extracto naturista “producto 2” visto bajo microscopio estereoscópico. Las flechas indican partículas fibrosas y los asteriscos (*) los conglomerados de acíbar deshidratado. Barra: 1000 μ m.

Se ratifica entonces que la desigualdad de concentraciones efectivas medias se debe principalmente a la heterogeneidad de los productos naturistas a base de *Aloe vera*. El extracto con menor contenido de acíbar deshidratado (“producto 2”) requirió mayor proporción (400 mg/l) para generar una disminución del 50 % en la longitud de la raíz de *Allium cepa*; y aquel con mayor concentración de acíbar deshidratado (“producto 1”), llevó a cabo su efecto con una menor concentración (250 mg/l).

En base a las concentraciones efectivas medias se establecieron tres dosis de evaluación que correspondieron a 200, 50 y 25 % con respecto a la CE_{50} y las cuales fueron probadas en un segundo ensayo. Los parámetros

macroscópicos visualizados mediante la morfometría y color de las raíces de *A. cepa* constituyen un marcador esencial de afectación sobre la unidad experimental, actuando como manifestación externa de posibles eventos celulares internos (Fatma *et al.*, 2017).

En el producto naturista 1, la mayor longitud radical se alcanza a una concentración de 200 % y, en concentraciones inferiores (50 y 25 %), se visualizan longitudes cercanas entre ellas, de igual manera, se observan longitudes superiores en las concentraciones antes mencionadas (200, 50 y 25 %) con respecto al control (Figura 7).

A partir de ello se puede deducir que existe un estímulo por parte de este producto sobre el crecimiento radical, lo cual podría estar asociado a la activación de algunas fitohormonas como las auxinas y citocininas, responsables de la proliferación celular en las raíces.

Con el producto naturista 2, se observó un aumento en la longitud de las raíces desde 0 y 25 % (similares en ambos casos) hasta la concentración del 50 %; no obstante, en la concentración más alta (200 %) se produjo una disminución de las longitudes para cada uno de los tiempos (Figura 8).

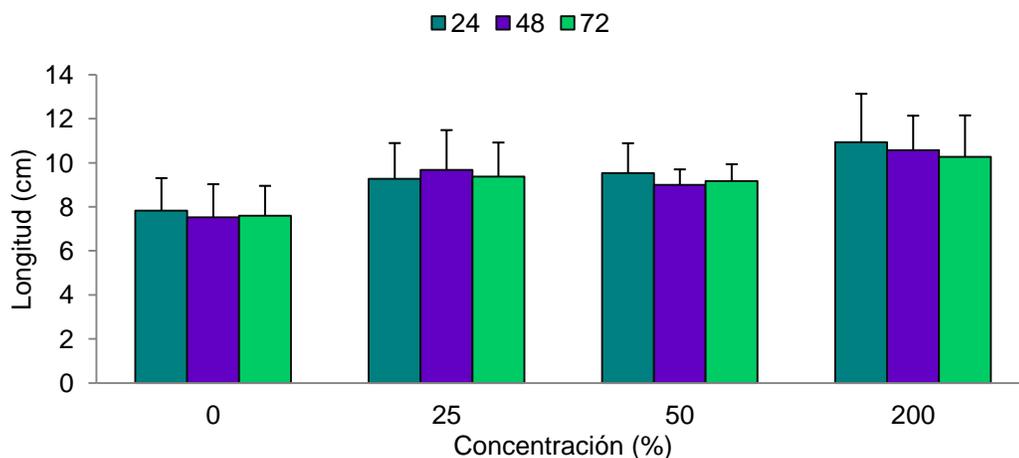


Figura 7. Longitud (cm) de raíces de *Allium cepa* sometidas a distintas concentraciones de un producto comercial de *Aloe vera* “producto 1” por tres periodos de tiempo (24, 48 y 72 h). Barras sobre la gráfica indican \pm desviación estándar.

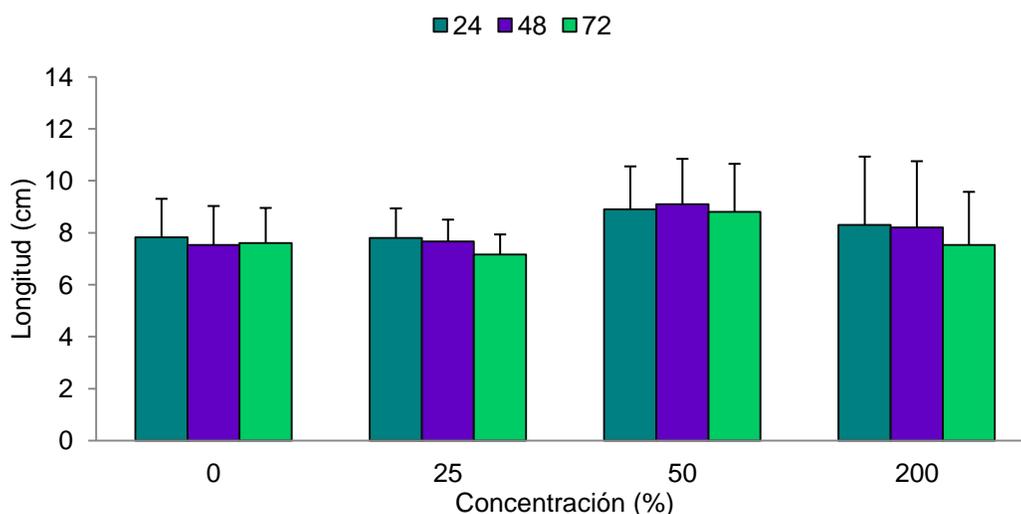


Figura 8. Longitud (cm) de raíces de *Allium cepa* sometidas a distintas concentraciones de un producto comercial de *Aloe vera* “producto 2” por tres periodos de tiempo (24, 48 y 72 h). Barras sobre la gráfica indican \pm desviación estándar.

Una respuesta similar se generó en las raíces expuestas al gel de *A. vera*, en las cuales a medida que aumentó la concentración desde 0 hasta 50 %, se incrementó la longitud de las raíces de *A. cepa* y declinaron luego a la concentración de 200 % (Figura 9).

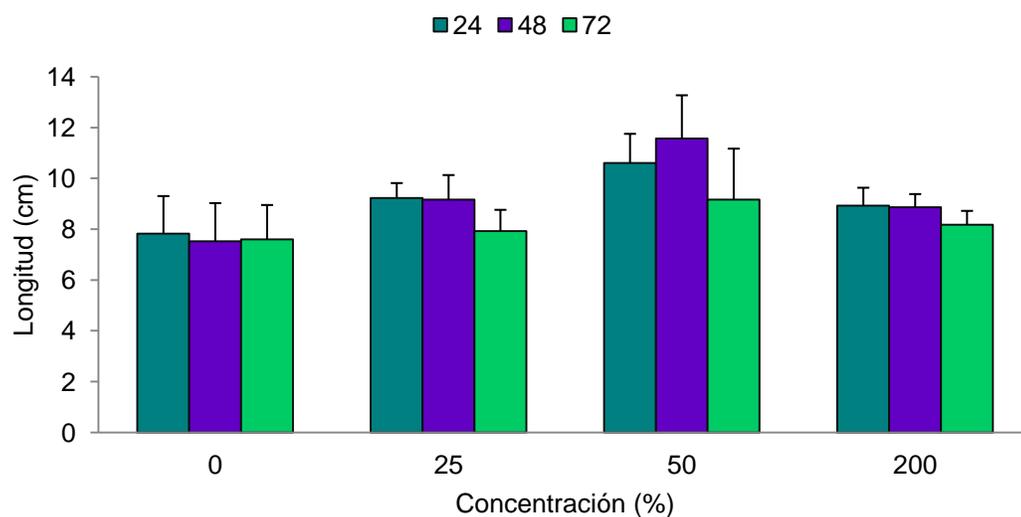


Figura 9. Longitud (cm) de raíces de *Allium cepa* sometidas a distintas concentraciones de gel de *Aloe vera* por tres periodos de tiempo (24, 48 y 72 h). Barras sobre la gráfica indican \pm desviación estándar.

Este acortamiento en los meristemas radicales ocasionado por ambos extractos a una concentración de 200 % puede deberse a un efecto en el ordenamiento de las microfibrillas de celulosa que se hayan distribuidas a lo largo de todo el meristema, por lo cual se inhibe la expansión celular (Andrioli *et al.*, 2006). Dichos descensos, también pueden estar relacionados a la heterogeneidad de los extractos, en el caso del producto 2, en la concentración más baja se logró visualizar partículas sin disolver, las cuales a una concentración superior se pudo apreciar mayoritariamente, produciéndose una aglomeración de éstas en la raíz principalmente a un tiempo de exposición superior (72 h), por lo cual, se puede deducir que existe un impedimento en la absorción de dicha sustancia.

A pesar de que el gel de *A. vera* fue filtrado previamente para el preparado de las soluciones, remanentes sólidos del hidroparénquima fueron observados, además de cierto grado de heterogeneidad en las soluciones, sobre todo en la concentración más alta, esto pudo ocasionar alteraciones en el proceso de difusión generando dificultad por parte de la raíz en absorber fluidamente la solución a la que fue inmersa.

En las 72 h de exposición se generó una disminución en las longitudes de las raíces para cada uno de los tratamientos experimentales (producto 1, 2, y gel). En este sentido, también se observó una ligera disminución en el control, lo cual puede estar asociado a lo señalado por Andrioli (2011), quien lo atribuye a un agotamiento del sistema al carecer las soluciones de aireación. Desde los inicios del test de *A. cepa* no se establece una metodología que incorpore el oxígeno como elemento clave, pero sí el recambio de soluciones experimentales cada 24 h, ello pudo inducir a un decaimiento en las concentraciones de oxígeno propias de las condiciones y en 24 horas puede producirse un medio anóxico aún estableciendo recambios de las soluciones.

Del mismo modo, una disminución en las longitudes de las raíces al ser tratadas con una sustancia en particular por uno o diversos tiempos puede deberse a fallos en los mecanismos asociados al funcionamiento de la

membrana plasmática, que involucra a metales esenciales como el magnesio (Mg^{2+}) y el calcio (Ca^{2+}) de gran importancia para la raíz. Un descenso en las concentraciones de estas especies químicas favorece la auto-oxidación de moléculas estructurales de la membrana plasmática en donde se hallan sitios específicos para la adquisición de cationes y aniones, lo cual puede provocar alteraciones en el ambiente celular y por consiguiente la inactivación de enzimas específicas para la síntesis de proteínas y de ARN, responsables del desarrollo normal de las raíces (Vera *et al.*, 2010).

Causil *et al.* (2017) sugieren que cuando la hidratación de los bulbos de *A. cepa* concurre bajo sustancias tóxicas, la división celular de los meristemas radicales puede verse notoriamente afectada, ya sea retardando el proceso mitótico o generando alteraciones celulares que pueden conducir a su posterior destrucción, este tipo de alteraciones por lo general impide el crecimiento normal de la raíz y, por tanto, su elongación. Del mismo modo, la exposición de las raíces de *A. cepa* a condiciones no óptimas para su normal desarrollo, puede acarrear alteraciones no solo morfométricas sino también en su coloración. El grado de estas alteraciones va a depender de cuan tóxica sea la sustancia y del tiempo en contacto con ella.

Raíces que fueron sometidas independientemente a distintas concentraciones del producto naturista 1 no generaron inicialmente rasgos colorimétricos atípicos para ninguna de las concentraciones; sin embargo, a medida que fue avanzando el tiempo de exposición (48 h) este tejido vegetal se tornó un poco más oscuro en toda su extensión, manteniendo una forma normal, es decir, sin encorvaduras ni engrosamientos (Figura 10). En un tiempo y concentración superior (72 h – 200 %, respectivamente) de este extracto, se pudo denotar un oscurecimiento más intenso en la zona más apical del meristema (Figura 11). En este sentido, Fiskesjö (1985) señala que la coloración oscura intensa generada en la zona más apical de los meristema puede ser sinónimo de necrosis en la raíz y por consiguiente de muerte celular; sin embargo, en la presente investigación se difiere de lo antes mencionado

porque existe actividad celular en este tejido, siendo esta corroborada mediante el estudio microscopico.

Por otra parte, el extracto comercial “producto 2” ocasionó cambios en la coloración a partir de las 48 h de exposición, visualizándose un color más claro en la concentración más baja (Figura 12), y lo cual se mantuvo hasta la finalización del montaje de los tratamientos. De igual manera, el gel de *A. vera* proporcionó signos morfológicos diversos, al cabo de las 72 h de exposición, se observó en las concentraciones 25 y 50 % raíces con gran estado de turgencia y de color blanco, muy similar a lo observado en el control (Figura 13); no obstante, en una concentración de 200 % de la CE_{50} de gel, las raíces se tornaron más delgadas, débiles y más opacas con respecto a las concentraciones inferiores (Figura 14). Para ninguno de los tratamientos con gel fresco de *A. vera*, en sus diferentes tiempos, se denotan cambios en la forma de la raíz.

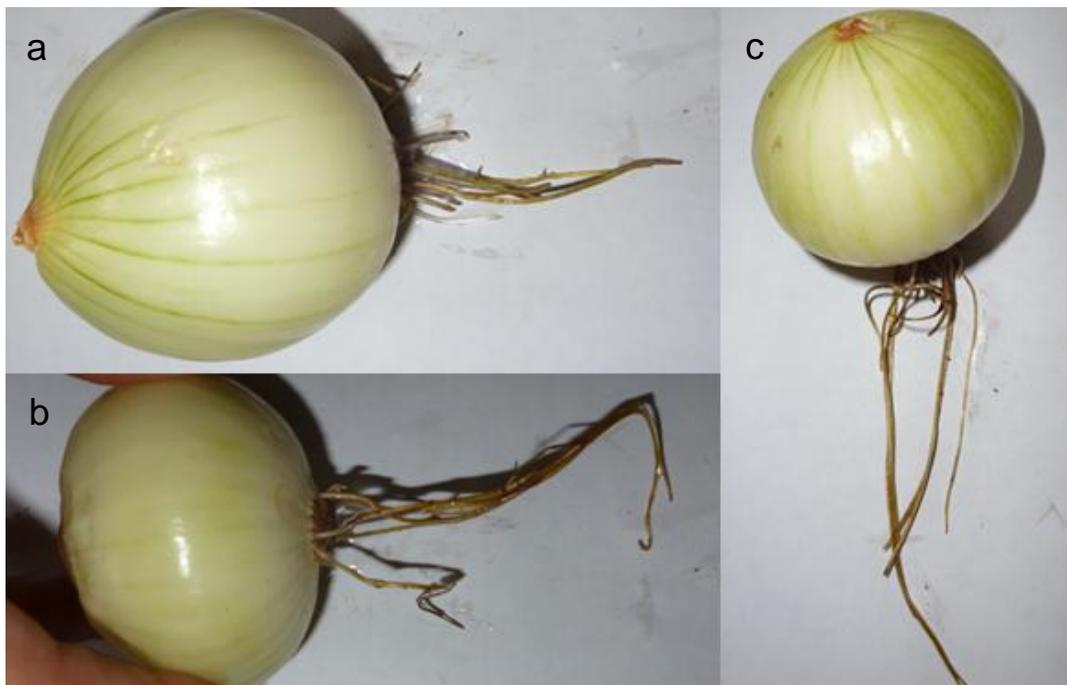


Figura 10. Raíces de *Allium cepa* sometidas a soluciones del producto naturista 1 durante 48 h. Raíces a una concentración de 25 % (a), 50 % (b) y 200 % (c) con respecto a la CE_{50} .



Figura 11. Meristemas radicales tratados con el producto 1 al 200 % durante 72 h. Las flechas señalan el oscurecimiento de la zona más apical de la raíz.

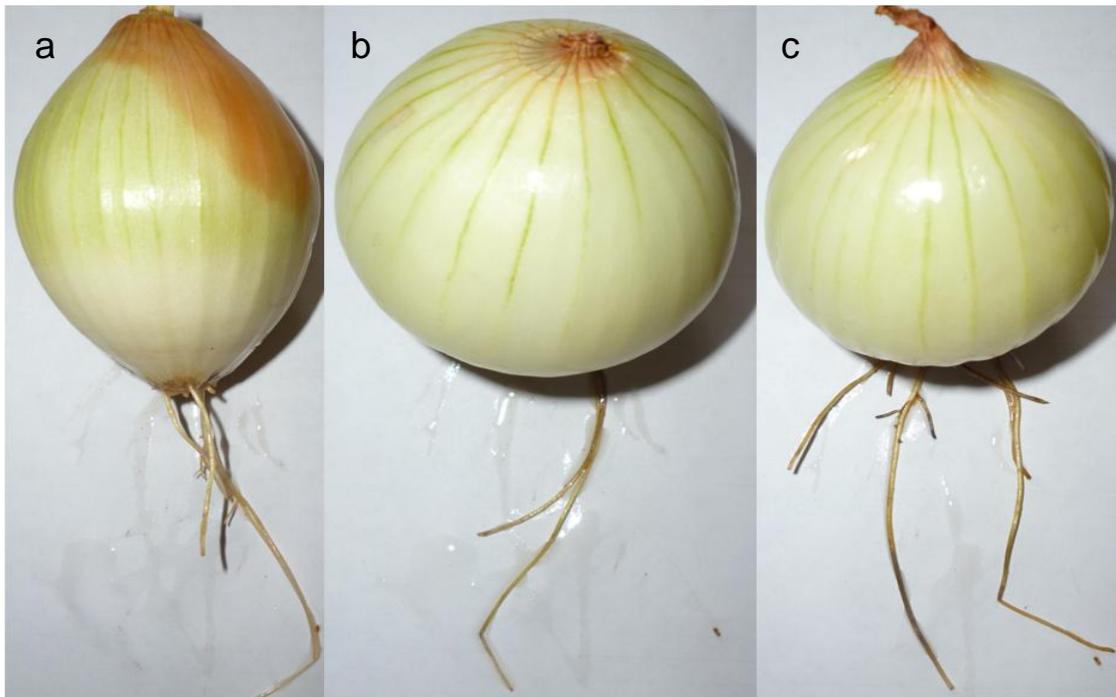


Figura 12. Raíces de *Allium cepa* sometidas a distintas concentraciones del producto naturista 2 al cabo de 48 h. Raíces a una concentración de 25 % (a), 50 % (b) y 200 % (c) con respecto a la CE_{50} .



Figura 13. Estado de meristemas radicales sin ser sometidos a los extractos de *Aloe vera* (tratamiento control).

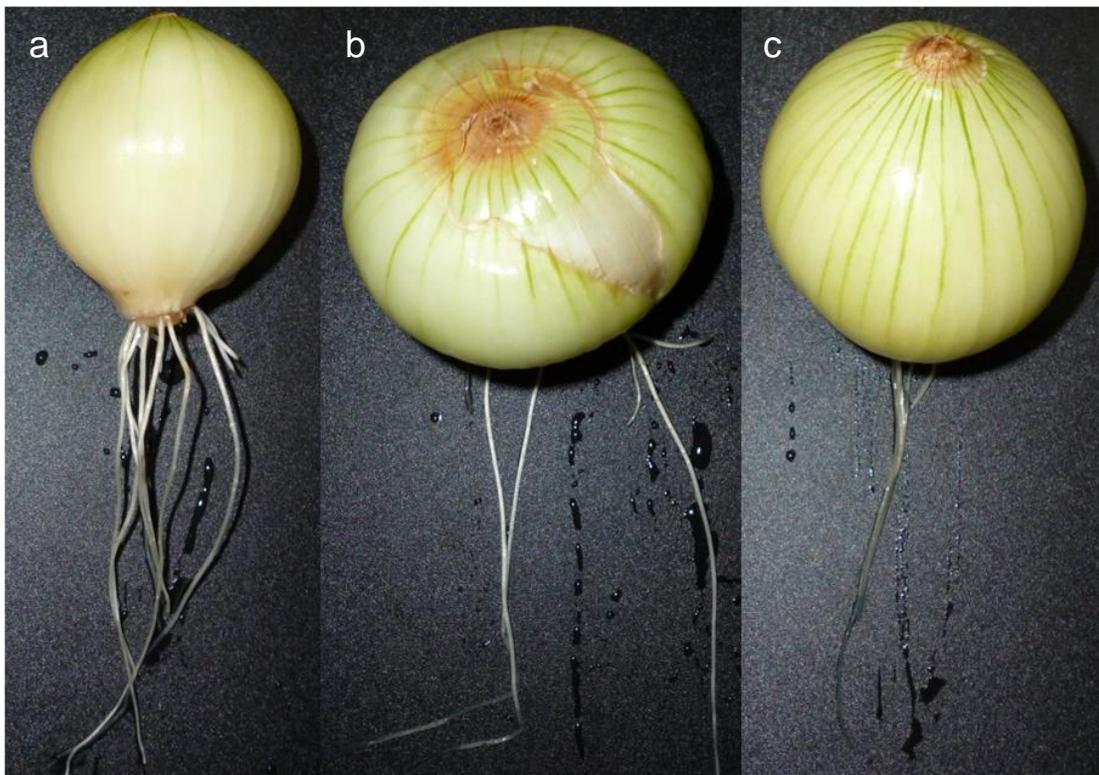


Figura 14. Raíces de *Allium cepa* tratadas con soluciones de gel de *Aloe vera* al transcurrir 72 h de exposición. Raíces tratadas con solución del 25 % (a), 50 % (b) y 200 % (c) de la CE_{50} de gel fresco.

A pesar que la evaluación de parámetros macroscópicos considera a la longitud de la raíz el atributo externo más importante, el estado y la coloración que puede adquirir dicho tejido en una condición dada, también genera información de daño tóxico sobre la unidad experimental. Por medio de la coloración originada en los tejidos tratados con las soluciones de los laxantes naturistas “producto 1 y 2”, puede especularse que los constituyentes fenólicos presentes en los mismos causan pigmentación en el tejido radical, o dicho efecto puede ser atribuido a una oxidación no detrimental de los mismos por falta de oxígeno en el medio.

Además de los efectos que pueden generarse macroscópicamente mediante la acción de diversas sustancias, también pueden llegar a desencadenarse alteraciones microscópicas que abarcan el mundo celular, el proceso mitótico, e incluso, variaciones en el cariotipo de la especie bajo estudio.

Al llevar a cabo el análisis microscópico se visualizaron algunas alteraciones nucleares, así como también citoplasmáticas en los tratamientos experimentales que no fueron evidenciados en un control (0 %), por lo cual fue necesario determinar las distintas áreas nucleares, celulares y citoplasmáticas para estos aspectos citológicos. En células meristemáticas cuyas raíces no fueron sometidas a sustancias experimentales, se pudo distinguir a nivel celular un elevado estado de turgencia, con un núcleo delimitado por la envoltura que lo separaba claramente del citoplasma, una membrana sin haber perdido su integridad y con la presencia de uno a tres nucléolos en el caso de células interfásicas (Figura 15). Dichas características fueron corroboradas por la investigación de Carruyo *et al.* (2006), donde evaluaron el efecto tóxico del plomo sobre meristemas radicales de *A. cepa*, cuyas raíces sin tratar con este metal presentaron signos celulares completamente normales y similares a los descritos en el presente trabajo.

También se visualizaron núcleos redondeados sin ninguna afectación de forma como fue descrito en algunos de los tratamientos evaluados, ni la

presencia de alteraciones nucleares y una excelente calidad celular y de cada uno de sus componentes.

Al aplicar un ANOVA multifactorial para las áreas celulares se obtuvieron diferencias significativas entre los efectos principales, formándose también una interacción significativa triple entre los extractos, las concentraciones y los tiempos (f -cal: 18,88; $p \leq 0,05$). La mayor área celular se estableció en el extracto correspondiente al producto 1 a una concentración de 25 % a las 48 h y la menor área celular se visualizó en el gel al 50 % a las 24 h, siendo estas estadísticamente distintas entre ellas y por consiguiente diferentes al resto de los tratamientos (Figura 16).



Figura 15. Células meristemáticas de raíces de *Allium cepa* sometidas a condiciones experimentales normales (H_2O – tratamiento control). Las flechas señalan células interfásicas con sus respectivos nucleolos.

De igual manera, el análisis estadístico para el área nuclear estableció diferencias significativas entre los efectos principales, formándose también una interacción triple entre ellos (extracto-concentración-tiempo) con un f-cal: 10,91 y $p \leq 0,05$. El tratamiento constituido por el gel 50 % al cabo de 48 h fue quien presentó el valor más alto y la menor área nuclear se estableció en el tratamiento de gel al 50 % a las 24 h (Figura 17).

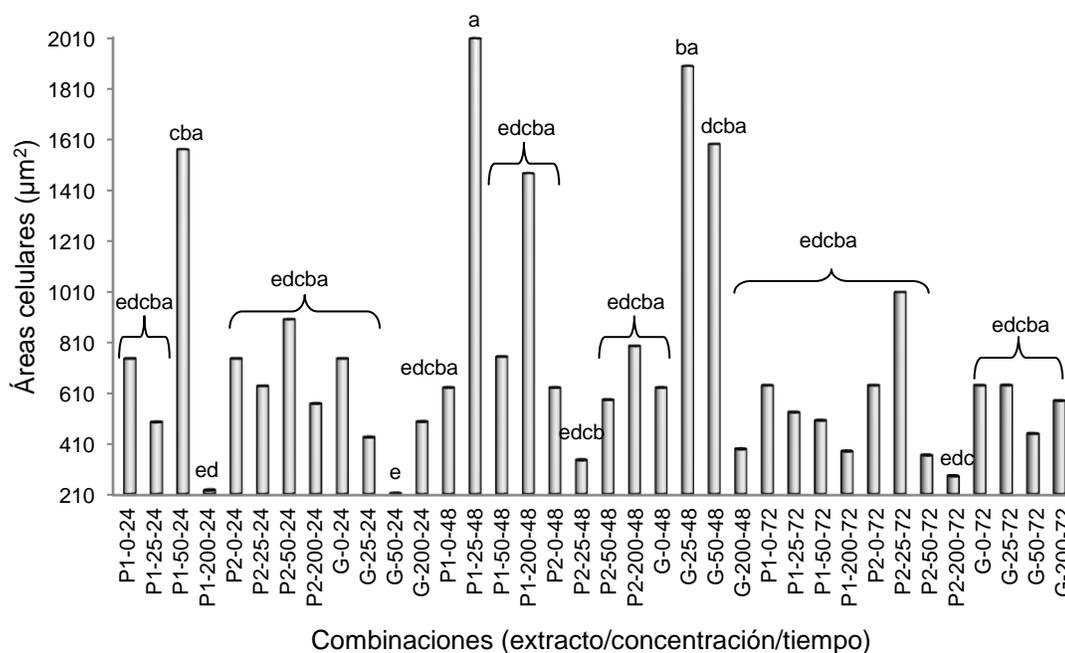


Figura 16. Áreas celulares en meristemas de *Allium cepa* sometidos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición a extractos de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). P1: acíbar deshidratado “producto 1”, P2: acíbar deshidratado “producto 2”, G: gel fresco. 0, 25, 50 o 200: porcentaje de la CE_{50} . 24, 48 o 72: tiempo de exposición (horas). Promedio de tres repeticiones.

A lo que concierne al área citoplasmática se formó una interacción triple en los efectos principales extractos-concentración-tiempo como en el resto de las áreas evaluadas con un f-cal: 18,83 y $p \leq 0,05$. El ANOVA multifactorial estableció diferencias estadísticamente significativas entre las mismas, determinándose la mayor área citoplasmática en el tratamiento de “producto 1” 25 % a las 48 h y la menor área citoplasmática en “producto 1” 200 % a las 24 h (Figura 18).

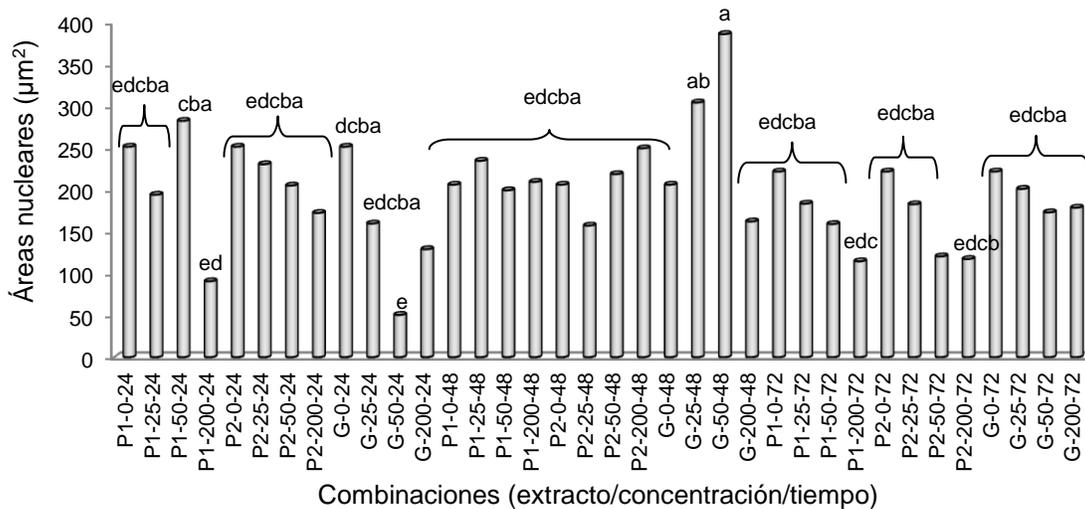


Figura 17. Áreas nucleares en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición a extractos de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). P1: acíbar deshidratado “producto 1”, P2: acíbar deshidratado “producto 2”, G: gel fresco. 0, 25, 50 o 200: porcentaje de la CE_{50} . 24, 48 o 72: tiempo de exposición (horas). Promedio de tres repeticiones.

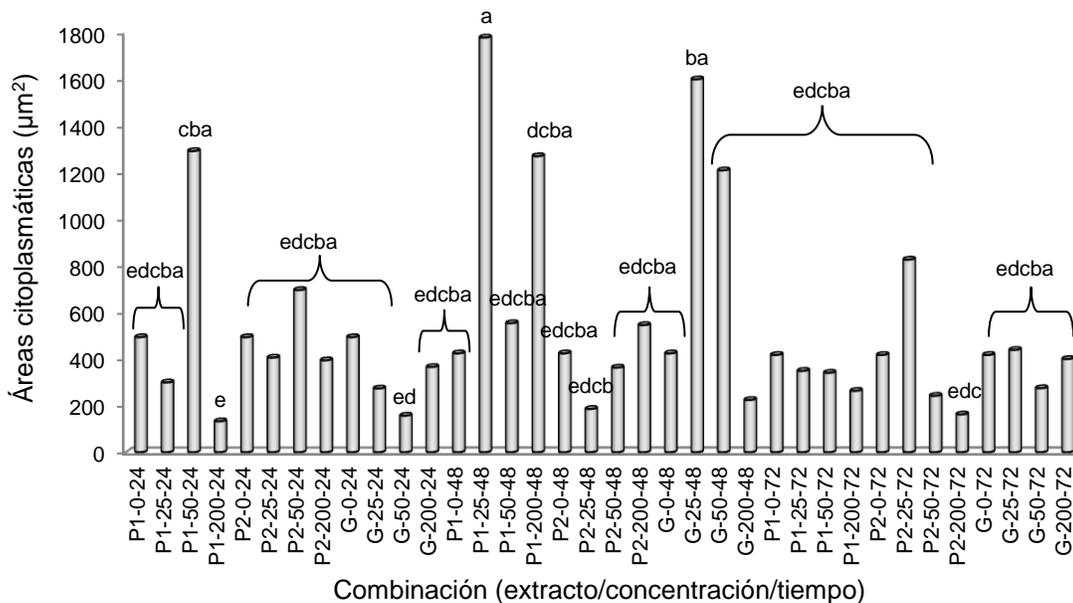


Figura 18. Áreas citoplasmáticas en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición a extractos de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). P1: acíbar deshidratado “producto 1”, P2: acíbar deshidratado “producto 2”, G: gel fresco. 0, 25, 50 o 200: porcentaje de la CE_{50} . 24, 48 o 72: tiempo de exposición (horas). Promedio de tres repeticiones.

Los resultados obtenidos para las distintas áreas reflejan las diferentes alteraciones celulares encontradas (Tabla 2), en donde la que presentó mayor frecuencia a las 24 h fue la de citoplasmas voluminosos en el “producto 1” 50 % con un valor del 15 % y de 13,69 % para el “producto 2” 50 % (Figura 19). También se describieron otras alteraciones como: citoplasmas contraídos para todos los tratamientos siendo más frecuente en el gel de *A. vera* al 50 % y en el producto 1 al 50 %, núcleos acorazonados con una frecuencia de 0,21 % para el producto 2 al 200 % y 0,50 % para gel al 50 % (Figura 20), así como también, núcleos en forma de oz (1,02 %) para el producto 1 al 200 %, núcleos en forma de “s” para el producto 2 al 50 % con una recurrencia de aparición de 1,19 %, núcleos en forma de “c” para el producto 1 y 2 al 50 % (Figura 21) y finalmente núcleos en forma de “8” para el producto 2 al 50 % (Tabla 2).

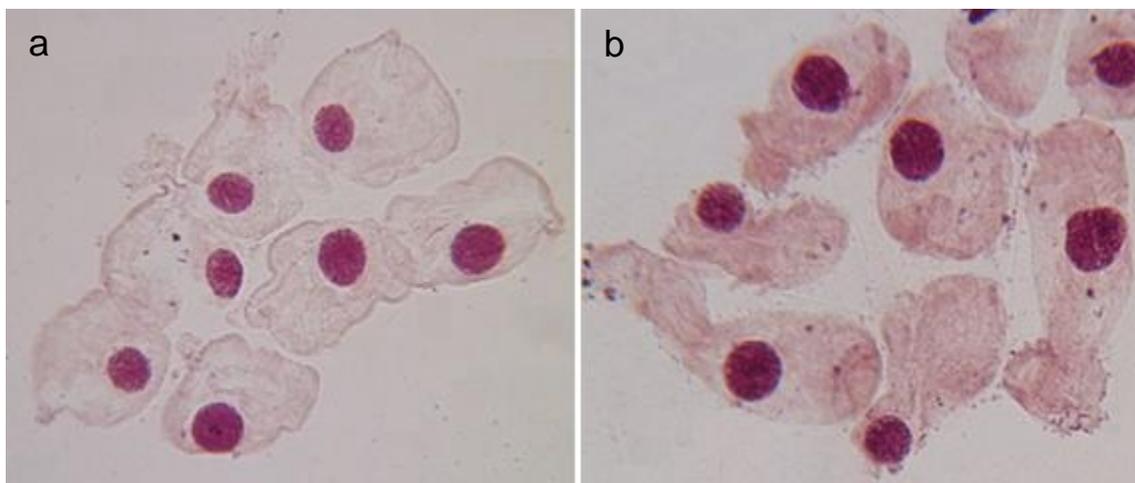


Figura 19. Citoplasmas voluminosos en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas por 24 h a productos naturistas a base de acíbar deshidratado de *Aloe vera*. a: producto 1 al 50 % de la CE₅₀ y b: producto 2 al 50 %.

A las 48 h, los citoplasmas voluminosos fueron la alteración citológica más recurrente (19,44 %) principalmente en células cuyos meristemas fueron tratados con el extracto del producto 1 al 200 %, seguido del producto 2 al 50 % (Figura 22) con una frecuencia de 15,91 %, (Tabla 2). Además se visualizaron algunas células con citoplasmas contraídos.

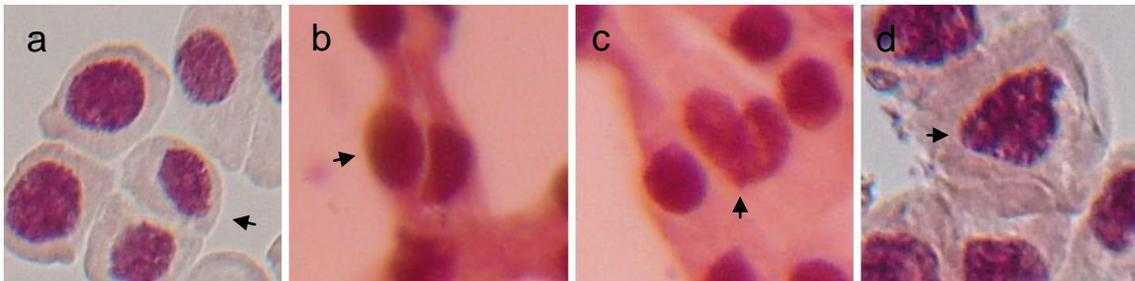


Figura 20. Alteraciones citológicas en meristemas radicales de *Allium cepa* sometidos por 24 h a extractos de *Aloe vera*. a: citoplasmas contraídos en “producto 1” al 50 % de la CE_{50} , b: citoplasmas contraídos en gel al 50 %, c: núcleo acorazonado en gel al 50 % y d: núcleo acorazonado en “producto 2” 200 %. Las flechas señalan la alteración celular.

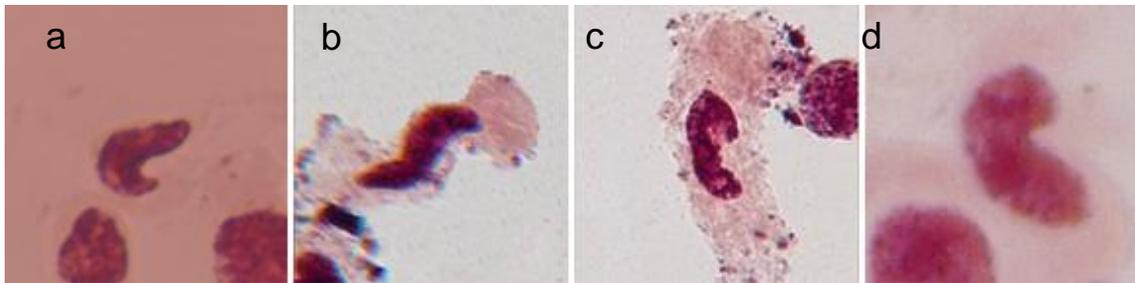


Figura 21. Alteraciones citológicas en meristemas de *Allium cepa* sometidas por 24 h a extractos de *Aloe vera*. a: núcleo en forma de oz en “producto 1” al 200 % de la CE_{50} , b: núcleo en forma de “s” en “producto 2” 50 %, c: núcleo en forma de “c” en “producto 1” 50 % y d: núcleo en forma de “c” para “producto 2” 50 %.

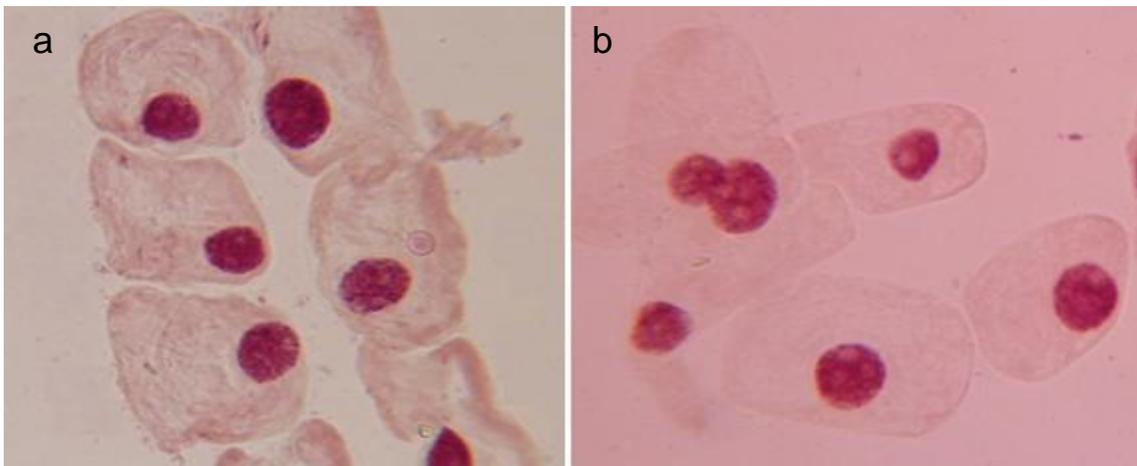


Figura 22. Alteraciones citológicas en meristemas de *Allium cepa* sometidas por 48 h a extractos de *Aloe vera*. a: citoplasma voluminoso en el producto 1 al 200 % de la CE_{50} y b: citoplasma voluminoso en el producto 2 al 50 %.

Finalmente, a las 72 h de tratamiento se describió como una de las alteraciones citológicas más frecuente a los núcleos en forma de media luna para el producto naturista 2 al 25 %, seguido de núcleos encorvados para gel al 200 % y núcleos en forma de “m” en el producto 2 al 50 % (Figura 23). Además se hallaron algunas células que presentaron citoplasmas contraídos (Figura 24).

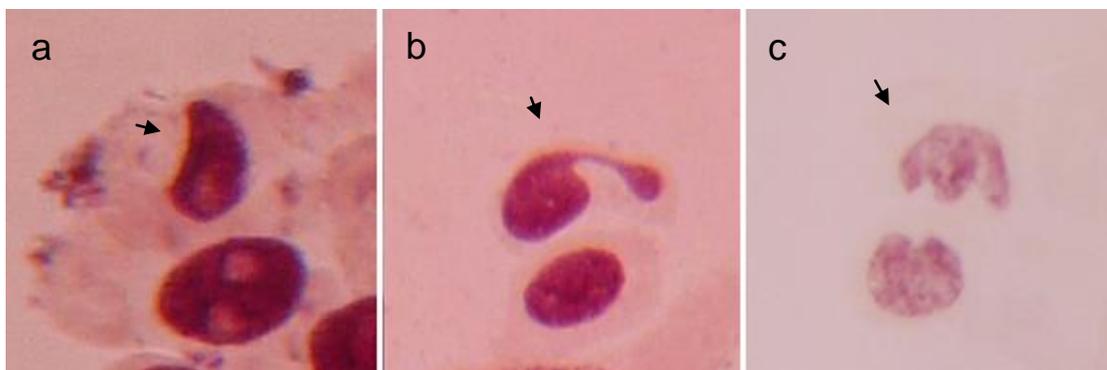


Figura 23. Alteraciones citológicas en meristemas radicales de *Allium cepa* sometidos por 72 h a extractos de *Aloe vera*. a: núcleo en forma de media luna en “producto 2” al 25 % de la CE_{50} , b: núcleo encorvado en gel 200 % y c: núcleo en forma de “m” en “producto 2” 50 %. Las flechas señalan la alteración celular.

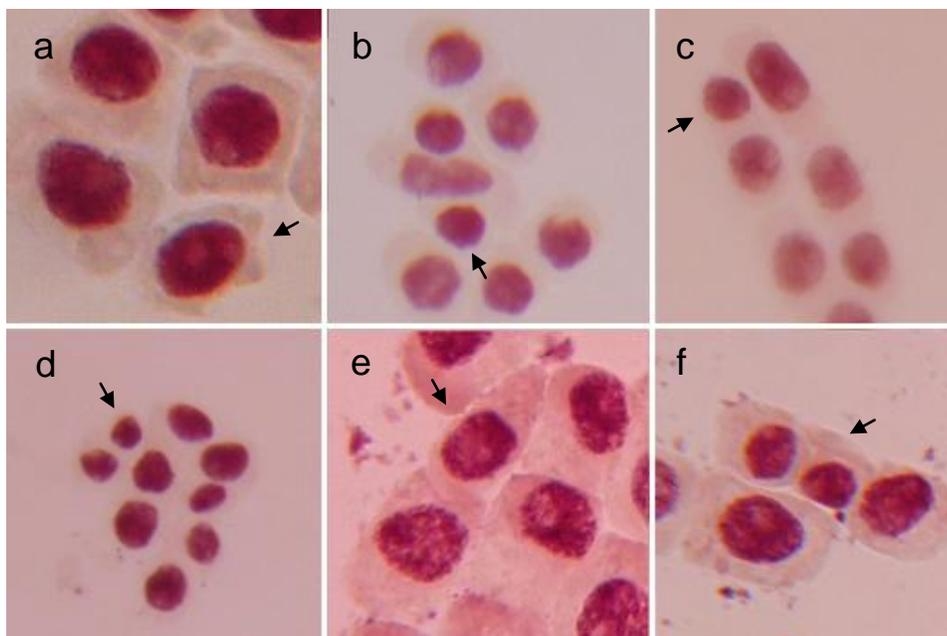


Figura 24. Citoplasmas contraídos en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas por 72 h a extractos de *Aloe vera*. a: gel al 25 % de la CE_{50} , b y c: “producto 2” 25 %, d: “producto 2” 50 %, e: “producto 1” 50 % y f: “producto 1” 25 %. Las flechas señalan la alteración celular.

Los citoplasmas voluminosos fueron una de las alteraciones con mayor frecuencia, esta misma anomalía fue descrita por Andrioli (2011), en este sentido, esta investigadora comenta que los citoplasmas voluminosos son indicadores de efectos pre letales por la falta de aireación en el medio al producirse un agotamiento del oxígeno y por ende del sistema hidropónico, aunque el recambio diario de las soluciones restablece, en cierta medida, la concentración de oxígeno, no recompensaría del todo la carencia del mismo en el medio, además dicha acción traería como consecuencia la posible formación de radicales libres acompañado de daño celular.

Se puede inferir acerca de los citoplasmas contraídos que esta alteración surge por la presencia de ciertas sustancias que pueden desencadenar un efecto hipertónico, los meristemas radicales al entrar en contacto con una sustancia que tiene una determinada concentración provoca un estrés sobre el organismo vegetal, lo cual se traduce en alteraciones en el ambiente celular, por lo cual el medio que rodea a la célula presenta mayor concentración de solutos. Esto conduce a la pérdida de agua por parte de la célula al haber diferencias de presiones y dicha pérdida persiste hasta que la presión osmótica sea igual tanto en el medio externo como en el interno (célula), conduciendo en algunos casos a que la célula muera por deshidratación (Medina, 2011).

La presencia de núcleos amorfos en este estudio puede ser deducida como un efecto directo de los extractos sobre la integridad de la membrana, o sobre un conjunto de proteínas específicas que se hallan en el interior de la membrana nuclear, formando como una especie de capa en el núcleo, el cual interviene en la desorganización y reorganización de las membranas nucleares en el proceso de división celular.

Tabla 2. Frecuencia de alteraciones citológicas halladas en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a distintas concentraciones de extractos de *Aloe vera* por tres periodos de tiempo (24, 48 y 72 h).

Tiempo	Extractos	Conc. (%)	N células	Anormalidades (%)										
				CV	CC	NA	NO	NS	NC	N8	NM	NML	NE	
24 h	Control	0	229	-	0,87	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Producto 1	25	572	-	0,70	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Producto 1	50	280	15,00	10,00	-	-	-	0,36	-	-	-	-	
	Producto 1	200	489	-	3,27	-	1,02	-	-	-	-	-	-	
	Producto 2	25	349	-	5,73	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Producto 2	50	168	13,69	4,76	-	-	1,19	3,57	0,60	-	-	-	
	Producto 2	200	470	3,83	4,47	0,21	-	-	-	-	-	-	-	
	Gel	25	219	-	5,94	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Gel	50	200	-	11,50	0,50	-	-	-	-	-	-	-	
	Gel	200	177	-	5,08	-	-	-	-	-	-	-	-	
48 h	Control	0	254	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Producto 1	25	258	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Producto 1	50	133	-	11,28	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Producto 1	200	319	19,44	3,45	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Producto 2	25	130	6,92	6,92	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Producto 2	50	176	15,91	3,98	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Producto 2	200	204	0,98	3,43	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Gel	25	238	9,24	0,84	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Gel	50	371	-	0,81	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Gel	200	125	-	5,60	-	-	-	-	-	-	-	-	
72 h	Control	0	279	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Producto 1	25	177	-	2,82	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Producto 1	50	167	-	2,99	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Producto 1	200	143	-	2,80	-	0,70	-	-	-	-	-	-	
	Producto 2	25	129	-	3,10	-	-	-	-	-	-	11,63	-	
	Producto 2	50	108	-	3,70	-	-	-	-	-	0,93	-	-	
	Producto 2	200	86	-	6,98	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Gel	25	167	-	1,80	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Gel	50	167	-	10,78	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Gel	200	202	-	11,39	-	-	-	-	-	-	-	1,48	

Conc: concentración, N células: número de células en división, CV: citoplasmas voluminosos, CC: citoplasmas contraídos, NA: núcleos acorazonados, NO: núcleos en forma de oz, NS: núcleos en "s", NC: núcleos en "c", N8: núcleos en "8" y NM: núcleos en "m".

Al llevar a cabo el estudio mitótico, se visualizaron células en un control negativo o sin extracto en las distintas fases mitóticas con características aparentemente normales, sin ninguna alteración en ninguna de las etapas (profase, metafase, anafase y telofase) y con una turgencia celular considerable (Figura 25).

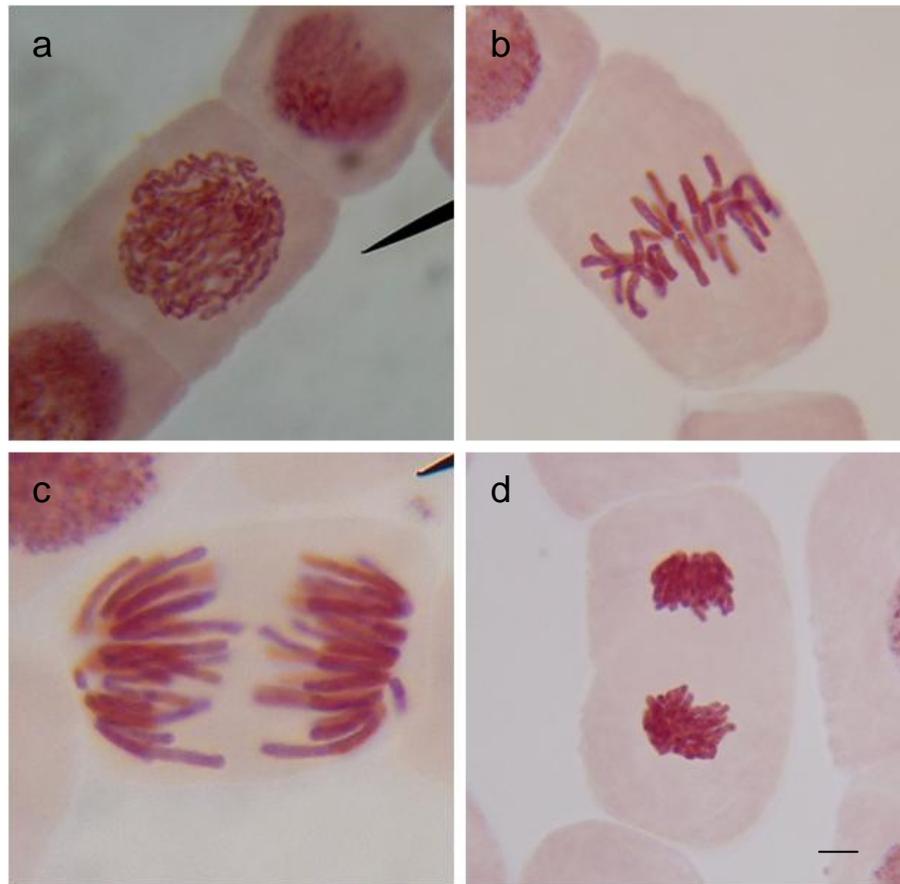


Figura 25. Células mitóticas en meristemas radicales de *Allium cepa* sometidos a condiciones experimentales normales (H_2O_d – tratamiento control). a: profase, b: metafase, c: anafase y d: telofase. Barra = 10 μm .

Al aplicar un ANOVA multifactorial para el índice mitótico se tiene que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los efectos principales (extracto, concentración y tiempo) evaluados (Figura 26), obteniéndose un valor f-cal para el factor extracto de 1,35 ($p > 0,05$), para la concentración un f-cal de 1,96 ($p > 0,05$) y para el tiempo un f-cal 1,57 ($p > 0,05$). Resultados similares fueron determinados por Andrioli (2011) al evaluar los efectos del metronidazol

en meristemas de *A. cepa*, hallando para el índice mitótico diferencias no significativas entre los factores evaluados.

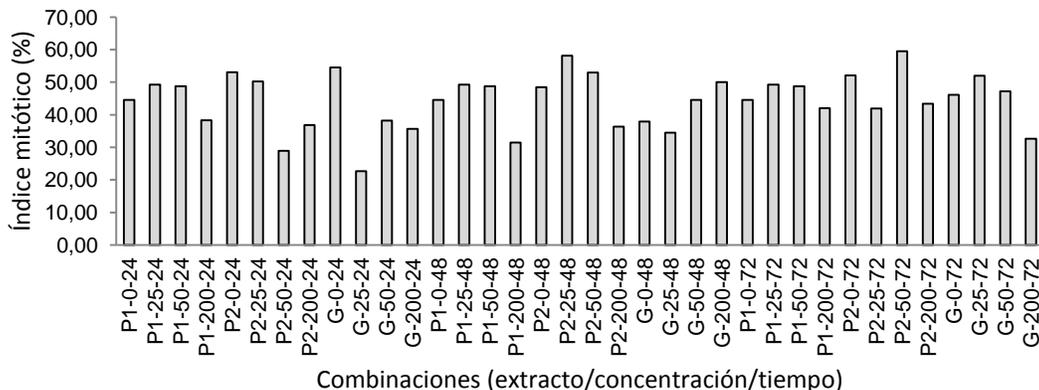


Figura 26. Índice mitótico en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición a extractos de *Aloe vera*. P1: acíbar deshidratado “producto 1”, P2: acíbar deshidratado “producto 2”, G: gel fresco. 0, 25, 50 y 200: porcentaje de la CE₅₀. 24, 48 y 72: tiempo de exposición (horas). Promedio de tres repeticiones.

Para el índice de profase, se obtiene una interacción significativa entre la concentración y el tiempo con un f-cal de 3,99 ($p \leq 0,05$). La mayor proporción de células profásicas se visualizaron en las combinaciones 50%/24h, 200%/24h, 25%/72h, 50%/72H y 200%/72h, siendo estos estadísticamente similares pero diferentes al resto de los tratamientos, y un índice de profase menor se visualizó en el tratamiento 0%/24h (Figura 27). Del mismo modo, al cabo de 24 h se generó un aumento para este índice que luego disminuyó a las 48 h y que finalmente en un tiempo superior (72 h) hubo como especie de una recuperación.

En esta fase mitótica (profase) se establecieron los mayores índices para cada uno de los tratamientos. Resultados similares fueron obtenidos por Cano *et al.* (2002) al evaluar los efectos de extractos de *Lepidium meyenii* Walp sobre la mitosis de *A. cepa*, empleando este sistema hidropónico y obteniéndose índices de profases superiores al resto de las fases, e incluso, de un control negativo constituido por agua.

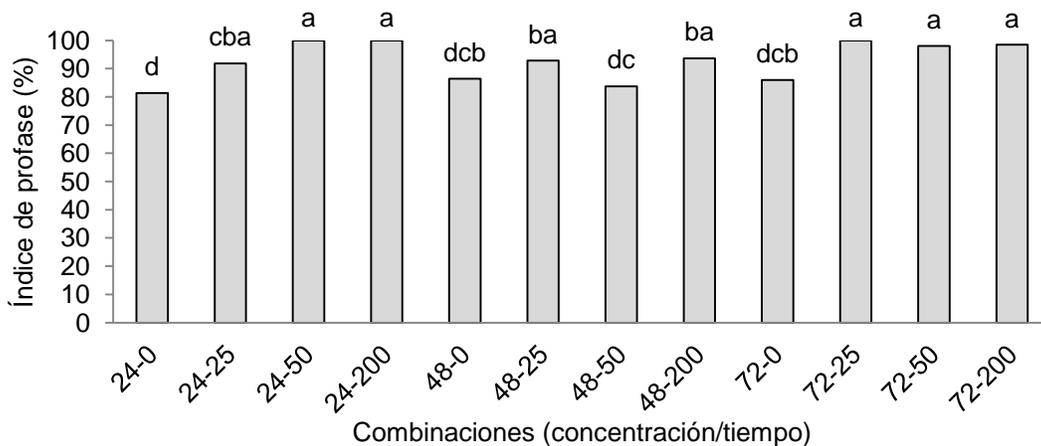


Figura 27. Índice de profase en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición a extractos de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). 0, 25, 50 o 200: porcentaje de la CE_{50} . 24, 48 o 72: tiempo de exposición (horas). Promedio de tres repeticiones y cuatro soluciones de cultivo.

El índice de metafase, por su parte, arrojó diferencias significativas en los efectos principales del factor concentración con un valor f-cal de 10,40 ($p \leq 0,05$), hallándose el mayor índice de metafase a 0 % de la CE_{50} , siendo este estadísticamente distinto al resto de las concentraciones. A medida que aumentó la concentración se generó una disminución de este índice, pero que no llegó a ser significativa en estas concentraciones (25, 50 y 200 %) (Figura 28).

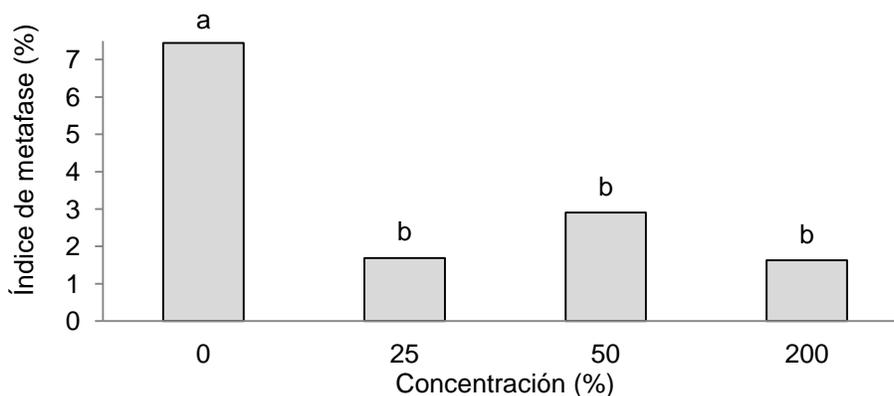


Figura 28. Índice de metafase en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones de extractos de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones, cuatro soluciones de cultivo y tres tiempos de exposición.

Una tendencia similar se precisó en el índice de anafase, determinándose diferencias significativas entre las concentraciones con un f-cal de 12,32 ($p \leq 0,05$), siendo la concentración de 0 % donde se localizó el mayor índice de anafase y en concentraciones superiores el menor índice con similitud estadística entre ellos, pero diferentes al control (Figura 29). Asimismo, es importante mencionar que el mayor índice de anafase se obtuvo a las 48 h de exposición con un f-cal: 8,85 ($p \leq 0,05$) e índices de anafases similares a las 24 y 72 h, no llegando a ser significativamente diferentes entre ellos (Figura 30).

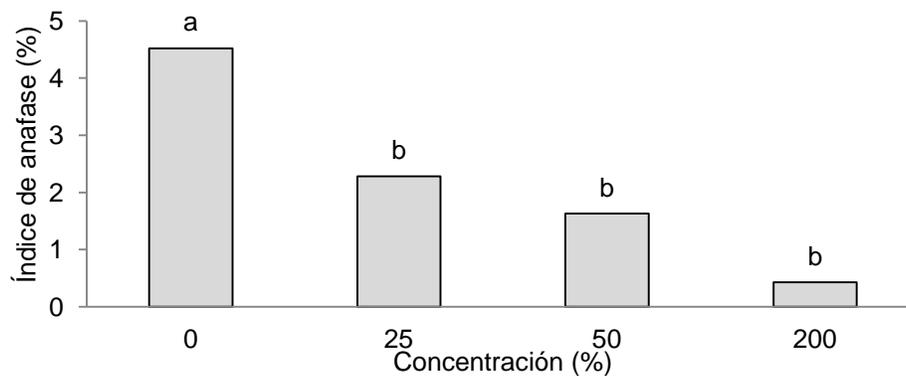


Figura 29. Índice de anafase en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones de extractos de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones, cuatro soluciones de cultivo y tres tiempos de exposición.

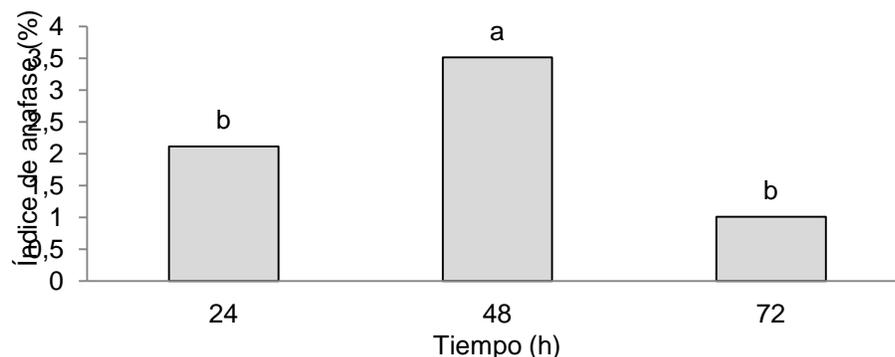


Figura 30. Índice de anafase en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes tiempos de exposición a extractos de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones, cuatro soluciones de cultivo y cuatro concentraciones.

En el índice de telofase se obtuvieron diferencias significativas en la concentración y el tiempo, generándose una interacción doble entre ambos factores (f-cal 3,02, $p \leq 0,05$). El mayor índice de telofase se estableció en los tratamientos de concentración 0 % al cabo de 24 h y 50 % a las 48 h (Figura 31).

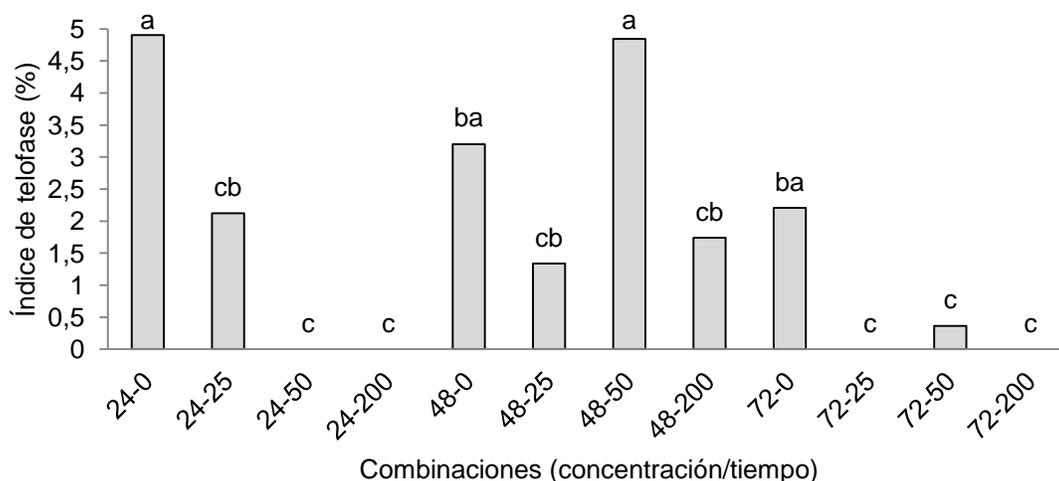


Figura 31. Índice de telofase en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición a extractos de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). 0, 25, 50 o 200: porcentaje de la CE_{50} . 24, 48 o 72: tiempo de exposición (horas). Promedio de tres repeticiones y cuatro soluciones de cultivo.

Los menores índices de telofases se determinaron a las 24 h en las concentraciones de 50 % y 200 % y al transcurrir 72 h en las concentraciones de 25, 50 y 200 %, respectivamente, independientemente de los extractos. También se logra denotar que en concentraciones más altas de los extractos, bien sea a las 24, 48 o 72 h de exposición, se visualizan índices de telofases inferiores con respecto al resto de los tratamientos experimentales y del control.

A pesar de que el análisis de varianza aportó que no existen diferencias significativas en el índice mitótico, por lo cual no existe un efecto directo sobre este índice en general, si se ve afectado cada uno de sus componentes (fases mitóticas). Estos resultados pueden ser atribuidos a un efecto sobre la formación de la fibra del huso mitótico por la posible reactividad de las concentraciones aplicadas de los extractos en la tubulina, lo cual puede

ralentizar el proceso mitótico y por tal motivo se contabiliza el mayor número de células en profase (Ilbas *et al.*, 2012, Sharma y Vig, 2012).

Asimismo, existe una regulación y mecanismos moleculares que intervienen como puntos de control en la transición de las células al pasar por cada una de las fases mitóticas, ello con el fin de asegurar que al final de la mitosis se dé lugar a dos células hijas con la misma información genética que la célula madre. Alteraciones en estos centros pueden conllevar a que los procesos de transcripción y traducción, para que se lleve a cabo la desorganización de la envoltura nuclear que facilita el paso de una célula en profase hacia metafase, se vean afectados, por lo cual puede generarse un estancamiento celular en la primera etapa del proceso mitótico que finalmente conduce a que la gran mayoría de las células en división no transiten al resto de las fases. Esto explica que al llevar a cabo un estudio microscópico se contabilice un porcentaje superior de células profásicas con respecto al resto de las fases (Cano *et al.*, 2002).

De igual manera, diferentes alteraciones mitóticas fueron contabilizadas en los distintos tiempos, determinándose a las 24 h de exposición los fragmentos como una de las alteraciones más recurrentes principalmente en el tratamiento correspondiente al producto naturista 1 al 50 % con una frecuencia de 1,07 %, seguido de la presencia de micronúcleos para esta misma condición experimental (Figura 32) con una frecuencia de 0,71 % (Tabla 3).

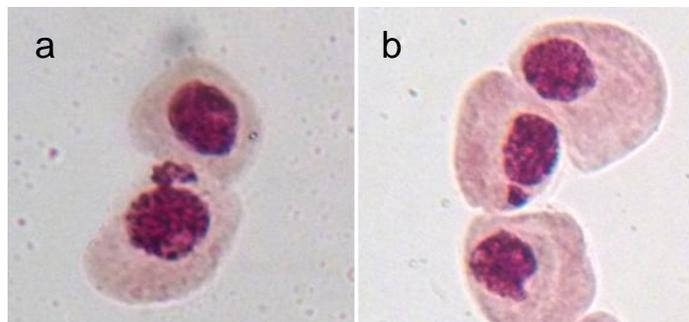


Figura 32. Anormalidades mitóticas más frecuentes en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a un extracto de *Aloe vera* (producto naturista 1) a una concentración de 50 % respecto a la CE₅₀ a las 24 h de exposición. a: fragmento y b: micronúcleo.

Se determinó para este mismo tiempo (24 h), anomalías como c-metafases, anafases alteradas, micronúcleos y “estekinesis” para el extracto del producto 1 al 25 % (Figura 33), aunque con menor frecuencia que las antes descritas, así como también, micronúcleos para este mismo extracto a una concentración de 200 % y “estekinesis” para el producto comercial 2 al 25 % (Figura 34), pero con valores de frecuencia inferiores (Tabla 3).

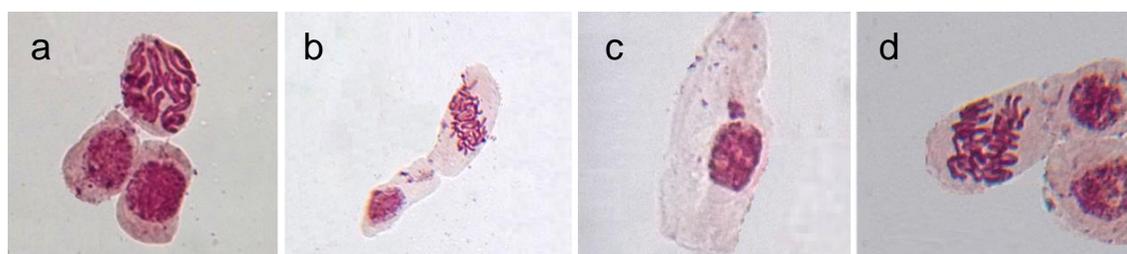


Figura 33. Anormalidades mitóticas en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a un extracto de *Aloe vera* (producto naturista 1) a una concentración de 25 % respecto a la CE_{50} a las 24 h. a: c-metáfase, b: “estekinesis”, c: micronúcleo, d: anafase alterada.

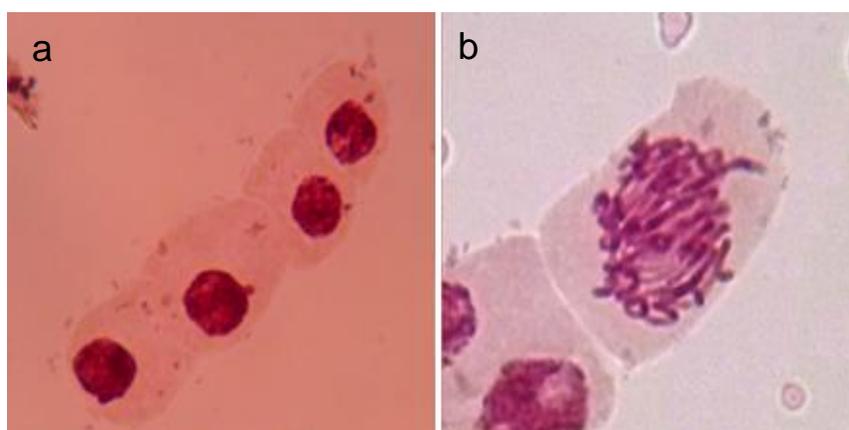


Figura 34. Anormalidades mitóticas de baja frecuencia en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a dos productos naturistas de *Aloe vera* por 24 h. a: micronúcleos en el producto 1 al 200 % de la CE_{50} y b: “estekinesis” en el producto 2 al 25 %.

En tiempos superiores (48 h) se determinó con mayor frecuencia (3,08 %) a las anafases estelares para el extracto concerniente al producto 2 al 25 %, seguido de los micronúcleos (3,00 %) y c-metafases (2,25 %) para el producto comercial 1 al 50 % de la CE_{50} (Figura 35). Asimismo, otras alteraciones como:

cromosomas rezagados (Figura 36), rupturas cromosómicas, fragmentos (Figura 37), anafases alteradas (Figura 38) y “estekinesis” fueron observadas en este tiempo para cada uno de los tratamientos (Figura 39), pero con una menor frecuencia (Tabla 3).

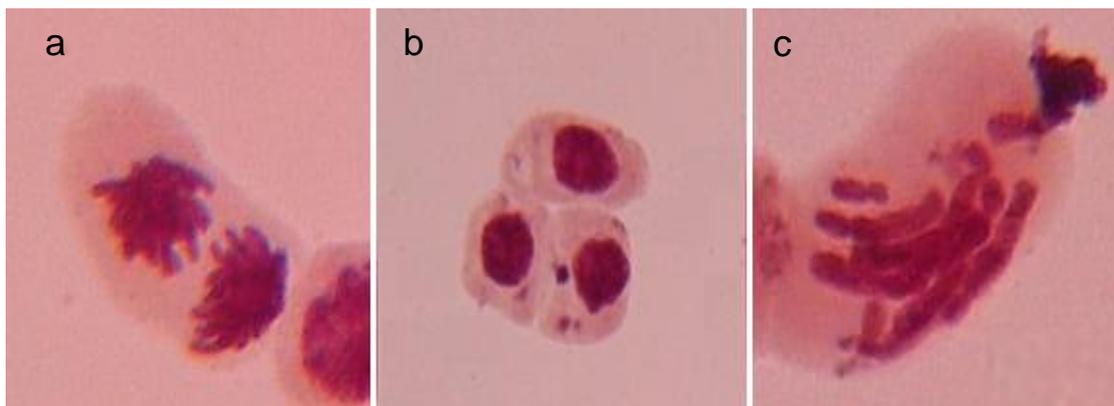


Figura 35. Anormalidades mitóticas más frecuentes en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a extractos de *Aloe vera* a las 48 h de exposición. a: anafase estelar en el producto 2 al 25 % de la CE_{50} , b y c: micronúcleos y c-metafase en el producto naturista 1 al 50 %.

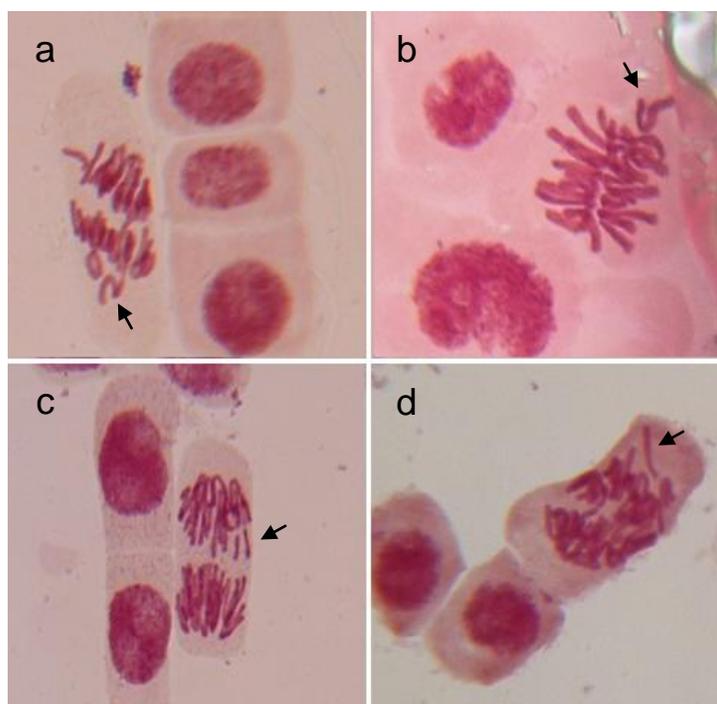


Figura 36. Cromosomas rezagados en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a extractos de *Aloe vera* por 48 h de exposición. a: producto 2 al 50 % de la CE_{50} , b: producto 2 al 200 %, c y d: gel 25 % y gel 50 %. La flecha señala la anomalía.

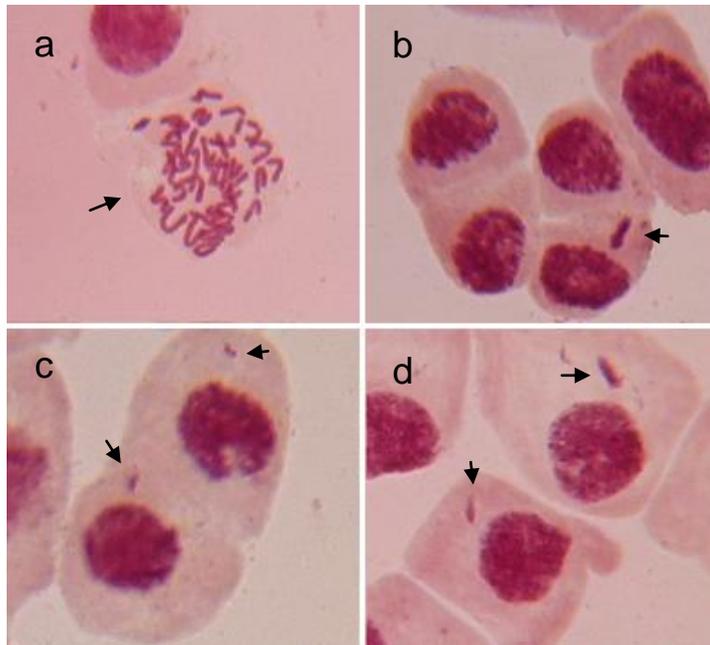


Figura 37. Anormalidades mitóticas en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a extractos de *Aloe vera* por 48 h de exposición. a: rupturas cromosómicas en producto 2 al 25 % de la CE₅₀, b: fragmento en producto 1 al 50 %, c: fragmentos en el producto 2 al 25 % y d: fragmentos en gel 25 %. La flecha señala la alteración.

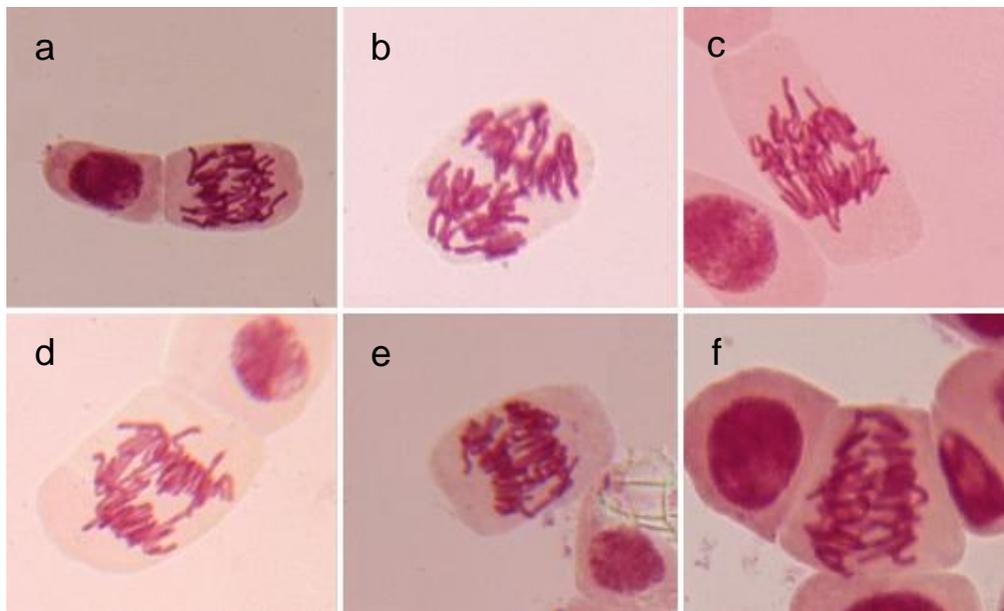


Figura 38. Anafases alteradas en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a extractos de *Aloe vera* por 48 h de exposición. a: producto 1 al 200 %, b: producto 2 al 25 %, c: producto 2 al 50 %, d: producto 2 al 200 %, e: gel 25 % y f: gel 50 %.

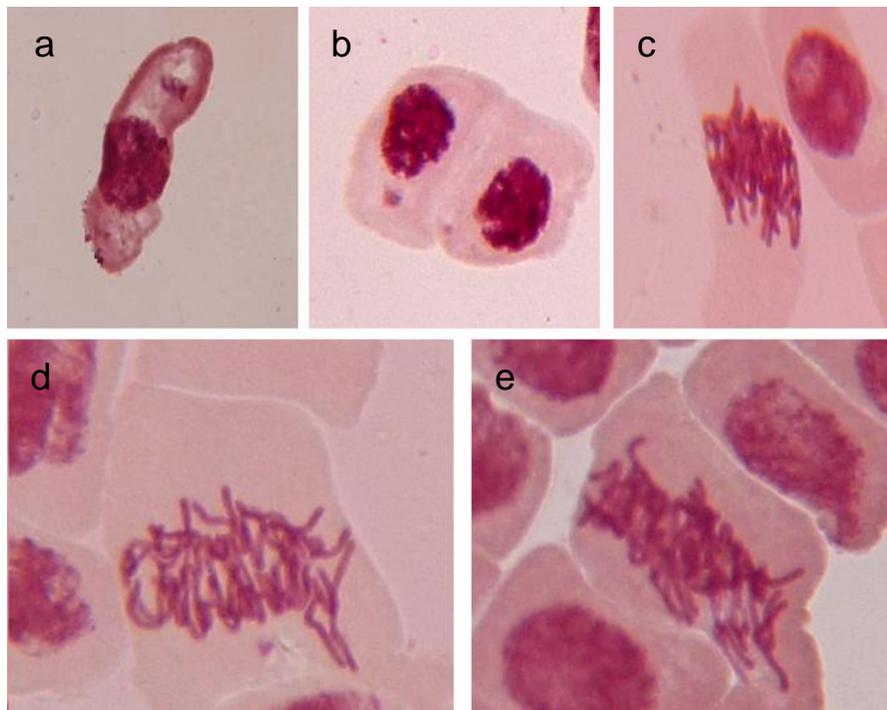


Figura 39. Anormalidades mitóticas en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a extractos de *Aloe vera* por 48 h de exposición. a: micronúcleos en producto 2 al 200 % de la CE₅₀, b: micronúcleos en gel 25 %, c: “estekinesis” en producto 2 al 50 %, d: “estekinesis” en el producto 2 al 200 % y e: “estekinesis” en gel 50 %.

A las 72 h de exposición la c-metáfase fue la alteración con mayor frecuencia (2,09 %) para el tratamiento con el producto naturista 1 al 200 % de la CE₅₀ (Figura 40) y otras de menor frecuencia en gel 200 % (0,99 %) y 0,56 % en el producto 1 al 25 % (Figura 41).



Figura 40. C-metáfase en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas al producto naturista 1 al 200 % de la CE₅₀ por 72 h de exposición.

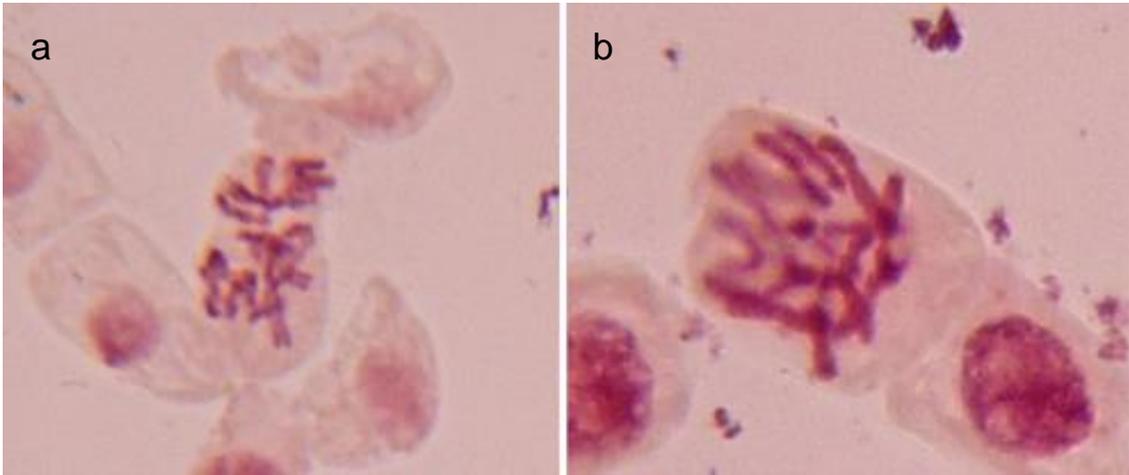


Figura 41. C-metafases en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a extractos de *Aloe vera* por 72 h. a: gel al 200 % de la CE₅₀ y b: producto 1 al 25 %.

Tabla 3. Frecuencia de anomalías mitóticas halladas en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a distintas concentraciones de extractos de *Aloe vera* por tres periodos de tiempo (24, 48 y 72 h).

Tiempo	Extractos	Conc. (%)	N de células	Anormalidades (%)								
				C-m	CR	RC	Frag.	Mn	AA	AE	Estek.	
24 h	Control	0	229	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Producto 1	25	572	0,17	-	-	-	0,17	0,17	-	-	0,17
	Producto 1	50	280	-	-	-	1,07	0,71	-	-	-	-
	Producto 1	200	489	-	-	-	-	0,61	-	-	-	-
	Producto 2	25	349	-	-	-	-	-	-	-	-	0,29
	Producto 2	50	168	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Producto 2	200	470	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gel	25	219	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gel	50	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gel	200	177	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 h	Control	0	254	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Producto 1	25	258	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Producto 1	50	133	2,25	-	-	0,75	3,00	-	-	-	-
	Producto 1	200	319	-	-	-	-	0,31	0,31	-	-	-
	Producto 2	25	130	-	-	0,76	1,54	-	1,54	3,08	-	-
	Producto 2	50	176	-	1,14	-	-	-	1,34	-	-	0,57
	Producto 2	200	204	-	0,98	-	-	-	1,96	-	-	0,98
	Gel	25	238	-	1,68	-	0,84	0,42	1,68	-	-	-
	Gel	50	371	-	0,53	-	-	-	0,27	-	-	0,27
	Gel	200	125	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72 h	Control	0	279	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Producto 1	25	177	0,56	-	-	-	-	-	-	-	-
	Producto 1	50	167	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Producto 1	200	143	2,09	-	-	-	-	-	-	-	-
	Producto 2	25	129	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Producto 2	50	108	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Producto 2	200	86	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gel	25	167	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gel	50	167	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gel	200	202	0,99	-	-	-	-	-	-	-	-

Conc: concentración, N de células: número de células en división, C-m: c-metáfase, CR: cromosomas rezagados, RC: rupturas cromosómicas, Frag: fragmentos, Mn: micronúcleos, AA: anafases alteradas, AE: anafases estelares y Estek: "Estekinesis".

La presencia de ciertas anomalías como micronúcleos y rupturas cromosómicas puede llegar a simbolizar patrones de efectos genotóxicos. El hallazgo de micronúcleos en la presente investigación puede venir dado por errores en el proceso de división celular debido principalmente a rupturas de segmentos cromosómicas que no comprenden secuencias de actividad céntrica, errores durante la replicación, posterior división del material genético y la concurrencia de sustancias tóxicas que pueden afectar directamente el ADN (Zalacaín *et al.*, 2005).

Türkoglu (2007) reseña que los micronúcleos son el resultado de fragmentos acéntricos o de cromosomas rezagados que no se incorporaron a los núcleos de las células hijas durante la telofase mitótica, generándose de esta forma un núcleo de menor tamaño, el cual puede desaparecer o persistir y en donde pueden encontrarse genes de gran importancia para la planta. Este tipo de fragmentos fueron registrados también por Mercykutty y Stephen (1980) al evaluar los efectos de la adriamicina (antibiótico) en meristemas radicales de *A. cepa*, interpretando que dichas aberraciones cromosómicas pudieron haber sido el punto de origen de los micronúcleos, los cuales pueden llegar a desaparecer o persistir en el ciclo celular.

Por otra parte, las alteraciones como la c-metafase y los cromosomas rezagados pueden ser el resultado de los efectos directos sobre la formación de la fibra del huso mitótico al verse afectada la síntesis de la proteína responsable del plegamiento de las fibras al cromosoma (Sharma y Vig, 2012). Estas alteraciones ya habían sido observadas en el estudio de Mercykutty y Stephen (1980), en donde la c-metafase fue una de las afectaciones encontradas con mayor frecuencia, confiriéndole principalmente su origen a la inhibición de la síntesis de ciertas proteínas durante este proceso.

Del mismo modo, El-Ghamery y Mousa (2017) sugieren que la c-metafase puede surgir por la presencia de una sustancia que altere los procesos del movimiento cromosómico mediante la regulación de la polimerización y despolimerización de los microtúbulos, lo cual puede detener el

proceso mitótico, es decir, se interrumpe el avance del proceso en metafase y esto genera cromosomas diseminados y con un alto grado de condensación, similar a lo observado en la presente investigación.

Yajía *et al.* (1997), destacan a las c-metafases como un fenómeno generado principalmente por la concentración química de un producto en particular y la aparición de la misma es un indicador sensible de efecto genotóxico. Casimiro *et al.* (2009), indican que la c-metafase representa un bloqueo del ciclo celular al verse inactivado parcialmente el huso mitótico.

De igual manera, los cromosomas rezagados pueden deberse a fallas en los mecanismos asociados al movimiento de los cromosomas, lo que impide consecuentemente el desplazamiento del mismo hacia cualquiera de los polos de la célula (Türkoglu, 2007).

Restrepo *et al.* (2012) señalan que las afectaciones como rupturas cromosómicas se producen por efectos clastogénicos; mientras que los cromosomas rezagados y las c-metafases son consecuencias de efectos aneugénicos. Alteraciones similares, aunque en muy baja frecuencia, fueron observados en esta investigación, al poner en contacto los meristemas radicales de *A. cepa* con los extractos de *A. vera*, principalmente los derivados del acíbar deshidratado.

Türkoglu (2007), al evaluar la genotoxicidad de cinco conservantes de alimentos, reconoció a las rupturas cromosómicas como una de las afectaciones clastogénicas encontradas, detallando que además de existir un efecto por parte de la sustancia sobre los cromosomas, también se origina un efecto directo sobre el ADN.

La prueba de *A. cepa* ("*Allium*-test"), ha ganado con el pasar de los años gran credibilidad, confiabilidad y, hoy en día, ha sido ampliamente utilizada para estimar y evaluar los posibles efectos genéticos y citológicos que pueden ocasionar una gran diversidad de sustancias sobre un organismo vivo. El estudio mitótico ha sido uno de los más empleados, al igual que el morfológico; no obstante, varios investigadores han sugerido el análisis cromosómico

adicional para confirmar alteraciones en el cariotipo de dicha especie (Sharma y Sharma, 1999; Singh, 2003).

En la presente investigación, se estableció además del análisis mitótico, una evaluación al cariotipo de la especie vegetal, caracterizada principalmente por poseer 16 cromosomas somáticos de gran tamaño y muy simétricos ($2n = 2x = 16$), evidenciándose en el control (0 % de la CE_{50}), cromosomas sin rasgos de pegajosidad, separados, turgencia a nivel celular, cromatina en estado de condensación y sin ninguna alteración aparente (Figura 42).



Figura 42. Cariotipo de *Allium cepa* bajo condiciones experimentales normales (control negativo - H_2O_d). Barra 10 μm .

Aspectos diferentes fueron visualizados en el cariotipo de la misma especie vegetal cuando fue sometida a los extractos de *Aloe vera*, llegando incluso, a no observar cromosomas en algunos tiempos de exposición.

A las 24 h de tratamiento en el extracto correspondiente al laxante naturista 1 se hallaron células con cromosomas en las concentraciones de 25 y 50 %, denotándose para cada uno de ellos los 16 cromosomas esperados ($2x=2n=16$), por lo cual se estima que no se vio afectado el número en los mismos, pero si se llegó a observar cierto grado de pegajosidad en la concentración más baja (Figura 43) cuyo signo fue más drástico a una concentración intermedia acompañado de cierta fragmentación en algunas zonas de los cromosomas (Figura 44).



Figura 43. Cariotipo de *Allium cepa* una vez que los meristemas radicales fueron expuestos al extracto correspondiente al producto naturista 1 al 25% por 24 h de exposición. Barra 10 μ m.

A una concentración más alta de este extracto (200 % de la CE_{50}), no se observaron cromosomas evaluables en ninguna de las células analizadas. Para este mismo tiempo (24 h) en el producto naturista 2 a una concentración de 25 % de su CE_{50} , se observaron cromosomas con gran solapamiento entre sus brazos, acompañado de cierta pegajosidad, deterioro y asimetría en los mismos (Figura 45). Cabe destacar, que a una concentración intermedia (50 %) y alta (200 %) de esta sustancia no hubo presencia de cromosomas en ninguna de las células.

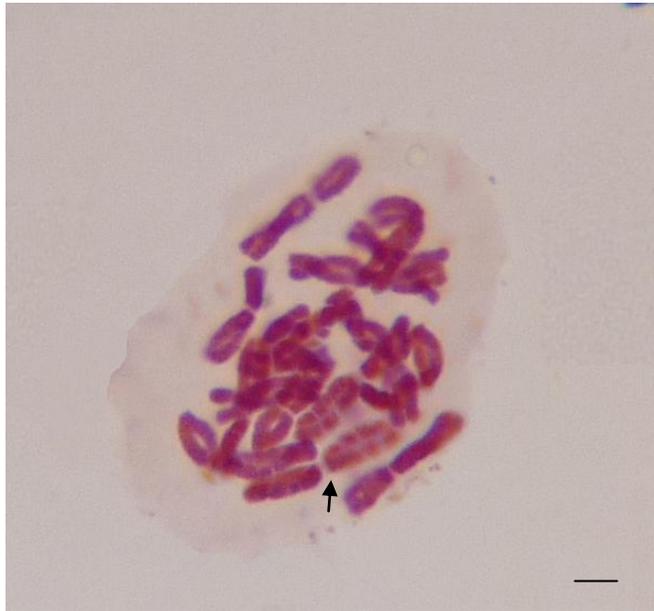


Figura 44. Cromosomas de *Allium cepa* provenientes de meristemas radicales sometidos al producto naturista 1 al 50 % de la CE₅₀. Las flechas indican zonas con cierta fragmentación. Barra 10 μ m.

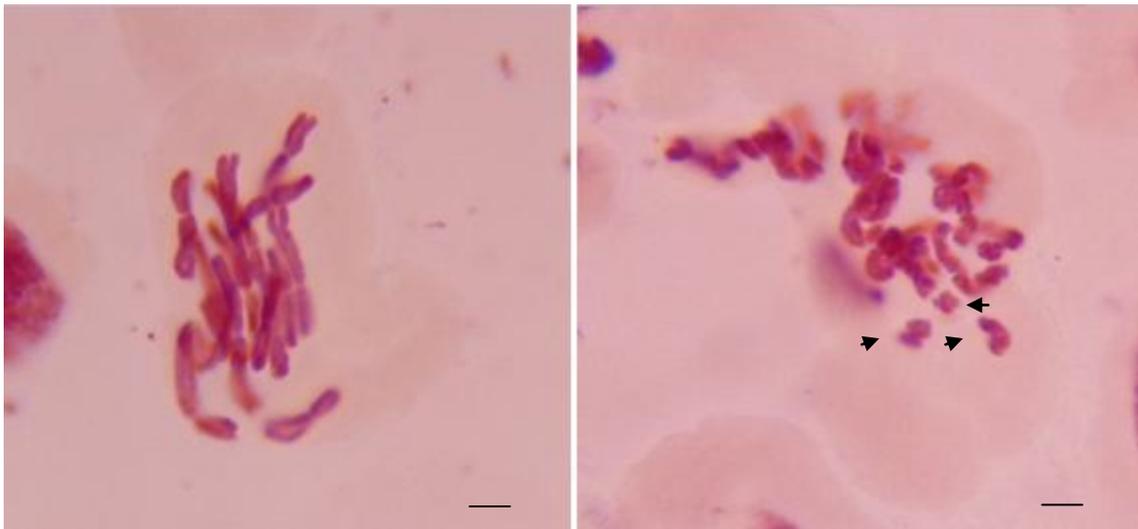


Figura 45. Cromosomas de *Allium cepa* provenientes de meristemas radicales sometidos al producto comercial 2 al 25%. Las flechas indican cromosomas asimétricos. Barra 10 μ m.

En cuanto al gel de *A. vera*, a las 24 h de estar en contacto con los meristemas radicales de *A. cepa*, no se llegó a determinar cromosomas en ninguna de las concentraciones de estudio.

En un tiempo superior (48 h) para ninguno de los tratamientos experimentales, exceptuando el control o la concentración de 0 % de la CE₅₀, se visualizaron cromosomas en ninguna de las células analizadas. Esta acción pudo estar influenciada por la poca o escasa penetración de la colchicina sobre los meristemas tratados con cada uno de los extractos, o a una ralentización de la formación de las fibras del huso mitótico y, por tanto, del proceso en general, lo que conlleva a que gran parte de las células permanezcan en una fase anterior a la metafase que es donde la cromatina alcanza el mayor grado de condensación y hace posible la visualización de cromosomas dispersos.

A las 72 h de tratamiento se precisaron cromosomas en el producto laxante 2 al 25 y 50 % de la CE₅₀. En la concentración más baja los cromosomas se distinguieron en pocas células y con mayor efecto que los vistos en un tiempo inferior de 24 h (Figura 46). Del mismo modo, en una concentración intermedia (50 %), persiste la pegajosidad divisada en una concentración y tiempo inferior (Figura 47).



Figura 46. Cromosomas de *Allium cepa* en células meristemáticas sometidas al producto comercial 2 al 25 % de la CE₅₀ por 72 h. Barra 10 μ m.

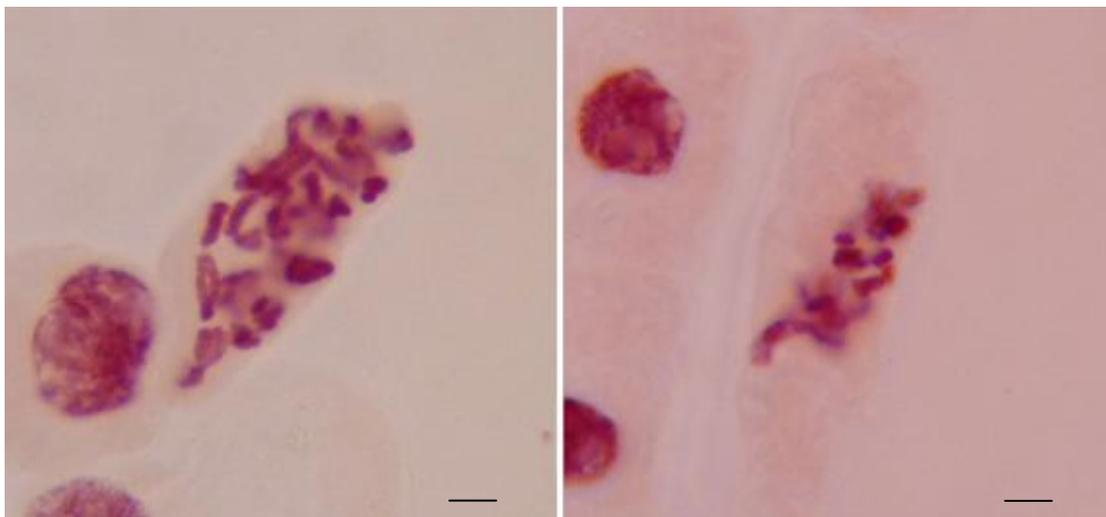


Figura 47. Cromosomas de *Allium cepa* en células meristemáticas sometidas al producto comercial 2 al 50 % de la CE_{50} por 72 h. Barra 10 μm .

Por su parte, en el extracto correspondiente al producto naturista 1 estuvieron ausentes las células metafásicas colchinizadas, es decir, no se observaron cromosomas en ninguna de las concentraciones empleadas; mientras que en el gel si se distinguieron células con cromosomas para las concentraciones de 25 % de su CE_{50} (Figura 48) y en 50 % (Figura 49), presentando rasgos similares a los antes mencionados como una cromatina pegajosa. Es importante señalar, que para todos los tratamientos y tiempos en los cuales se hallaron cromosomas, no se vio alterado el número cromosómico de la especie.

La pegajosidad en los cromosomas puede deberse a un efecto sobre las nucleoproteínas o directamente sobre la cromatina, esta alteración cromosómica se caracteriza por el agrupamiento de estos en alguna fase de la mitosis y posiblemente esta puede ser explicada por fallas en el proceso de condensación. Asimismo, los cromosomas pegajosos pueden ser el resultado del mal funcionamiento o una acción directa sobre proteínas no histónicas que están estrechamente involucradas en la organización de los cromosomas para la posterior separación de cromatidas hermanas en anafase; sin embargo, se

ha sugerido que la alteración de estas proteínas puede ser causada por efectos en los genes estructurales que codifican para ellas (Valencia *et al.*, 2013).

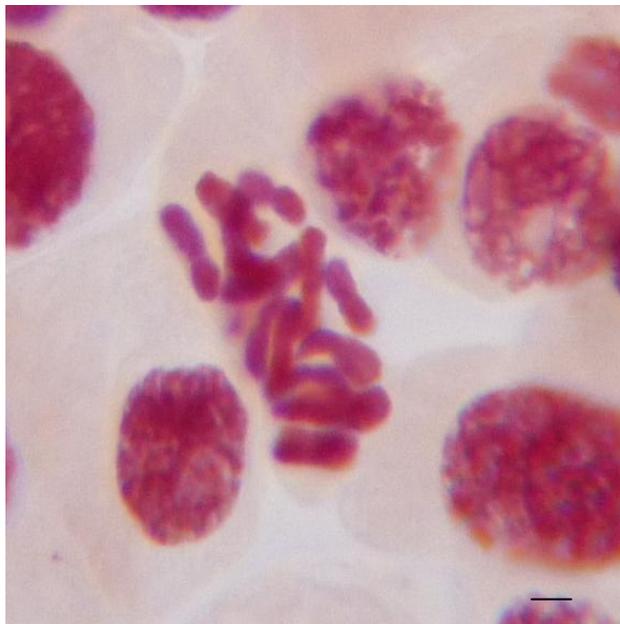


Figura 48. Células colchinizadas de meristemas radicales de *Allium cepa* sometidas a gel de *Aloe vera* al 25 % de su CE_{50} por 72 h. Barra 10 µm.

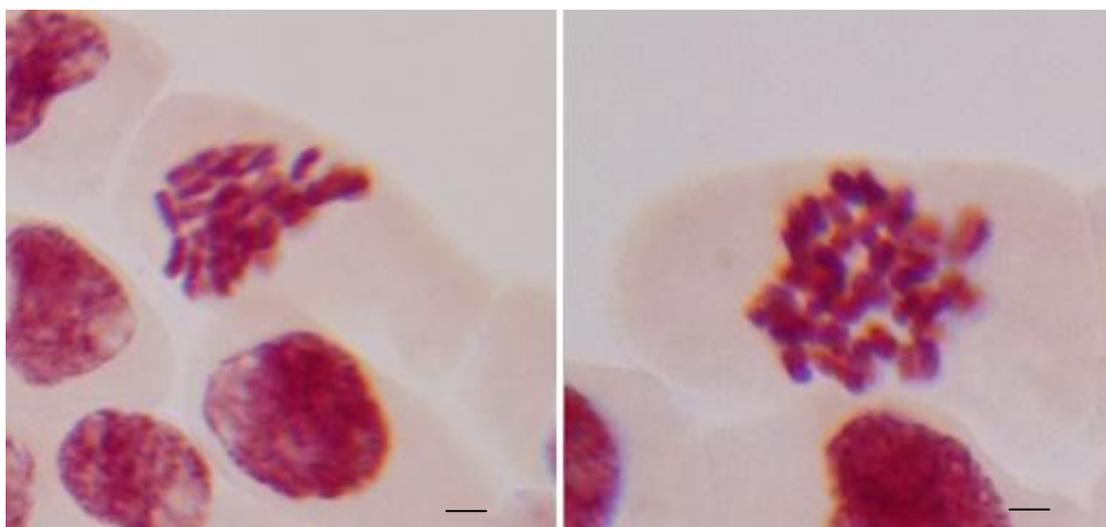


Figura 49. Cromosomas de *Allium cepa* cuyos meristemas radicales fueron sometidos a gel de *Aloe vera* al 50 % de su CE_{50} por 72 h. Barra 10 µm.

Ene-Obong y Amadi (1987) señalan que un efecto pegajoso en los cromosomas puede deberse a sustancias químicas presentes en los extractos

de plantas medicinales que favorezcan la desnaturalización del ADN y promuevan la disolución de nucleoproteínas.

A pesar de que en los distintos extractos evaluados se determinaron alteraciones tanto a nivel interfásico como mitóticas, e inclusive un efecto sobre los cromosomas, o en dado caso, sobre la cromatina que constituye al mismo, algunas de estas perturbaciones se precisaron en bajas frecuencias. De acuerdo a lo antes planteado se procedió a ampliar la fuente de los extractos y se incorporó un ensayo en el que se evaluó el acíbar fresco de esta misma planta (*A. vera*) que es empleado como exudado principal en la elaboración de productos naturistas estimuladores de la actividad gastrointestinal, promoviendo la defecación y al cual se le ha conferido posibles efectos endogenotóxicos (Imery, 2007).

Se implementaron seis concentraciones (0, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/l) y al analizar los resultados del proceso mitótico mediante un ANOVA simple se determinó diferencias significativas en el índice mitótico, aportando un f-cal de 4,14 ($p \leq 0,05$). El mayor índice mitótico se registró en el control o concentración de 0 mg/l de acíbar fresco y en la concentración de 10 mg/l, siendo estas estadísticamente similares entre ellas. Del mismo modo, los menores índices mitóticos tuvieron lugar en concentraciones más altas de este extracto (Figura 50).

Resultados similares fueron descritos por Quispe *et al.* (2010) al evaluar el efecto del sorbato de potasio (conservante) sobre meristemas radicales de *A. cepa*. En dicha investigación se sugiere que una disminución de este índice puede estar asociada a la acción que ejerce la sustancia que está siendo evaluada sobre algunos puntos de control del ciclo celular como en G_2 , en este punto pudo verse alterado la formación de los complejos Cdk1-ciclina B que son los principales responsables de la formación del factor promotor de la mitosis (FPM). Un efecto sobre este factor traería como consecuencia un bloqueo del ciclo celular que impide la transición de las células desde la fase G_2

hacia la mitosis, deteniéndose el proceso en interfase y, por tanto, disminuyendo la división celular.

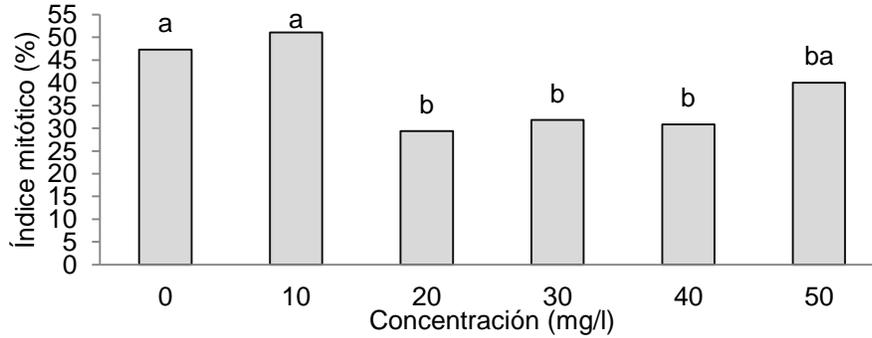


Figura 50. Índice mitótico en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas por 48 h a diferentes concentraciones de acíbar fresco de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones.

Al evaluar los índices para las distintas fases que conforman a la mitosis, se tiene que al aplicar un análisis de varianza para el índice de profase no se cumplieron los supuestos aun transformando los datos, por tanto se aplicó pruebas estadísticas no paramétrica (Kruskal-Wallis) y en ella se obtuvieron diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$. A partir de estos resultados se procedió a realizar una prueba de mínima diferencia significativa (LSD), es importante mencionar que los índices de profases para cada una de las concentraciones de acíbar estuvieron por encima del control o concentración 0 mg/l (Figura 51).

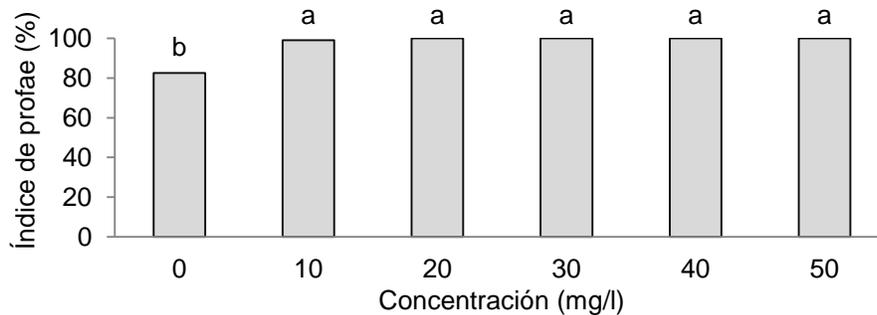


Figura 51. Índice de profase en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones de acíbar fresco de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de mínima diferencia significativa (LSD) ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones.

Para el índice de metafase, se realizó una prueba Kruskal-Wallis debido a que no hubo cumplimiento de los supuestos aun transformando los datos, el estadístico aportó diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$. El mayor valor de metafase se determinó en la concentración de 0 mg/l y un descenso del mismo a medida que aumentó la concentración de acíbar fresco a tal punto de inhibirlo por completo a partir de los 40 mg/l (Figura 52). Tendencia similar se obtuvo para el índice de anafase, con diferencias significativas según Kruskal-Wallis $p < 0,05$. Se visualizó un mayor índice de anafase en el control e inhibición de este a partir de 20 mg/l (Figura 53).

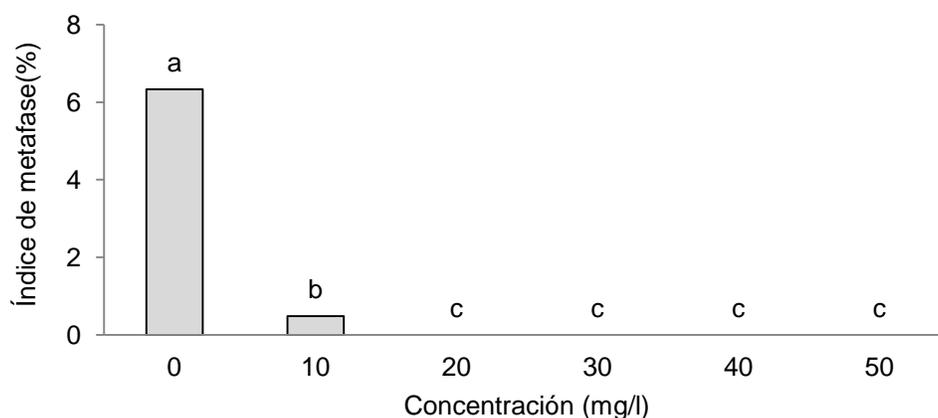


Figura 52. Índice de metafase en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones de acíbar fresco de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de mínima diferencia significativa (LSD) ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones.

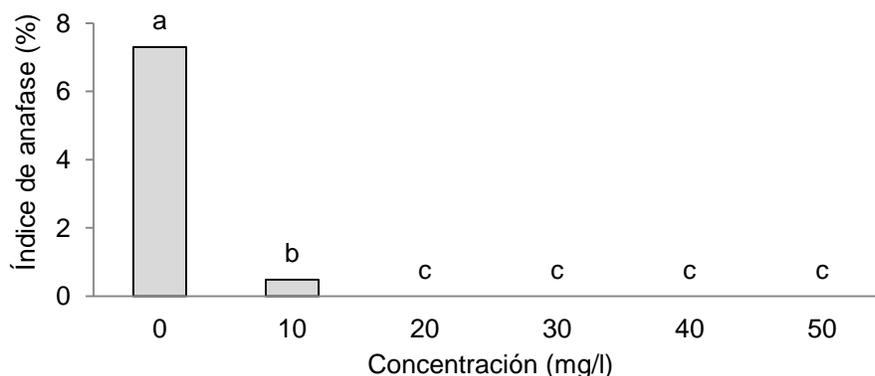


Figura 53. Índice de anafase en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones de acíbar fresco de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de mínima diferencia significativa (LSD) ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones.

En el índice de telofase, la prueba estadística Kruskal-Wallis evidenció diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las concentraciones de acíbar fresco. En la prueba de mínima diferencia significativa (LSD) se logró apreciar que la presencia de acíbar en la solución de cultivo inhibió completamente la telofase mitótica aún en la concentración más baja (10 mg/l) (Figura 54).

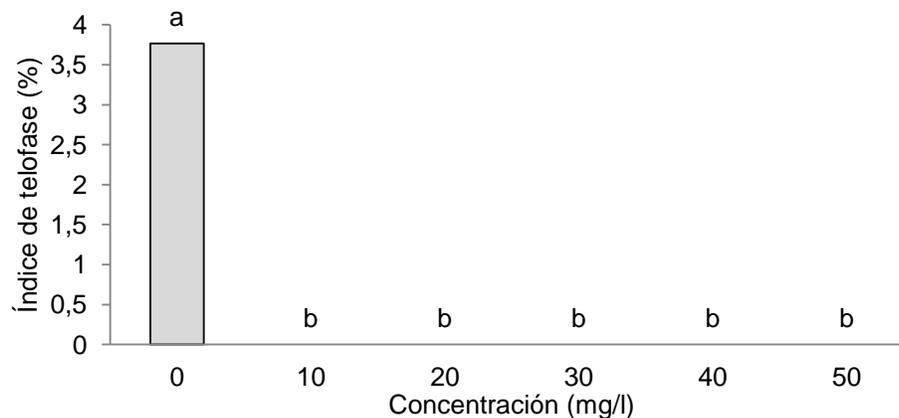


Figura 54. Índice de telofase en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones de acíbar fresco de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de mínima diferencia significativa (LSD) ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones.

Al analizar los resultados obtenidos para cada uno de los índices de fases, se puede razonar que existe un aumento en los valores profásicos con respecto al resto de las fases mitóticas (metafase, anafase y telofase). Este aspecto también fue descrito por Berrocal *et al.* (2013) al estimar los efectos de biocidas sobre raíces de *A. cepa*, y el mismo ha sido atribuido a la incidencia de estas sustancias en la formación de las fibras del huso mitótico que impide el desarrollo normal del ciclo, por lo cual las células quedan detenidas en profase sin avanzar a las demás fases, desencadenándose una disminución en sus índices.

Sumado al estudio mitótico, se determinaron áreas celulares, nucleares y citoplasmáticas, debido a ciertas alteraciones en la morfología celular. Al aplicar un ANOVA simple a las áreas celulares se hallaron diferencias significativas entre las concentraciones con un valor f-cal: 18,89 ($p \leq 0,05$). Del mismo modo,

se logró apreciar que las áreas para las concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 mg/l estuvieron por debajo del control o concentración de 0 mg/l (Figura 55).

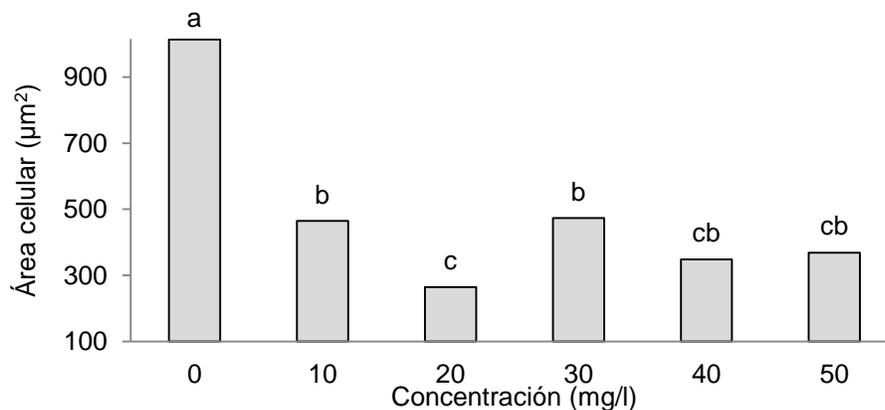


Figura 55. Áreas celulares en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones de acíbar fresco de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones.

Al estudiar las áreas nucleares se generaron diferencias significativas entre las concentraciones con un valor de f-cal: 18,15 ($p \leq 0,05$). La aplicación de acíbar fresco redujo significativamente el área nuclear de las células meristemáticas, con mayor incidencia en las concentraciones de 20, 40 y 50 mg/l (Figura 56).

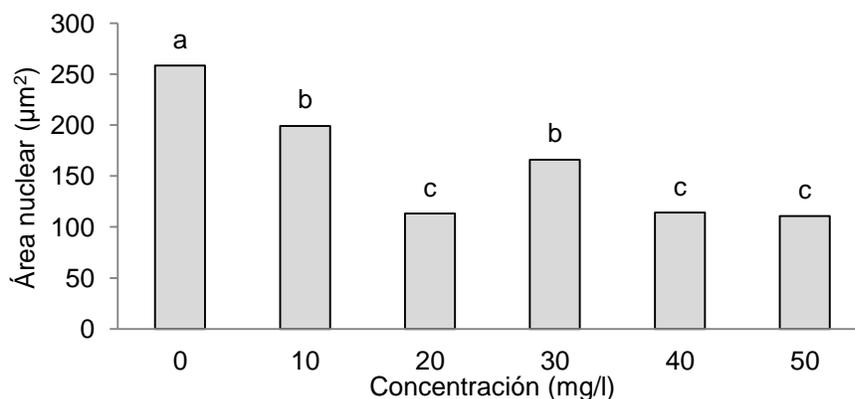


Figura 56. Áreas nucleares en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones de acíbar fresco de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones.

Finalmente, el análisis estadístico aplicado a las áreas citoplasmáticas enmarca diferencias significativas entre las concentraciones, con un f-cal: 14,81 ($p \leq 0,05$). El acíbar fresco redujo significativamente el área del citoplasma en todas las concentraciones evaluadas (10 - 50 mg/l) (Figura 57).

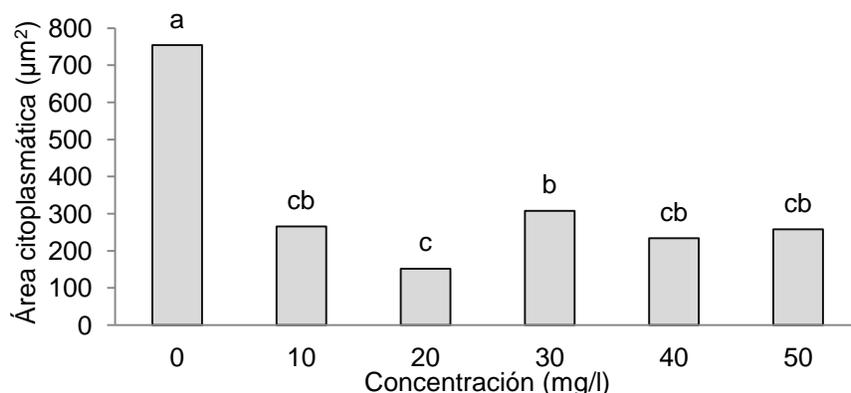


Figura 57. Áreas citoplasmáticas en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones de acíbar fresco de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones.

Se contabilizó la frecuencia de las alteraciones encontradas en el presente ensayo (Tabla 4), siendo la más recurrente los citoplasmas contraídos en todas las concentraciones, excepto la de 0 mg/l.

Tabla 4. Alteraciones mitóticas y celulares halladas en células meristemáticas de *Allium cepa* tratadas con seis concentraciones de acíbar fresco de *Aloe vera*.

Conc. (mg/l)	N de células	Alteraciones (%)				
		Mn	NR	NO	NT	CC
0	606	-	-	-	-	-
10	600	0,167	-	-	-	2,667
20	570	-	0,877	-	0,175	1,228
30	495	-	-	-	-	1,212
40	484	-	-	-	-	0,617
50	556	0,167	-	1,259	-	1,439

Conc: concentración, N de células: número total de células, Mn: micronúcleos, NR: núcleo romboide, NO: núcleo en forma de oz, NT: núcleo triangular y CC: citoplasmas contraídos.

La aparición recurrente de citoplasmas contraídos en el presente ensayo para todos los tratamientos, exceptuando al control (0 mg/l-control) corrobora

los efectos del acíbar de *Aloe vera* sobre la integridad de las células meristemáticas, estimada en este trabajo con la evaluación de las áreas celulares (Figura 58).

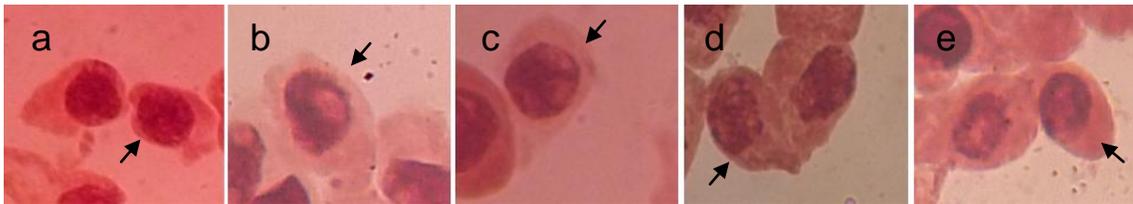


Figura 58. Citoplasmas contraídos en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a distintas concentraciones de acíbar fresco de *Aloe vera*. a: células a concentración de 10 mg/l, b: 20 mg/l, c: 30 mg/l, d: 40 mg/l y e: 50 mg/l. Las flechas señalan la alteración.

También se reconocieron alteraciones como núcleos en forma de oz, núcleos romboides, núcleos triangulares y micronúcleos, pero con menor frecuencia (Tabla 4, Figura 59).

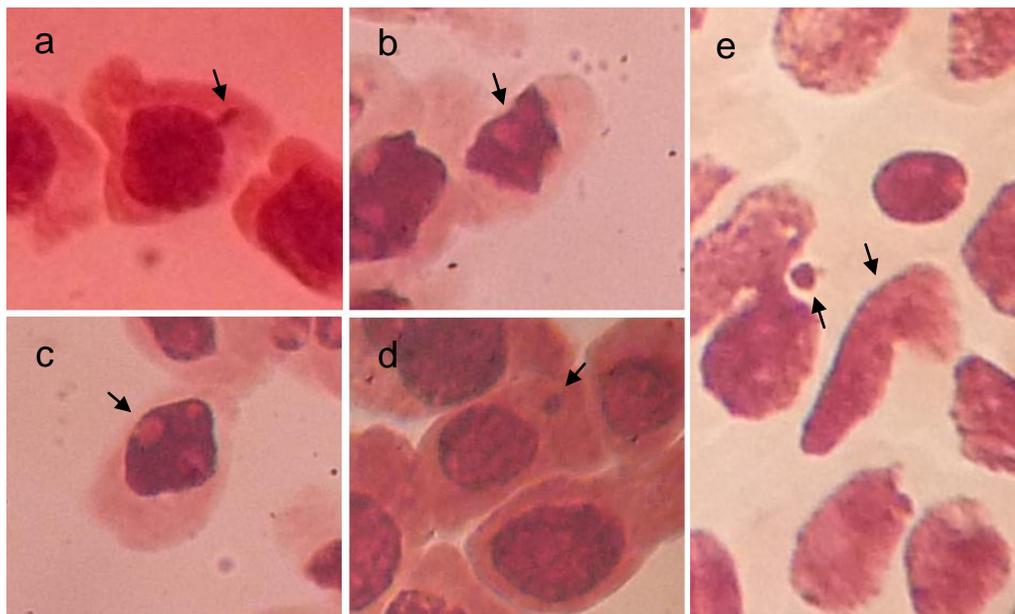


Figura 59. Alteraciones con menor frecuencia en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a distintas concentraciones de acíbar fresco de *Aloe vera*. a: micronúcleo, b: núcleo triangular, c: núcleo romboide, d: micronúcleo y e: micronúcleo y núcleo en forma de oz. Las flechas señalan la alteración.

A pesar que el ensayo realizado con acíbar fresco en concentraciones relativamente bajas (10-50 mg/l) aportó resultados informativos acerca del

posible efecto que puede acarrear su uso sobre un organismo, empleando a *Allium cepa* como modelo, fue necesario la realización de un segundo ensayo exploratorio, implementando concentraciones más altas (100, 200, 300, 400 y 500 mg/l).

Al intentar aplicar un ANOVA simple al índice mitótico se determinó el no cumplimiento de los supuestos para el análisis ortogonal y, por lo tanto, se procedió a realizar pruebas estadísticas no paramétricas (Kruskal-Wallis), refiriendo diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas ($p < 0,05$) (Figura 60).

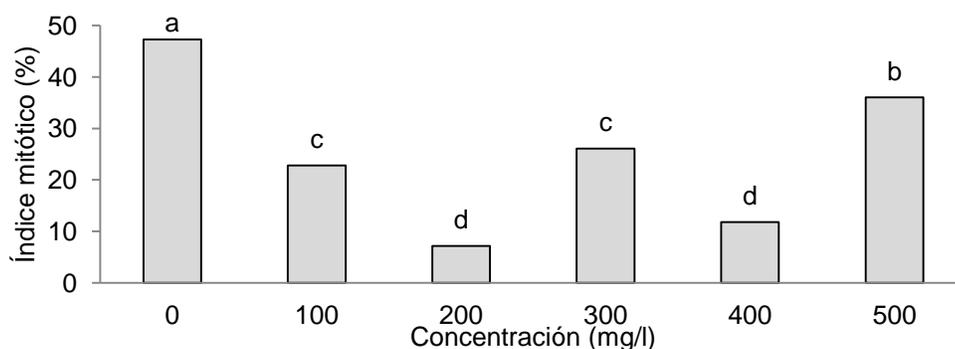


Figura 60. Índice mitótico en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a concentraciones altas de acíbar fresco de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de mínima diferencia significativa (LSD) ($\alpha = 0,05$).

Al contrastar los resultados obtenidos para el índice mitótico en el ensayo de acíbar fresco a bajas concentraciones (0, 10, 20, 30, 40 y 50 (mg/l)) con respecto a este, se tiene que incluso en la concentración más baja de este extracto (100 mg/l) en el segundo ensayo, ya existe una disminución del índice mitótico, el cual pudo estar asociado a perturbaciones ocasionadas por el extracto vegetal en los procesos celulares, específicamente en la fase G_2 del ciclo celular, en donde se adquiere la energía necesaria para que la célula pueda ingresar al proceso mitótico (Quispe *et al.*, 2010), o en la fase S al inhibir la síntesis de ADN (Celik *et al.*, 2005).

El índice de profase por su parte, proporcionó diferencias significativas al efectuar un ANOVA simple aportando un f-cal: 43,65 ($p \leq 0,05$), visualizándose

valores superiores de profases en las concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 (mg/l), siendo estas estadísticamente similares entre ellas (Figura 61).

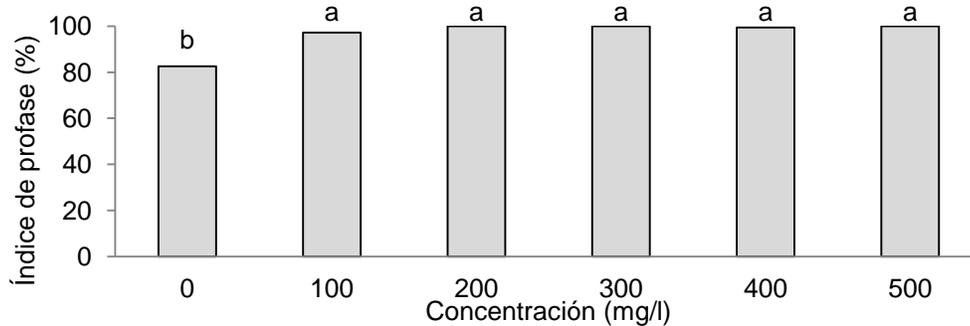


Figura 61. Índice de profase en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones altas de acíbar fresco de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones.

Al analizar el índice de metafase se obtuvieron diferencias significativas en la prueba estadística de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), evidenciándose un valor superior en el control con respecto al resto de los tratamientos (Figura 62).

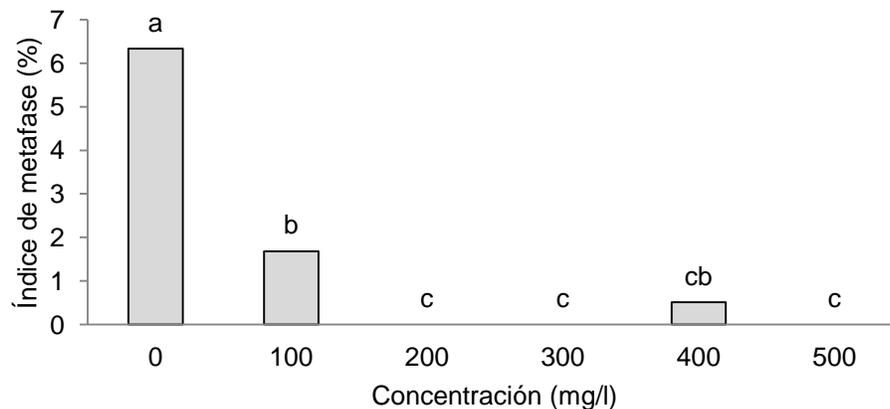


Figura 62. Índice de metafase en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones altas de acíbar fresco de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de mínima diferencia significativa (LSD) ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones.

En el índice de anafase se encontraron diferencias significativas al aplicar un análisis no paramétrico ($p < 0,05$). A través de la realización de una prueba de mínima diferencia significativa se establecen un mayor índice en el

control, seguido de la concentración de 100 mg/l e inhibición a partir de 200 mg/l (Figura 63).

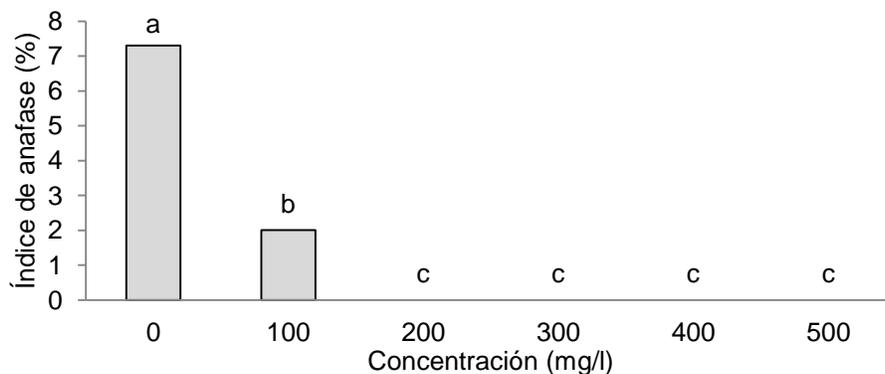


Figura 63. Índice de anafase en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones altas de acíbar fresco de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de mínima diferencia significativa (LSD) ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones.

Una tendencia similar se apreció en el índice de telofase, en el cual se obtuvieron diferencias significativas al aplicar la prueba Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). La aplicación de acíbar fresco redujo significativamente el índice de telofase a 100 mg/l y su inhibición a partir de 200 mg/l (Figura 64).

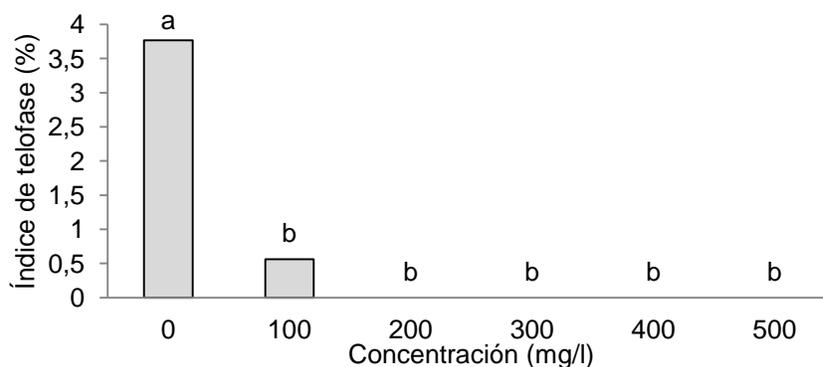


Figura 64. Índice de telofase en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones altas de acíbar fresco de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de mínima diferencia significativa (LSD) ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones.

Referente al índice de profase, un resultado similar fue planteado por Quispe *et al.* (2010), quienes argumentan que un aumento de este índice puede deberse a alteraciones en la polimerización de las fibras del huso mitótico por la

inactivación de los complejos CdK1-ciclina B, lo cual conduciría a que las células no transiten a la fase siguiente y se queden retenidas en profase.

A partir de los resultados en los índices de metafase, anafase y telofase se puede inferir que estos se relacionan con lo obtenido en el índice de profase, pues al existir un bloqueo en esta fase mitótica y, por tanto, la interrupción del ciclo mitótico normal, acarrea que un menor número de células puedan avanzar, convirtiéndose finalmente en valores inferiores para estos índices.

Al examinar las áreas celulares, nucleares y citoplasmáticas se visualizan valores por debajo de la concentración de 0 mg/l. Al llevar a cabo un ANOVA simple en las áreas celulares se denotan diferencias significativas con un valor f-cal: 15,78 ($p \leq 0,05$), siendo las concentraciones extremas (0 y 500 mg/l) las que presentaron la mayor área celular (Figura 65).

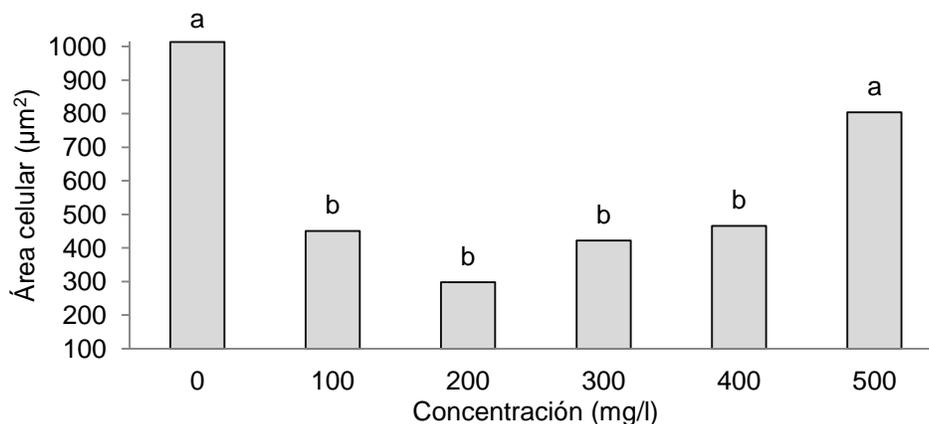


Figura 65. Áreas celulares en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones altas de acíbar fresco de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones.

Por otra parte, el análisis estadístico para las áreas nucleares establece diferencias significativas entre las concentraciones estudiadas con un valor f-cal: 11,99 ($p \leq 0,05$). Al realizar la prueba de ámbitos múltiples de Duncan, indicó que las altas concentraciones de acíbar fresco ejercen efectos estadísticamente diferentes entre sí, generando áreas nucleares por debajo del control (0 mg/l) (Figura 66).

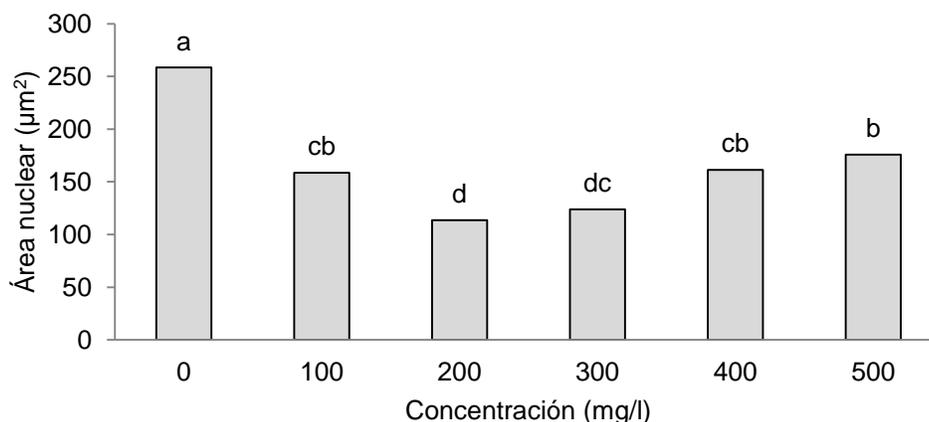


Figura 66. Áreas nucleares en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones altas de acíbar fresco de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones.

En las áreas citoplasmáticas se obtuvieron diferencias significativas al aplicar un ANOVA simple con un valor de f-cal: 15,14 ($p \leq 0,05$), obteniéndose resultados de comportamiento similar al área nuclear (Figura 67).

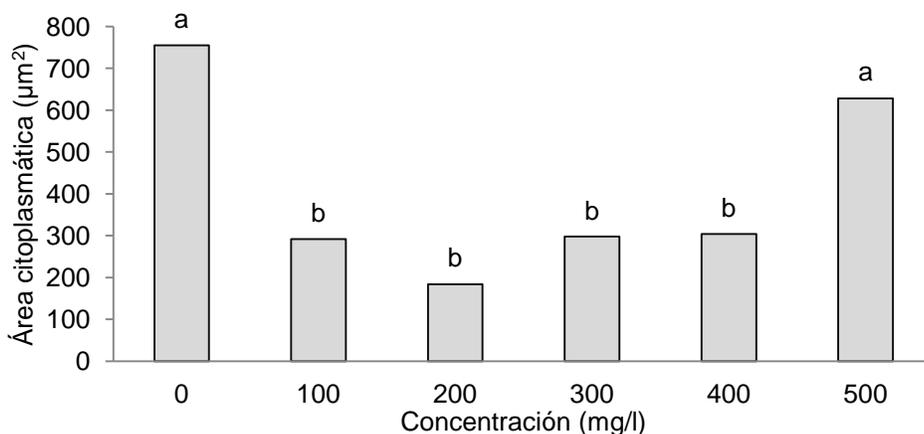


Figura 67. Áreas citoplasmáticas en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a diferentes concentraciones altas de acíbar fresco de *Aloe vera*. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones.

Además de verse afectada las distintas áreas, también se generó un efecto en la turgencia celular, corroborándose esta por la presencia de citoplasmas contraídos, lo cual explicaría la obtención de áreas citoplasmáticas inferiores para cada una de las concentraciones, experimentales exceptuando

la visualizada en el control. De igual manera, se contabilizaron las distintas alteraciones y se les determinó su frecuencia de aparición (Tabla 5).

Tabla 5. Alteraciones mitóticas y celulares halladas en células meristemáticas de *Allium cepa* tratadas sometidas a concentraciones altas de acíbar fresco de *Aloe vera*.

Conc. (mg/l)	N de células	CC	Alteraciones (%)					Mn	PA
			NO	NA	NC	NE			
0	606	-	-	-	-	-	-	-	
100	1224	3,465	-	-	-	-	-	-	
200	167	4,790	-	-	-	-	-	-	
300	585	1,880	0,171	-	-	-	-	-	
400	2277	1,054	-	-	-	-	0,395	-	
500	1413	1,203	-	0,141	0,071	0,071	-	0,071	

Conc: concentración, N de células: número total de células, CC: citoplasmas contraídos, NO: núcleos en forma de oz, NA: núcleos acorazonados, NC: núcleos en forma de "C", NE: núcleos encorvados, Mn: micronúcleos y PA: puentes mitótico en anafase.

La perturbación con mayor frecuencia vino dada por los citoplasmas contraídos (Figura 68); no obstante, se contabilizaron otras alteraciones como: núcleos en forma de oz, núcleos acorazonados, núcleos en forma de "c", núcleos encorvados, micronúcleos en las concentraciones más altas de este extracto vegetal y puentes mitóticos en anafase (Figura 69) en muy baja frecuencia. Es importante destacar que a pesar que el análisis estadístico arrojó un índice de anafase disminuido en concentraciones altas, la presencia de células en esta fase mitótica fue extremadamente baja, por lo cual no se ve reflejada en la representación gráfica.

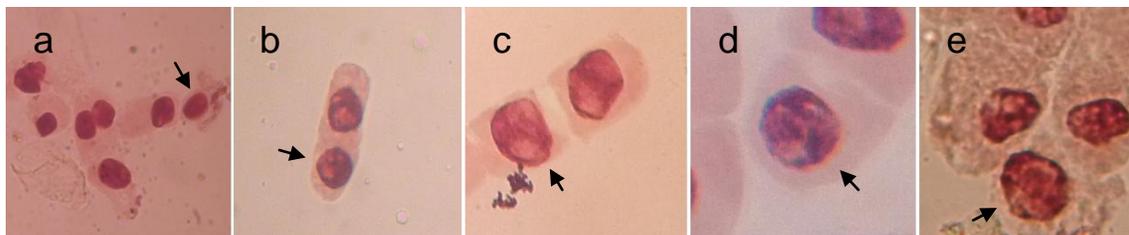


Figura 68. Citoplasmas contraídos en células meristemáticas de *Allium cepa* sometidas a cinco concentraciones altas de acíbar fresco de *Aloe vera*. a: 100 mg/l, b: 200 mg/l, c: 300 mg/l, d: 400 mg/l y e: 500 mg/l. Las flechas señalan la alteración citoplasmática.

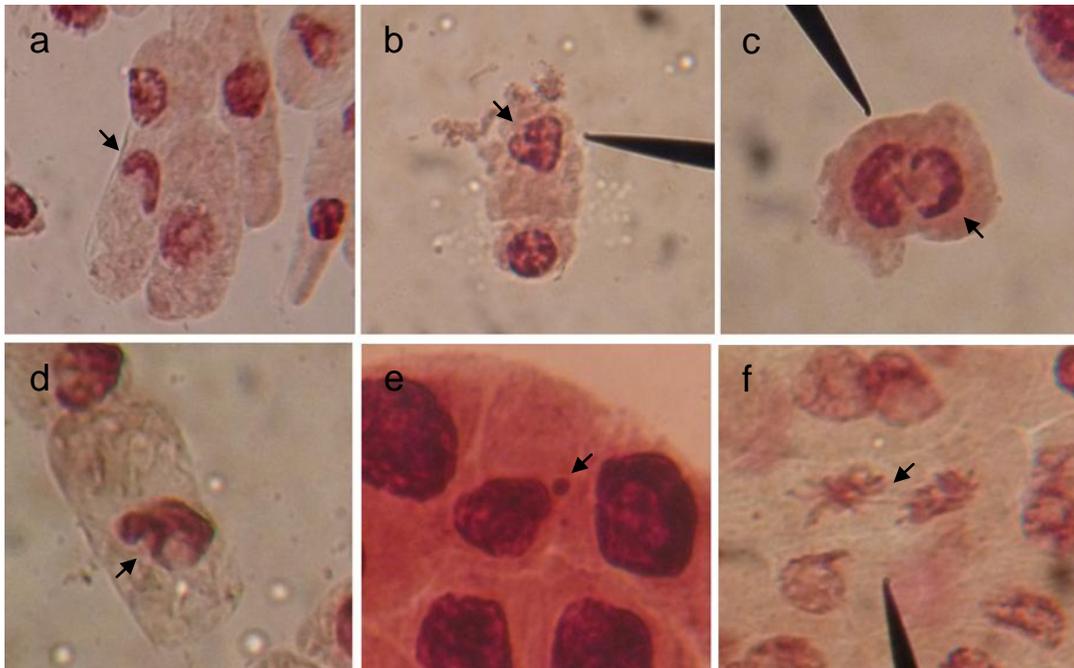


Figura 69. Alteraciones generadas en células meristemáticas de *Allium cepa* al ser sometidas a cinco concentraciones altas de acíbar fresco de *Aloe vera*. a: núcleo en forma de oz, b: núcleo acorazonado, c: núcleo en forma de "c", d: núcleo encorvado, e: micronúcleos y f: puente mitótico en anafase. Las flechas señalan la alteración.

En ambos ensayos en donde fueron probadas concentraciones bajas y altas de acíbar fresco de *A. vera* se hallaron micronúcleos. Durante años estas alteraciones han sido definidas como efectos clastogénicos en las células (Rao *et al.*, 1988), por lo tanto, se puede decir que dichas alteraciones pueden surgir por la ocurrencia de rupturas cromosómicas o cromosomas rezagados que posteriormente quedan desintegrados de los núcleos de células hijas, formando entonces un núcleo aparte de menor tamaño y los cuales pueden persistir o no, involucrando la pérdida de material genético (Nihal, 2005).

Los puentes anafásicos, al igual que los micronúcleos, son signos de efectos clastogénicos en el material genético, la presencia de estos demuestran la acción genotóxica de una sustancia sobre el organismo vegetal modelo y actividad mutacional (Yubasioglu, 2003). Soumya *et al.* (2016) establecen que los puentes pueden aparecer por rupturas cromosómicas o pegajosidad en los mismos.

El acíbar fresco de *A. vera* se le han conferido una serie de propiedades benéficas para el tratado de múltiples afecciones; no obstante, han surgido investigaciones en las cuales se le ha considerado a las antraquinonas presentes en esta planta medicinal ciertas acciones negativas sobre la propia especie vegetal, por tanto, no sería temerario pensar que las mismas pueden llegar a producir una reacción adversa sobre el individuo que lo consuma.

A partir de la presente investigación, en donde se evaluaron distintos extractos de *A. vera*, desde el gel que es uno de los exudados más utilizados hasta el acíbar en sus diferentes presentaciones (fresco y deshidratado), se pudo determinar la acción no solo celular que estos extractos ejercieron sobre una especie vegetal de alta sensibilidad (*A. cepa*), sino también efectos genéticos que involucraron posibles rupturas del material hereditario.

Mediante los resultados obtenidos es importante señalar, que un consumo excesivo y en ciertas proporciones de exudados naturales de *A. vera* puede acarrear severas consecuencias, por lo cual se sugiere la toma de precauciones y consulta de la información requerida para consumir dichos productos de forma adecuada.

CONCLUSIONES

A partir de un litro de acíbar fresco de *Aloe vera* se obtienen $86,50 \pm 0,36$ g de acíbar deshidratado. Esto presume que el producto naturista 1 requiere de $3,98 \pm 0,0163$ ml de acíbar fresco para la elaboración de su contenido en polvo ($0,34 \pm 0,0028$ g/cápsula) y el producto laxante 2 ($0,41 \pm 0,0425$ g/cápsula) amerita $4,78 \pm 0,0196$ ml de este látex vegetal.

Los deshidratados comerciales de *A. vera* resultaron con CE_{50} de 250 mg/l (producto 1) y 400 mg/l (producto 2).

El efecto morfológico sobre las raíces de *Allium cepa* por parte de los extractos de *A. vera* es notable al cabo de tiempos superiores a 24 horas de exposición.

Se generan mayores alteraciones celulares a las 24 h y 48 h de exposición en todos los extractos (gel y productos naturistas), principalmente en los deshidratados comerciales en las concentraciones de 50 y 200 %, lo cual evidencia el potencial citotóxico de las mismas. Asimismo, se visualizan mayores perturbaciones citológicas en los ensayos con acíbar fresco de *A. vera* a concentraciones altas, pero a muy bajas frecuencias.

El gel y el acíbar deshidratado no parecen afectar directamente el índice mitótico, pero sí las fases que lo conforman, del mismo modo, existe una acción directa sobre la división celular en aquellos meristemas tratados con las diferentes concentraciones de acíbar fresco de *A. vera*.

Los extractos de *A. vera* generan efectos aneugénicos y clastogénicos (indicadores de genotoxicidad) en las concentraciones evaluadas, principalmente en las dosis más altas de acíbar fresco y en los dos productos deshidratados y comercializados como laxantes.

El análisis cariológico demostró que el número de cromosomas no se ve alterado en ninguno de los tiempos de exposición para los extractos evaluados; no obstante, si se observó un efecto de inestabilidad sobre la cromatina en todas

las concentraciones donde fueron evidenciadas células con cromosomas al cabo de 72 h de exposición.

RECOMENDACIONES

Realizar un diseño experimental con más unidades experimentales y por periodos de tiempos más prolongados.

Llevar a cabo ensayos exploratorios en donde se implementen concentraciones de acíbar fresco más altas que las establecidas en la presente investigación.

Para futuras investigaciones se recomienda afinar el proceso metodológico del sistema hidropónico empleando en esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albornoz, A. e Imery, J. 2003. Evaluación citogenética de ocho poblaciones de *Aloe vera* L. de la Península de Araya, Venezuela. *Ciencia (LUZ)*, 11(1):5-13.
- Andrioli, N. 2011. Evaluación de agentes químicos con potencial genotóxico en células meristemáticas de *Allium cepa*. Trabajo de doctorado. Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Andrioli, N., Wulff, A. y Mudry, M. 2006. *Allium cepa* como biomonitor de toxicidad y genotoxicidad de metrodinazol. *Theoria*, 15(2): 9-16.
- Barnola, P. (26 de diciembre de 2016). Propiedades del acíbar. *Botanical-online*. Recuperado de: <http://www.botanical-online.com/propiedades-acibar-aloe.htm#>.
- Berrocal, A., Blas, R., Flores, J. y Siles, M. 2013. Evaluación del potencial mutagénico de biocidas (vertimec y pentacloro) sobre cebolla. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15: 17-27.
- Bosio, S. y Dail, H. 2012. Bioindicator of genotoxicity: The *Allium cepa* Test. En: Environmental Contamination. Srivastava, J. (ed)
- Cano, M., Peña, J. y González, H. 2002. Alteraciones de los índices de fases y mitótico en meristemas de *Allium cepa*, inducidas por extractos de *Lepidium Meyenii* Walp "Maca". *Revista de Facultad de Medicina Humana*, 3(1): 21-22.
- Carruyo, I., Fernández, Y., Marcano, L., Montiel, X. y Torrealba, Z. 2006. Efectos tóxicos inducidos por el plomo en meristemas radiculares de cebolla (*Allium cepa*). *Boletín del Centro de Investigaciones Biológica*, 40(3): 311-326.
- Casimiro, T., Christofolletti, D. y Marín, M. 2009. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of aneugenic agent Trifluralin herbicide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1680-1686.
- Causil, L., Coronado, J., Verbel, L., Vega, M., Donado, K. y Pacheco, C. 2017. Efecto citotóxico del hipoclorito de sodio (NaClO), en células apicales de raíces de cebolla (*Allium cepa* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11(1): 97-104.
- Celik, M., Yuzbasioglu, D., Unal, F., Arslan, O. y Kasap, R. 2005. Effects of dinocap on the mitosis of *Allium cepa* L. *Cytologia*, 70(1): 13-22.
- Chithra, P., Sajithlal, G. y Chandrakasan, G. 1998. Influence of *Aloe vera* on the healing of dermal wounds in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 59: 195-201.

- Cuevas, M., Ferrera, R., Roldán, A. y Rodríguez, R. 2008. Ensayo de la toxicidad aguda con la lombriz de tierra *Eisenia andrei*. En: Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. Ramírez, P. y Mendoza, A. (eds)
- Cui, X., Takahashi, K., Shimamura, T., Koyanagi, J., Komada, F. y Saito, S. 2008. Preparation of 1,8-Di-O-alkylaloe-emodins and 15-amino-, 15-thiocyano-, and 15-selenocyanochrysophanol derivatives from aloe-emodin and studying their cytotoxic effects. *Chemical Pharmacology Bulletin*, 56: 497-503.
- De la Peña, E. y Herrero, O. 2005. Evaluación toxicológica de residuos orgánicos. *Revista de Salud Ambiental*, 5(2): 142-151.
- Díaz, M., Ronco, A. y Pica, Y. 2004. Ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla *Allium cepa* L. mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces. En: Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Castillo, G. (ed)
- Domínguez, R., Arzate, I., Chanona, J., Welti, J., Alvarado, J., Calderón, G., Garibay, V. y Gutiérrez, G. 2012. El gel de *Aloe vera*: Estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11: 23-43.
- EINE (EQUIPO DE INVESTIGACIÓN NUEVA ERA). 2006. *Aloe vera*: Una planta milagrosa. Edit. Continente, Buenos Aires, Argentina.
- El-Ghamery, A. y Mousa, M. 2017. Investigation on the effect of benzyladenine on the germination, radical growth and meristematic cells of *Nigella sativa* L. and *Allium cepa* L. *Annals of Agricultural Science*, 1-11.
- Ene-Obong, E. y Amadi, O. 1987. Contributions to the cytological effects of medicinal plants. The mitodepressive effects of water extracts of *Boerhaavia diffusa* and *Vernonia amygdalina* on *Allium cepa* root tip mitosis. *Cytologia*, 52: 469-474.
- Fatma, F., Verma, F., Kamal, A. y Srivastava, A. 2017. Monitoring of morphotoxic, cytotoxic and genotoxic potential of mancozeb using *Allium* assay. *Chemosphere*, 1-7.
- Fiskesjö, G. 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102: 99-112.
- Gohil, R. y Kaul, A. 1983. Induction of somatic mutations in species of *Allium* effect of dES on the somatic chromosomes of *Allium cepa*. *Cytologia*, 48: 41-45.

- Herrera, D., Fernández, C., Coria, G., Manzo, J., Aranda, G. y Hernández, M. 2015. Laxantes con fenolftaleína y su relación en el desarrollo de cáncer. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 15(2): 91-101.
- ICE (Instituto de Comercio Exterior). 1990. Perfil del cultivo sábila. Ministerio de la Producción y el Comercio de Venezuela. Caracas. 93 p.
- Ilbas, A., Gönen, U., Yilmaz, S. y Dadandi, M. 2012. Cytotoxicity of *Aloe vera* gel extracts on *Allium cepa* root tip cells. *Tubitak*, 36: 263-268.
- Imery, J. 2007. Inestabilidad cariológica durante la formación de células madres del polen en *Aloe vera* (Aloaceae). *Revista de Biología Tropical*, 55(3-4): 805-813.
- Imery, J. 2012. *Aloe vera*. En: Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. Medicinal plant. Singh, R. (ed)
- Imery, J. y Cárdenas, Y. 2006. Durabilidad de la capacidad germinativa del polen en *Aloe vera* (L.) Burm. f. y *A. saponaria* Haw. *Revista Científica UDO Agrícola*, 6(1): 67-75.
- Imery, J. y Ozols, W. 2017. Atributos biológicos y terapéuticos de la sábila (*Aloe vera*). *Saber*, 29: 267-281.
- Macedo, J., Pimentel, M. y De Oliveira, J. 2012. Efeitos citotóxico, genotóxico e mutagénico da tintura de *Matricaria chamomilla* L. *in vivo*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(2): 149-159.
- Mata-Sucre, Y., Imery-Buiza, J. y Cequea-Ruíz, H. 2017. Estudio cariotípico en plantas de *Agave cocui* Trelease (Asparagaceae) nativas del Estado Sucre, Venezuela. *Saber*, 29: 174-182.
- Medina, M. (28 de mayo de 2018). Qué es una isotónica, hipotónica, hipertónica y diálisis. *Química*. Recuperado de: <http://monicaquimica.blogspot.com/>.
- Mercykutty, V. y Stephen, J. 1980. Adriamycin induced genetic toxicity as demonstrated by the *Allium* Test. *Cytologia*, 45: 769-777.
- Mesi, A. y Koplíku, D. 2011. *Allium* test of root growth for toxicity assessment as a standard in environmental monitoring of some aqueous sources of Malesia e Madhe. *Journal International Environmental Application and Science*, 6(5): 654-660.
- Molero, T., Vilorio, M., Patiño, D. y Ocando, M. 2013. Producción de gel y acíbar en plantaciones de sábila (*Aloe barbadensis* Mill.) en el occidente de Venezuela. *Biagro*, 25: 71-76.
- Muñoz, D. y Guerrero, N. 2012. *Allium* test para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de extractos naturales en células meristemáticas de *Allium cepa*. *Memorias*, 11(19): 83-86.
- Nihal, A. 2005. Cytological effect of the potassium metabisulphite and potassium

- nitrate food preservative on root tips of *Allium cepa* L. *Cytologia*, 70(2): 119-128.
- Olivares, Y., Gaete, H. y Neaman, A. 2015. Evaluación de la fitotoxicidad y la genotoxicidad de suelos agrícolas de zonas con actividades mineras de cobre de la cuenca del río Aconcagua (Chile Central). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 31(3): 237-243.
- Paz y Miño, C., Creus, A., Cabré, O. y Leone, P. 2001. *Genética toxicológica y carcinogénesis*. FUNDACYT. Quito. 297 p.
- Pica, Y. y Trujillo, G. 2008. Ensayo de toxicidad aguda con la bacteria *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*). En: Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. Ramírez, P. y Mendoza, A. (eds)
- Piña, H. 2004. El conglomerado zábila (*Aloe vera*) en el estado Falcón, Venezuela. *Cuadernos de Desarrollo Rural*, 53: 37-57.
- Quispe, J., Saldaña, J., Verde, T. y Valderrama, S. 2010. Efectos del sorbato de potasio a diferentes concentraciones y tiempo de exposición sobre el ciclo celular y el material genético en meristemos radiculares de *Allium cepa* L. (cebolla). *Revista del Encuentro Científico Internacional*, 7(1): 71-78.
- Rao, B., Rao, B. y Sharma, C. 1988. Cytological effects of herbicides and insecticides on *Allium cepa* root meristems. *Cytologia*, 53: 255-261.
- Repetto, M y Repetto, G. 2009. *Toxicología fundamental*. 4^{ta} ed. Díaz de Santo.
- Restrepo, R., Reyes, D., Ortiz, M., Rojas, F. y Kouznetsov, V. 2012. Aberraciones cromosomales en bulbos de cebolla *Allium cepa* inducidas por moléculas híbridas 4-aminoquinolínicas. *Universitas Scientiarum*, 17(3): 253-261.
- Reynolds, T. y Dweck, A. 1999. *Aloe vera* leaf gel: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 68: 3-37.
- Rothman, S. y Dondo, G. (30 de enero del 2017). Cebolla (*Allium cepa* L.). *Cátedra de horticultura*. Recuperado de: <http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/horticultura/cebolla.pdf>.
- Sandoval, A. 2008. Ensayo de mutagenicidad con la bacteria *Salmonella typhimurim*. Prueba de Ames. En: Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. Ramírez, P. y Mendoza, A. (eds)
- Sharma, K. y Sharma, A. 1999. *Plant chromosomes, analysis, manipulation and engineering*. Harwood academic Pub. Calcuta, India.
- Sharma, S. y Vig, A. 2012. Genotoxicity of atrazine, avenoxan, diurón and

- Quizalofop-p-ethyl herbicides using the *Allium cepa* root chromosomal aberration assay. *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology*, 6(2): 90-95.
- Singh, R. 2003. *Plant cytogenetics*. 2nd ed. Boca Ratón. CRC Press.
- Soumya, K., Teena, M. y Sudha, S. 2016. Evaluation of cytotoxic effects of synthetic pesticide "attack" on root meristems of *Allium cepa* L. *South Indian Journal Of Biological Sciences*, 2(1): 35-40.
- Sturbelle, R., Pinho, D., Restani, R., De Oliveira, G., Garcías, G. y Martino, M. 2010. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(3): 409-415.
- Türkoglu, S. 2007. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research*, 626: 4-14.
- Valencia, R., Sánchez, J., Gómez, S., Cortés, J., Waliszewski, S., Fernández, S. y Villalobos, R. 2013. Genotoxicidad de plaguicidas en sistemas vegetales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29: 133-157.
- Vera, A., Olivero, J., Jaramillo, B. y Stashenko, E. 2010. Efecto protector del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown sobre la toxicidad del mercurocromo en raíces de *Allium cepa*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(1): 27-37.
- Vizoso, A., Ramos, A., García, A., Piloto, J. y Pavón, V. 2000. Estudio genotóxico *in vitro* e *in vivo* del extracto fluido de *Cassia grandis* L. y el gel de *Aloe vera* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 5(3): 91-96.
- Yajía, M., Martí, D., Bidau, C. y Amat, A. 1997. Genotoxicity evaluation of *Allophylus edulis* (Camb.) Radlk. (Sapindaceae) aqueous extract. *Acta Horticulturae*, 31-35.
- Yubasioglu, D. 2003. Cytogenetic effects of fungicide afugan on the meristematic cells of *Allium cepa* L. *Cytologia*, 68(3): 237-243.
- Zalacaín, M., Sierrasesúmaga, L. y Patiño, A. 2005. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2): 227-236.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD DE EXTRACTOS DE <i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f. EN MERISTEMAS RADICALES DE <i>Allium cepa</i> L.
Subtítulo	

Autor (es):

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Br. Millán Soto, Rismainy Del Valle	CVLAC	24.129.798
	e-mail	millansotor@gmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

CE ₅₀
Genotoxicidad
Citotoxicidad
<i>Allium cepa</i>
Meristemas radicales

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Biología

Resumen (abstract):

Las plantas medicinales han influido en culturas y pueblos de todo el mundo, en algunos casos con la sobreutilización de productos vegetales, lo cual fomenta la realización de ensayos de toxicidad para corroborar las consecuencias que pueden generar sobre un organismo vivo. En este sentido, la presente investigación evaluó los posibles efectos genotóxicos y citotóxicos de *Aloe vera* mediante el test de *Allium cepa*. Se realizó un ensayo previo para determinar la concentración de dos productos naturistas a base de acíbar deshidratado de *A. vera* que generó una disminución del 50 % en la longitud radical de *A. cepa* (CE₅₀) y para el gel de esta planta medicinal se tomó la CE₅₀ sugerida por Ilbas *et al.* (2012) de 20 % v/v. Se establecieron tres concentraciones de estudio: alta (200 % CE₅₀), media (50 % CE₅₀) y baja (25 % CE₅₀) durante tres tiempos de exposición (24, 48 y 72 h) en donde se evaluaron: longitud, color y forma de la raíz y parámetros microscópicos: índice mitótico, índices de fases y posibles alteraciones en el número y estructura de los cromosomas. A pesar de que se registraron diferentes efectos, muchos de estos fueron determinados en bajas frecuencias, por lo cual, fue necesaria la realización de dos ensayos exploratorios en donde se evaluaron los efectos del acíbar fresco de esta planta (exudado principal del contenido de los productos naturistas) a concentraciones de (0, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/l) y (0, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/l) por 48 h cada uno. Se emplearon bulbos uniformes de *A. cepa* (cebolla blanca), previamente enraizados por 72 h en agua destilada y luego sometidos a las sustancias experimentales de *A. vera*: gel fresco, acíbar deshidratado contenido en dos productos naturistas (“producto 1” y “producto 2”) y acíbar fresco. Durante el segundo ensayo, se visualizaron cambios en el color de las raíces y alteraciones de longitud al cabo de 48 y 72 h. Mediante la evaluación microscópica se observó que los efectos sobre el índice mitótico no llegan a ser significativos; sin embargo, sí se generan cambios sobre los índices de fases, ralentizando el proceso de división con un marcado desplazamiento hacia profase. Asimismo, los tratamientos con *A. vera* afectan significativamente la morfometría celular y nuclear en interfase, siendo los citoplasmas voluminosos los más frecuentes. Las alteraciones mitóticas presentadas con mayor frecuencia fueron las C-metafases, micronúcleos y anafases alteradas. El cariotipo de *A. cepa* no fue afectado en el número cromosómico, pero sí fue observada cierta pegajosidad en los mismos. Al evaluar el acíbar fresco en los ensayos exploratorios se hallaron alteraciones celulares y mitóticas que involucraban tanto el índice mitótico y de fases, así como ciertas perturbaciones como citoplasmas contraídos, núcleos amorfos y efectos clastogénicos, aunque en baja frecuencia. A pesar que *A. vera* es una de las plantas medicinales con mayor utilidad en el mundo, el uso de sus componentes principales (gel y acíbar) debe de ser moderado, mediante los resultados obtenidos se puede mencionar, que un consumo excesivo puede acarrear severas consecuencias, por lo cual se sugiere la toma de precauciones y consulta de la información requerida para consumir dichos productos de forma adecuada.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Imery Buiza José	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8.650.956
	e-mail	joseimery@gmail.com
	e-mail	
Zapata Edgar	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	12.269.219
	e-mail	ezapata@udo.edu.ve
	e-mail	
Marcano Leida	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8.219.437
	e-mail	leimar0501@gmail.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2018	Agosto	03

Lenguaje: spa.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo (s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-millanr.doc	Aplication/word

Alcance:

Espacial: Nacional (Opcional)

Temporal: Temporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado en Biología

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado

Área de Estudio: Biología

Institución (es) que garantiza (n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE, NÚCLEO DE SUCRE

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE SISTEMA DE BIBLIOTECA	Cordialmente,	
RECIBIDO POR <i>Mazley</i>		
FECHA <i>5/8/09</i> HORA <i>5:30</i>	JUAN A. BOLAÑOS CURVELO Secretario	

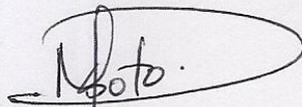
C.C.: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

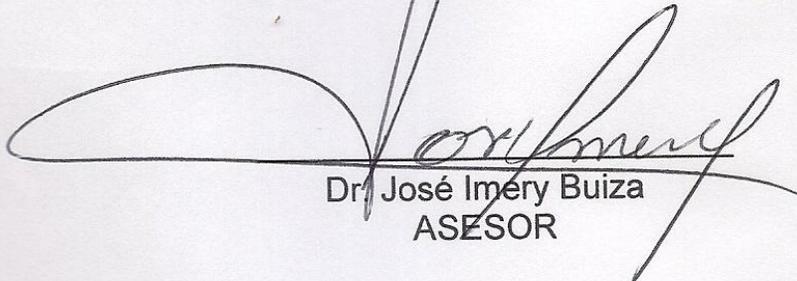
Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



Br. Rismainy Millán Soto
AUTOR



Dr. José Imery Buiza
ASESOR

Nota: Esta hoja debe ser impresa, firmada, escaneada e incluida en el archivo digital definitivo que será entregado a la Biblioteca y Comisión de Trabajos de Grado.