

Comparación de dos métodos para la evaluación de la calidad del ADN obtenido mediante la técnica del CTAB para muestras de plantas medicinales de Paraguay
 Comparison of two methods for evaluating the quality of DNA obtained using the CTAB technique for medicinal plants samples from Paraguay

Revista sobre estudios e investigaciones del saber académico

Alicia Belén Acuña Balbuena ¹ 

<https://orcid.org/0009-0008-3627-7921>

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay. aliciabacunab@gmail.com

Martín Concepción Núñez Giménez ¹ 

<https://orcid.org/0009-0000-0689-8032>

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay. martinunhez208@gmail.com

Nadia Ortiz ¹ 

<https://orcid.org/0009-0002-9371-3263>

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay. nadiaortiz144@gmail.com

Laura Santander Díaz ¹ 

<https://orcid.org/0000-0002-9786-5830>

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay. laurasantanderdiaz@gmail.com

Rocío de las Nieves Coronel Cristaldo ¹ 

<https://orcid.org/0009-0007-9381-073X>

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay. rocoronel199@gmail.com

Lourdes Cardozo ¹ 

<https://orcid.org/0009-0001-6572-0549>

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay. lourdescardozo@gmail.com

Andrea Guadalupe Torres Nunes ¹ 

<https://orcid.org/0009-0000-6881-5810>

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay. guadatorres018@gmail.com

Celso Duarte ¹ 

<https://orcid.org/0009-0003-9995-8496>

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay. monchduart07@gmail.com

Moisés Rojas ¹ 

<https://orcid.org/0009-0004-4797-2197>

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay. moisesrojas222@gmail.com

Liz Camila Quiñonez Alvarez ¹ 

<https://orcid.org/0009-0004-4797-2197>

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay. quinonezcamila15@gmail.com

Gilberto Antonio Benítez Rodas ^{1, 2, 3} 

<https://orcid.org/0000-0001-8008-4643>

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay. ²Universidad Nacional de Asunción Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica. San Lorenzo, Paraguay. ³Mycology and Safety Team MIST, San Lorenzo, Paraguay. gilberto.benitez@cemit.una.py

Danilo Fernández Ríos ^{1, 3} 

<https://orcid.org/0000-0002-8394-532X>

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay. ³Mycology and Safety Team MIST, San Lorenzo, Paraguay. dfernandez@facen.una.py

Andrea Alejandra Arrúa ^{1, 2, 3} 

<https://orcid.org/0000-0002-9489-2120>

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay. ²Universidad Nacional de Asunción Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica. San Lorenzo, Paraguay. ³Mycology and Safety Team MIST, San Lorenzo, Paraguay. andrea.arrua@cemit.una.py

Área del conocimiento: Ciencias Médicas.

Correo de Correspondencia: andrea.arrua@cemit.una.py

Conflictos de Interés: La autora declara no tener conflictos de intereses.

 Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una licencia Creative Commons CC-BY

Fecha de recepción: 17/03/2023

Fecha de Aprobación: 03/11/2023

Página Web: <http://revistas.uni.edu.py/index.php/rseisa>

Acuña Balbuena, A. B.; Núñez Giménez, M. C.; Ortiz, N.; Santander Díaz, L.; Coronel Cristaldo, R.; Cradozo, L.; Torres Nunes, A. G.; Duarte, C.; Rojas, M.; Quiñonez Alvarez, L. C.; Benítez Rodas, G. A.; Fernández Ríos, D.; Arrúa A. A. Comparación de dos métodos para la evaluación de la calidad del ADN obtenido mediante la técnica del CTAB para muestras de plantas medicinales de Paraguay

Citación recomendada: Acuña Balbuena, A. B.; Núñez Giménez, M. C.; Ortiz, N.; Santander Díaz, L.; Coronel Cristaldo, R.; Cradozo, L.; Torres Nunes, A. G.; Duarte, C.; Rojas, M.; Quiñonez Alvarez, L. C.; Benítez Rodas, G. A.; Fernández Ríos, D.; Arrúa A. A. Comparación de dos métodos para la evaluación de la calidad del ADN obtenido mediante la técnica del CTAB para muestras de plantas medicinales de Paraguay. Revista sobre estudios e investigaciones del saber académico (Encarnación), 17(17): e2023018

Resumen

La extracción de ADN es el primer paso crucial para llevar a cabo análisis genéticos en una amplia variedad de áreas de investigación. Aunque se puede utilizar ADN de calidad y cantidad subóptimas según la finalidad, durante el proceso de extracción se deben evaluar estos parámetros para optimizar el método y su eficiencia. Con estos factores en mente, el objetivo de este estudio fue comparar la eficacia de la electroforesis en gel de agarosa y la espectrofotometría de micro volumen para evaluar la calidad del ADN de ocho hierbas medicinales, una fresca y siete secas extraído utilizando la técnica de CTAB con modificaciones. Se determinó la concentración de ADN mediante el uso de un espectrofotómetro de micro volumen y se realizó una corrida en gel de agarosa al 0.8%. Los resultados obtenidos fueron comparados y los resultados obtenidos por espectrofotometría de micro volumen y geles de agarosa no fueron coincidentes siendo visualizado únicamente el ADN de la hierba medicinal en estado fresco.

Palabras clave: Migración. Trabajo. Discriminación. Género. Cuidado.

Abstract

DNA extraction is the first crucial step in conducting genetic analyses in a wide variety of research areas. Although DNA of suboptimal quality and quantity can be used depending on the purpose, these parameters must be evaluated during the extraction process to optimize the method and its efficiency. With these factors in mind, the objective of this study was to compare the effectiveness of agarose gel electrophoresis and microvolume spectrophotometry in assessing the quality of DNA from fresh samples of *Plectranthus ornatus* and *Rubus ulmifolius*, as well as dry samples of *Rhynchosia edulis*, *Verbena officinalis*, *Eucalyptus* sp., *Moringa oleifera*, *Salvia officinalis*, *Ruta graveolens*, and leaves of the *Ilex paraguariensis* tree using the CTAB technique with modifications. DNA concentration was determined using a microvolume spectrophotometer, and a 0.8% agarose gel electrophoresis run was performed. The results obtained from microvolume spectrophotometry and agarose gels could not be statistically correlated, with DNA from the medicinal herb in the fresh state being the only one visualized.

Keywords: plant tissue, nucleic acid, extraction, CTAB, medicinal herbs

Introducción

El uso de diagnósticos moleculares basados en ácidos nucleicos ha aumentado en los últimos años en diversos campos de la ciencia, incluyendo la agrobiotecnología. En el caso de las plantas medicinales se han ensayado varios protocolos siendo la presencia de metabolitos secundarios uno de los problemas más importantes asociados a la calidad e integridad de los ácidos nucleicos (Aboul-Maaty & Oraby, 2019; Moyo et al., 2008; Wang et al., 2021).

Esto se debe a que el ADN (ácido desoxirribonucleico) se considera uno de los aspectos más confiables para la individualización e identificación de organismos. Con instrumentos cada vez más avanzados y sofisticados, los científicos pueden generar perfiles de identificación a partir de cantidades tan bajas de microgramos o nanogramos (Nimbkar & D. Bhatt, 2022).

El primer paso esencial para todos los análisis subsiguientes como el uso de marcadores moleculares o el secuenciamiento es obtener ADN de alta calidad y pureza. Para la extracción de ADN de plantas, el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Doyle y Doyle, 1987) es una técnica diseñada para aislar el ADN del tejido vegetal y es ampliamente utilizada en los laboratorios. El protocolo de extracción CTAB ha sido continuamente optimizado para reducir los posibles contaminantes presentes en los tejidos vegetales (Wang et al., 2021). En relación con el tejido vegetal, la utilidad de diversos métodos de extracción de ADN se basa en la eliminación de compuestos inhibitorios presentes en las muestras que comprometen su calidad e incluso su uso posterior (Suazo Ubieta et al., 2020). El aislamiento de ADN de las plantas sigue siendo un paso limitante en muchos casos debido a la presencia de polisacáridos, polifenoles y otros metabolitos secundarios. Estos compuestos pueden acumularse en las plantas como consecuencia del estrés abiótico o biótico, como la sequía o la infección por patógenos. Posteriormente, estas sustancias tienden a co-purificar con el ADN, interfiriendo con las aplicaciones subsiguientes como uso de marcadores moleculares o secuenciamiento por mencionar algunas (Aboul-Maaty & Oraby, 2019; Vega Vela & Chacón Sánchez, 2012). En muchos casos, la presencia de estos compuestos puede comprometer la calidad y el rendimiento del ADN extraído, lo que conduce a un rendimiento subóptimo

en las aplicaciones posteriores. Es importante desarrollar y optimizar protocolos de extracción de ADN que eliminen de manera efectiva estos compuestos inhibidores mientras se preserva la integridad y pureza del ADN (Piskata et al., 2019). Por lo tanto, es crucial seleccionar y preparar cuidadosamente las muestras de plantas de manera que se maximice el rendimiento y la calidad del ADN al tiempo que se minimizan posibles fuentes de variabilidad y error. Esto requiere una comprensión profunda de la biología y fisiología de la especie de planta en investigación, así como el uso apropiado de protocolos de extracción adaptados a los requisitos específicos de cada muestra (Abdel-Latif & Osman, 2017; Sahu et al., 2012). La cuantificación y evaluación precisa de la calidad del ADN son pasos cruciales en el análisis molecular posterior. La absorción UV en micro volúmenes es un método ampliamente aceptado para determinar la concentración y pureza del ADN, ya que permite una cuantificación rápida y confiable de ácido nucleico. La relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm se utiliza comúnmente como indicador de la pureza del ADN, con un valor cercano a 1,8 que indica un alto grado de pureza. Además, la relación 260/230, con valores menores a 1.6 se utilizan para evaluar la presencia de contaminantes como sales residuales, carbohidratos o compuestos fenólicos, que pueden interferir con las aplicaciones posteriores (Farrell, 2005; Lucena-Aguilar et al., 2016; Shen, 2019; Zelenin, 1999). La evaluación de la integridad del ADN es importante para garantizar su idoneidad en análisis moleculares posteriores. La electroforesis en gel es una técnica ampliamente utilizada para determinar la calidad e integridad del ADN, ya que permite la visualización de los fragmentos de ADN y la detección de posibles productos de degradación. Se pueden utilizar geles de agarosa o acrilamida para separar los fragmentos de ADN por tamaño, y después de la tinción, la presencia de una banda bien definida indica la presencia de ADN intacto. Además del tamaño, también se pueden evaluar otros factores, como la presencia de contaminantes de ARN o proteínas, mediante la electroforesis en gel (Lee et al., 2012). El objetivo de este estudio fue comparar la cantidad y calidad de ADN extraído de muestras frescas de *Plectranthus ornatus* y *Rubus ulmifolius*; y demuestras secas de *Rhynchosia edulis*, *Verbena officinalis*, *Eucalyptus* sp.,

Moringa oleifera, Salvia officinalis, Ruta graveolens e y hojas del árbol de Ilex paraguariensis mediante la técnica modificada de CTAB (Doyle & Doyle, 1987), evaluada mediante espectrofotometría de micro volumen y análisis de perfiles de electroforesis en gel de agarosa para comparar la eficacia de la electroforesis en gel de agarosa y la espectrofotometría de micro volumen para la evaluación de la calidad del ADN, siendo la hipótesis que la comparación de dos métodos, la electroforesis en gel de agarosa y la espectrofotometría de micro volumen, para evaluar la calidad del ADN obtenido mediante la técnica del CTAB en muestras de plantas medicinales revelará diferencias significativas en la eficacia de estos métodos para detectar la pureza y la integridad del ADN extraído (Doyle & Doyle, 1987).

Materiales y Métodos

Material de estudio

Para la ejecución de este experimento, se emplearon muestras frescas de *Plectranthus ornatus* y *Rubus ulmifolius*. Además, se procesaron muestras secas de *Rhynchosia edulis*, *Verbena officinalis*, *Eucaliptus* sp., *Moringa oleifera*, *Salvia officinalis*, *Ruta graveolens* y hojas secas del árbol de *Ilex paraguariensis*. Todas las muestras utilizadas fueron proporcionadas por el Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT). En el caso de las muestras de plantas secas, se trató de productos comerciales que habían sido depositados en CEMIT y suministrados por empresas especializadas en la comercialización de hierbas medicinales. Cabe destacar que, en todos los casos de este estudio, se utilizaron exclusivamente hojas como material de análisis.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo de (Doyle & Doyle, 1987) con modificaciones para simplificar la técnica, reducir en tiempo de trabajo, disminuir el uso de insumos y reactivos y las posibilidades de introducción de contaminantes al momento del procesado de las muestras. La lisis celular se realizó con nitrógeno líquido moliendo el tejido vegetal en morteros de porcelana previamente esterilizados y congelados a $-80\pm 2^{\circ}\text{C}$; el material vegetal fue luego transvasado a tubos de mL estériles se agregaron 750 μL de buffer de lisis y previamente precalentado a 65°C . Esta dilución, se pasó por vórtex durante 1 minuto y posteriormente los tubos fueron incubados a 65°C por 30 minutos,

agitándolos a los 15 minutos para garantizar la homogeneización. Subsiguientemente se adicionaron a los tubos 750 μL de cloroformo enfriado a $-25\pm 2^{\circ}\text{C}$ se mezclaron suavemente por inversiones y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 8 minutos. El sobrenadante obtenido fue transvasado a tubos de 1,5 mL limpios y estériles y se agregaron 450 μL de Isopropanol frío a $-25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Nuevamente el contenido de cada tubo se mezcló por inmersiones hasta observar una emulsión blanquecina. Los tubos se dejaron en reposo durante 5 minutos y luego se centrifugaron a 8100 rpm durante 5 minutos. Al finalizar el proceso, en el fondo de cada tubo se observó un pellet o pastilla blanquecina. El sobrenadante fue eliminado con cuidado de no perder el pellet. Seguidamente se desechó el sobrenadante y los tubos se dejaron a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ y abiertos en un bloque térmico con tapa hasta la evaporación total de los residuos del solvente. Por último, se añadieron 50 μL de agua ultrapura previamente calentada a 65°C y se incubaron los tubos a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h para disolver la pastilla.

Análisis por espectrofotometría de micro volumen

El análisis de pureza y concentración del ADN se realizó mediante un espectrofotómetro de micro volumen (DeNovix EasyApps). Se utilizaron 2 μL del ADN extraído por triplicado para cada medición y como control agua ultrapura Invitrogen™ UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, USA

Detección de ADN por electroforesis

Se preparó el gel de electroforesis pesando 0,8 g de agarosa, que posteriormente se disolvió en tampón TBE (Tris-borato-EDTA). Se mezclaron ocho microlitros de cada muestra con 2 μL de buffer de carga con azul de bromofenol y se colocaron los 10 μL completos en cada uno de los pocillos del gel de agarosa. Después de cargar todas las muestras, se conectó la fuente de alimentación y se ajustó a 100 V y se dejó correr el gel durante 1 hora. Para la tinción, se transfirió cuidadosamente el gel a un recipiente en el que se añadieron 10 μL de una solución de intercalante Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega, 2013) al tampón TBE. Después de teñir durante 60 minutos, se visualizó el gel en el sistema foto documentador de geles y se registraron los resultados mediante el sistema de documentación de geles Gel Doc EZ System de Bio-Rad (BioRad, 2014)

Resultados y Discusión

En el caso de la extracción de ADN hojas frescas de *Plecantus ornatus*, la media de la concentración de ADN obtenido fue de 582,89 ng/μL. En *Ilex paraguariensis* no pudo ser detectado ADN, indicando el espectrofotómetro de micro volumen error de lectura. En el caso de las demás hierbas se observaron diferencias significativas entre los valores de ADN arrojados por el espectrofotómetro de micro volumen, siendo estos, en media los que se detallan a continuación: *Ruta graveolens* 4,60 ng/μL, *Eucaliptus* sp. 122,23 ng/μL; *Verbena officinalis* 142,46 ng/μL; *Salvia officinalis* 202,75 ng/μL; *Rhynchosia edulis* 303,05 ng/μL y *Moringa olerifera* 557,45 ng/μL. A pesar de estos valores obtenidos, las bandas indicativas de la presencia de ADN en el gel de electroforesis se observaron difusas lo que indica degradación.

Tabla 1. Valores de ADN obtenidos mediante lectura en espectrofotómetro de micro volumen y visualización en gel de agarosa.

Muestra	Réplica	Concentración (ng/μL) en espectrofotómetro de micro volumen	Relación 260/280	Visualización en gel de agarosa
<i>Plecantus ornatus</i>	1	12,27	1,7	+
<i>Plecantus ornatus</i>	2	1153,49	1,8	+
<i>Ilex paraguariensis</i>	1	Error de lectura	Sin valor	-
<i>Ilex paraguariensis</i>	2	Error de lectura	Sin valor	-
<i>Rhynchosia edulis</i>	1	20,99	1,4	-
<i>Rhynchosia edulis</i>	2	585,23	1,8	-
<i>Ruta graveolens</i>	1	750,69	1,7	-
<i>Ruta graveolens</i>	2	163,63	1,1	-
<i>Verbena officinalis</i>	1	4,94	1,9	-
<i>Verbena officinalis</i>	2	280,03	2,0	-
<i>Salvia officinalis</i>	1	156,69	1,9	-
<i>Salvia officinalis</i>	2	248,82	1,9	-
<i>Moringa olerifera</i>	1	366,77	2,1	-
<i>Moringa olerifera</i>	2	748,14	2,1	-
<i>Eucaliptus</i> sp.	1	94,51	1,9	-
<i>Eucaliptus</i> sp.	2	149,95	1,9	-

Es importante señalar que de todas las muestras analizadas solo el ADN de *Plecantus ornatus* (tejido fresco) pudo ser observada en el gel de agarosa.

Discusión

Esta investigación proporciona una evaluación rigurosa y comparativa de la eficacia y fiabilidad de estos métodos en particular, lo que puede tener importantes implicaciones para la calidad y aplicabilidad de los datos genéticos obtenidos a partir de estas muestras. Además, al identificar cuál de los dos métodos es más adecuado, se contribuye al avance y optimización de las técnicas de extracción de ADN en el contexto de la investigación sobre plantas medicinales en Paraguay, lo que puede ser de utilidad tanto para la identificación de especies como para la caracterización genética de estas plantas con fines medicinales.

Posterior a los diversos experimentos realizados en este trabajo se pudo constatar que los valores de ADN obtenidos mediante espectrofotómetro de micro volumen y la presencia o ausencia de bandas en el gel de electroforesis no son consistentes. El valor indicado en el equipo podría deberse a factores como reactivos, nucleótidos libres, colorantes y proteínas de la etapa de purificación que influyen en la concentración leída por el equipo y el proceso de extracción manual igualmente influye en el rendimiento de extracción por el exceso de manipulación y por los diferentes pasos a los cuales se somete la muestra, se puede degradar y perder parte del material (Abdel-Latif & Osman, 2017; Alejos et al., 2014).

El valor estimado de pureza que proporciona el equipo otorga información acerca de la presencia de proteínas, lo cual es conveniente para percibir la eficiencia del proceso de extracción, aunque hubo variabilidad en la pureza conseguida, esta no guardó relación directa con la concentración de ADN (Olson & Morrow, 2012; Tang & Stratton, 2014).

Existen investigaciones en las que las concentraciones de ADN con mediciones espectrofotométricas a 260 nm incrementaron ligeramente con el aumento de la fragmentación del ADN. Sin embargo, existen otros resultados en los que se visualiza que la cuantificación de ADN basada en A 260 no se ve afectada significativamente por el nivel de fragmentación del ADN. Sin embargo, las principales desventajas de este método son su baja sensibilidad y el hecho de que las mediciones no discriminan entre ADN y ARN y están

sesgadas por la presencia de ADN monocatenario, oligonucleótidos y nucleótidos libres. Por otro lado, la cuantificación basada en espectrofotometría de micro volúmenes muy simple y ofrece la forma más rápida de cuantificar el ADN, ya que no es necesaria ninguna manipulación adicional con la muestra antes de la medición. Además, permite evaluar la cantidad de ADN y su pureza en un solo paso (Sedlackova et al., 2013).

En biología molecular, la relación A260/280 es una medida de la pureza del ADN y se considera una métrica importante para evaluar la calidad del ADN. La relación A260/280 es altamente estable y se considera que una pureza óptima del ADN tiene un valor entre 1,8-2,0. Una pureza aceptable del ADN debe tener al menos una relación A260/280 > 1,6. Un valor de A260/280 < 1,6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas, lo que puede afectar la calidad del ADN. Por otro lado, una relación A260/280 > 2,1 podría ser indicativa de la presencia de ARN en la muestra, lo que también puede afectar la pureza del ADN. La absorbancia a 230 nm es una medida de la presencia de contaminantes en una muestra de ADN. Los contaminantes comúnmente absorbidos a 230 nm incluyen sales caotrópicas, fenoles y carbohidratos. Una relación A260/230 < 1,5 indicaría una impureza significativa en la muestra que podría afectar su funcionalidad. Sin embargo, es importante tener en cuenta que esta relación es más variable que la relación A260/280 y depende de factores como la concentración de ADN y la composición del tampón de re-suspensión de la muestra (Lucena-Aguilar et al., 2016).

En otros casos, la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% o 0,8 % (p/v) permite la valoración de la integridad de la muestra de ADN. Se considera que una muestra de ADN es íntegra cuando su perfil en una electroforesis en gel de agarosa se corresponde a una banda discreta. El nivel de degradación de una muestra está determinado por la pérdida de definición de la banda predominante y el acompañamiento de una estela o “smear” a lo largo del gel (Semenov et al., 2023; Shardul et al., 2008).

La extracción del ADN de plantas que contienen grandes cantidades de polifenoles, taninos y polisacáridos ha sido siempre difícil de manejar en el pasado. Según (Velasquez et al., 2005), en Teca al

igual que en otros vegetales existe la presencia de metabolitos secundarios tales como los polifenoles y taninos, los cuales inhiben la acción enzimática, la misma que es esencial en el proceso de extracción y purificación del ADN (Friar, 2005; Sahu et al., 2012). Según Sánchez et al, (2021) este inconveniente de oxidación es ampliamente conocido en distintas plantas como café, aguacate, guayaba y en este caso en plantas medicinales. En sus formas oxidadas, los polifenoles se unen al ADN covalentemente, lo que lo convierte en no deseado para la mayoría de las aplicaciones moleculares. Esto corresponde con los resultados obtenidos en la extracción de las distintas hierbas medicinales empleadas (Sánchez-Barrantes et al., 2021).

En cuanto a las hierbas estudiadas, la falta de visualización de ADN en todas las muestras excepto *Plectanthes ornatus* puede atribuirse al hecho de que solo en esta planta fue utilizado tejido fresco, mientras que el resto eran secas, lo que potencialmente llevó a la degradación del ADN y como es sabido a pesar de la estabilidad del ADN debido a su estructura de doble cadena, el calor puede romper los enlaces covalentes dentro de las cadenas y llevar a la degradación, sin embargo para probar esto se podría extraer ADN de tejido fresco de las mismas plantas y compararla calidad e integridad del mismo antes y después del proceso de secado. Se encontraron problemas comunes, probablemente debido a la presencia de metabolitos secundarios que obstaculizaron la electroforesis en gel, lo que resultó en baja cantidad y calidad de ADN extraído, así como ADN viscoso y de color marrón. La presencia de metabolitos secundarios en las plantas medicinales puede representar un problema al momento de la extracción y la determinación de la calidad e integridad del ADN obtenido. Este hecho, es indicativo de que para cada especie es necesario ajustar la técnica a ser aplicada y que no existe una receta única a ser aplicada (Aboul-Maaty & Oraby, 2019; Moyo et al., 2008; Wang et al., 2021), por lo cual es necesario realizar múltiples pruebas de múltiples técnicas en más especies medicinales, tanto en muestras frescas como en muestras secas.

En relación con las limitaciones, este estudio se limitó a la evaluación de ocho especies de plantas tomando en todos los casos para la extracción solo hojas de estas, lo que plantea la cuestión de si estos resultados

son representativos de la diversidad de plantas medicinales en su totalidad y mediante el método de extracción basado en CTAB con modificaciones, lo cual podría no ser generalizable o aplicable a otros métodos de extracción utilizados en investigaciones relacionadas. Por otra parte, la evaluación de la calidad del ADN se basó únicamente en dos técnicas: la electroforesis en gel de agarosa y la espectrofotometría de micro volúmenes. Estos métodos, aunque valiosos, no son los únicos que existen para evaluar la calidad e integridad del ADN obtenido.

Conclusiones

Este estudio reveló resultados variables entre los métodos de determinación de la calidad e integridad del ADN obtenido de las muestras. Aunque el espectrofotómetro de micro volumen mostró valores indicativos de la presencia de ADN en las muestras, los mismos no pudieron ser visualizados en el gel de agarosa. Estos hallazgos subrayan la importancia de utilizar enfoques complementarios para la evaluación de la calidad y la integridad del ADN en muestras de hierbas medicinales. Esta estrategia combinada puede proporcionar una evaluación más completa y precisa de la calidad del ADN, lo que es esencial para futuras investigaciones relacionadas con la identificación y caracterización genética de estas especies de plantas medicinales en Paraguay.

Bibliografía

- Abdel-Latif, A., & Osman, G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>
- Aboul-Maaty, N. A.-F., & Oraby, H. A.-S. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>
- Alejos, L., Aragón, M., & Cornejo, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. In M. G. R. M. (compiladoras) Amelia Cornejo Romero, Alejandra Serrato Díaz, Beatriz Rendón Aguilar (Ed.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*. (pp. 1–26). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. <http://journal.um-surabaya.ac.id/index.php/JKM/article/view/2203>
- BioRad. (2014). *Gel Doc™ EZ System | Bio-Rad*. <https://www.bio-rad.com/es-py/product/gel-doc-ez-system?ID=M7FB5FE8Z>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. In *Phytochemical Bulletin*.
- Farrell, R. E. (2005). Quality Control for RNA Preparations. *RNA Methodologies*, 163–178. <https://doi.org/10.1016/B978-012249696-7/50008-1>
- Friar, E. A. (2005). Isolation of DNA from Plants with Large Amounts of Secondary Metabolites. *Methods in Enzymology*, 395, 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)95001-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95001-5)
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 62, 3923. <https://doi.org/10.3791/3923>
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264–270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Moyo, M., Amoo, S. O., Bairu, M. W., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2008). Optimising DNA isolation for medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 74(4), 771–775. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2008.07.001>
- Olson, N. D., & Morrow, J. B. (2012). DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-668>
- Piskata, Z., Servusova, E., Babak, V., Nesvadbova, M., & Borilova, G. (2019). The quality of DNA isolated from processed food and feed via different extraction procedures. *Molecules*, 24(6), 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules24061188>
- Promega. (2013). *Diamond™ Nucleic Acid Dye* -

- Technical Manual. In *Promega Global* (p. 7).
- Sahu, S. K., Thangaraj, M., & Kathiresan, K. (2012). DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology*, 2012, 1–6. <https://doi.org/10.5402/2012/205049>
- Sánchez-Barrantes, E., Mora-Newcomer, E., & Barrantes-Santamaría, W. (2021). High quality DNA isolation in *Psidium guajava* L. For genomic studies. *Agronomia Mesoamericana*, 32(2), 638–649. <https://doi.org/10.15517/am.v32i2.41606>
- Sedlackova, T., Repiska, G., Celec, P., Szemes, T., & Minarik, G. (2013). Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biological Procedures Online*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1480-9222-15-5>
- Semenov, K., Taraskin, A., Yurchenko, A., Baranovskaya, I., Purvinsh, L., Gyulikhandanova, N., & Vasin, A. (2023). Uncertainty Estimation for Quantitative Agarose Gel Electrophoresis of Nucleic Acids. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 23(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/s23041999>
- Shardul, B., Amin, R., Pandya, M., Yuan, H., Tank, M., LoBello, J., Shytuhina, A., Wan, W., Wisnieswski, H., De la Motte, C., & Cowman, M. (2008). Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Methods for Molecular Mass Analysis of 5–500 kDa Hyaluronan. *Anal Biochem*, 417(41), 49. <https://doi.org/10.1038/nature08365>. Reconstructing
- Shen, C.-H. (2019). Detection and Analysis of Nucleic Acids. *Diagnostic Molecular Biology*, 167–185. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00007-9>
- Tang, Y. W., & Stratton, C. W. (2014). Advanced techniques in diagnostic microbiology. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, 1–957. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3970-7>
- Wang, Q., Shen, X., Qiu, T., Wu, W., Li, L., Wang, Z., & Shou, H. (2021). Evaluation and application of an efficient plant DNA extraction protocol for laboratory and field testing. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 22(2), 99–111. <https://doi.org/10.1631/jzus.B2000465>
- Zelenin, A. V. (1999). Acridine Orange as a Probe for Cell and Molecular Biology**To the memory of my teacher Professor Maxim N. Meissel, the founder of fluorescence microscopy in Russia. *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, 117–135. <https://doi.org/10.1016/B978-012447836-7/50011-7>