

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



Evaluación de la actividad antioxidante de extractos acuoso y etanólico de bayas de Saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.) antes y después de la incorporación a gomitas masticables y determinación del efecto sobre los niveles de malondialdehído en membranas de hepatocitos de las gomitas con mejores características organolépticas

Tesis para optar al título profesional de:
QUIMICO FARMACEUTICO

Presentado por:
Bach. **CATHERIN LIZVET SANCHO
HUANCA.**

Asesora: **Q.F. KARINA VERA FERCHAU**

CUSCO – PERÚ

2021

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida y permitirme lograr mis objetivos estando a mi lado y acompañándome en cada paso.

A mi madre, JUANA HUANCA TTITO, por su apoyo, sus consejos, su compañía, su amor incondicional y motivación en todo momento de mi vida, por ser mi guía en cada paso, sin los cuales esto quizá no sería posible.

Con mucho amor y cariño a mis hermanos SAMANTA y MARIO, por todo el apoyo moral y consejos, brindándome un amor incondicional.

A mis amigos por compartir innumerables experiencias y alegría durante mi etapa universitaria, por cada aliento y consejos de superación.

Catherin Lizvet

RESUMEN

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antioxidante de los extractos acuoso y etanólico de las bayas de sauco antes y después de la incorporación a gomitas masticables y el efecto sobre los niveles de malondialdehído (MDA) de membranas de hepatocitos de las gomitas con mejores características organolépticas.

Se determinó in vitro la actividad antioxidante del extracto seco a través del uso de DPPH (2,2 difenil 1 picrilhidrazilo), a diversas concentraciones como 0, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/ml}$ por el método de secuestro de radicales libres, en extractos tanto en acuoso como en etanólico, el porcentaje de inhibición determinó la actividad antioxidante, siendo a 250 $\mu\text{g/ml}$ 51.68% de inhibición para el extracto acuoso y 59.78% para el extracto etanólico.

Luego se evaluó la actividad antioxidante de gomitas con extracto, para una concentración IC₅₀ se obtuvo 44% de inhibición para el extracto acuoso (241.87 $\mu\text{g/mL}$) y 49.39% para el extracto etanólico (209.10 $\mu\text{g/ml}$).

Finalmente se evaluó el efecto sobre los niveles de malondialdehído de las gomitas mediante un estudio comparativo cuasi experimental, fueron utilizados 24 ratones albinos de la cepa balb/c, las gomitas masticables fueron administradas disueltas vía oral a dosis 2.3 mg/k (grupo experimental), paracetamol 300 mg/k (control negativo), silimarina 150 mg/k (control positivo), agua destilada 0.5 ml (blanco). La cantidad de MDA presente en el sobrenadante del homogenizado de hígado determinó el efecto sobre niveles de MDA, cuantificándose en el espectrofotómetro al décimo día de experimentación, obteniéndose valores de MDA de 0.22 $\mu\text{mol/L}$ para el grupo blanco, 0.39 $\mu\text{mol/L}$ para el control negativo, 0.28 $\mu\text{mol/L}$ para el control positivo y 0.27 $\mu\text{mol/L}$ para el grupo experimental. Por la similitud observada de 0.964 en el test de tukey en los grupos control positivo y experimental se evidenció efecto sobre estos niveles como antioxidante exógeno.

En conclusión, el presente estudio brinda evidencia científica de *Sambucus peruviana* H.B.K para la actividad antioxidante y efecto sobre los niveles de MDA.

Palabras clave: Antioxidante, estrés oxidativo, método de secuestro de radicales libres, especies reactivas al ácido tiobarbiturico, MDA, *Sambucus peruviana* H.B.K (sauco).

ABREVIATURAS

- ROS:** Especies reactivas de oxígeno.
- ROO°:** Peroxilo.
- NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato.
- ADN:** Acido desoxirribonucleico.
- O°₂:** Superóxido.
- RO°:** Alcoxilo.
- °OH:** Hidroxilo.
- NOS:** Sintasa de óxido nítrico.
- NO°:** Óxido nítrico.
- ¹O₂:** Oxígeno singlete.
- HOCL:** Acido hipocloroso.
- H₂O₂:** Peróxido de hidrogeno.
- ATP:** Trifosfato de adenosina.
- ADN_{mt}:** Acido desoxirribonucleico mitocondrial.
- IL-6:** Interleucina-6
- Fe:** Hierro.
- RNS:** Especies reactivas de nitrógeno.
- XOR:** Xantina reductasa.
- FAD:** Flavin adenin dinucleotido.
- CAT:** Catalasa.
- TBARS:** Especies reactivas al ácido tiobarbiturico.
- H₂O:** Agua
- NO°₂:** Dióxido de nitrógeno
- PAI-1:** Inhibidor del activador tisular del plasminogeno y la uroquinasa Tipo 1.
- COX:** Ciclooxygenasa.
- NAPQI:** N- Acetil p-benzoquinoneimina.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrihidrazilo

TNF: Factor de necrosis tumoral.

TEP: Tetraetoxipropano.

MDA: Malondialdehido.

TROLOX: Acido 6-Hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcromano-2- carboxílico.

INTRODUCCION

El estrés oxidativo causado por diversos radicales libres tienen acción negativa en diversas células forman parte del cuerpo humano causando diversas enfermedades crónico degenerativas. (1) Los radicales libres actúan como potentes oxidantes y son causa del envejecimiento celular al combinarse con estructuras complejas e importantes como las proteínas y el ADN. (2)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) señaló al 2008 como el año en el que las enfermedades crónicas degenerativas tales como, enfermedades respiratorias crónicas, la diabetes, enfermedades cerebrovasculares, cardiovasculares y cáncer fueron las razones principales de mortalidad en el mundo entero y se les atribuye más de 57 millones de defunciones. (3)

Las dietas ricas o enriquecidas en antioxidantes y terapias antioxidantes, logran prevenir y disminuir en gran medida el deterioro en las funciones orgánicas del cuerpo causado por la acumulación excesiva de estrés oxidativo en diversas enfermedades crónico degenerativas. (4)

El género *Sambucus L.*, está distribuido entre 20 y 40 especies en todo el mundo y en nuestro país existen 3 especies distribuidas ampliamente *Sambucus canadiense*, *Sambucus peruviana* y *Sambucus mexicana*. Y en nuestra región la *Sambucus peruviana* (5)

Existen muchos estudios que muestran los efectos beneficiosos del Sauco como, efecto antihipertensivo, antioxidante, antiviral y otros efectos beneficiosos ya que posee diversos componentes fenólicos como los terpenoides y las antocianinas; adicionalmente puede proteger del cáncer a la próstata y diversas enfermedades neurodegenerativas. (6)

Por lo mencionado anteriormente y con antecedente del uso popular de *Sambucus peruviana* (saúco) en el tratamiento del estrés oxidativo, se plantea un estudio cuasi experimental del posible efecto sobre los niveles de MDA de las gomitas con incorporación de extracto seco en un modelo con inducción a hepatotoxicidad causada por paracetamol.

ÍNDICE

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I	1
1.1. GENERALIDADES.....	1
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:	1
1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	3
1.4. OBJETIVOS	3
1.4.1. OBJETIVO GENERAL:.....	3
1.4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	3
1.5. LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN	4
1.6. JUSTIFICACIÓN.....	4
1.7. HIPÓTESIS	6
CAPÍTULO II	7
2. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL	7
2.1. ANTECEDENTES:	7
2.1.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES.....	7
2.1.2. ANTECEDENTES NACIONALES	8
2.1.3. ANTECEDENTES LOCALES	9
2.2. BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS.....	10
2.2.1. SAÚCO (<i>Sambucus peruviana</i> H.B.K.):.....	10
2.2.1.1. TAXONOMIA.....	10
2.2.1.2. COMPUESTOS QUÍMICOS:.....	12
2.2.1.3. BENEFICIOS DE LAS BAYAS DE SAÚCO. (17,18)	13
2.2.1.4. PRODUCTOS QUE SE PUEDEN ELABORAR A PARTIR DE LAS BAYAS DE SAÚCO (5,18) 13	
2.2.2. ANTIOXIDANTES	14
2.2.2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES	16
2.2.2.2. ANTIOXIDANTES NATURALES.	18
2.2.3. CRIOCONCENTRACIÓN (34).....	25
2.2.4. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	26

2.2.5.	RADICALES LIBRES	28
2.2.5.1.	RADICALES LIBRES DERIVADOS DEL OXÍGENO (39).....	29
2.2.5.2.	ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DEL NITRÓGENO	30
2.2.6.	ESTRÉS OXIDATIVO	31
2.2.7.	GOMITAS MASTICABLES.....	34
2.2.7.1.	FUNCIÓN DE LOS INSUMOS	34
2.2.7.2.	CARACTERÍSTICAS DE LAS GOMITAS (.....	35
2.2.7.3.	ELABORACIÓN DE GOMITAS	36
2.2.8.	ANATOMÍA Y FISIOLÓGIA DEL HÍGADO	37
2.2.8.1.	DEFINICIÓN.....	37
2.2.8.2.	ANATOMÍA MACROSCOPICA.....	37
2.2.8.3.	ANATOMÍA MICROSCOPICA	38
2.2.8.4.	FUNCIÓN HEPÁTICA	39
2.2.8.5.	ENZIMAS HEPÁTICAS.....	40
2.2.8.5.1.	TRANSAMINASAS	40
2.2.8.6.	MECANISMO DE GENERACION DE RADICALES LIBRES POR PARACETAMOL (50) .	41
2.2.8.7.	INJURIA OXIDATIVA EN TEJIDO HEPÁTICO	41
2.2.8.8.	ORIGEN DEL ESTRÉS OXIDATIVO POR CONSUMO EXCESIVO DE PARACETAMOL .	42
2.2.9.	MÉTODOS PARA EVALUAR ESTRÉS OXIDATIVO EN TEJIDO HEPÁTICO	43
2.2.10.	SILIMARINA COMO PATRON PARA LA METODOLOGÍA.....	43
2.2.10.1.	ACCIÓN TERAPEÚTICA.....	43
2.2.10.2.	INDICACIONES	44
2.2.10.3.	MECANISMO DE ACCIÓN.....	44
CAPÍTULO III	45
3.1.	MATERIALES	45
3.2.	METODOLOGÍA.....	49
3.2.1.	LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO.....	49
3.2.2.	DISEÑO METODOLÓGICO	49
3.3.	CONSIDERACIONES ÉTICAS (45.53):	53
3.4.	IDENTIFICACIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	54
3.5.	POBLACIÓN Y MUESTRA.....	64
3.5.1.	POBLACIÓN DE ESTUDIO	64
3.5.2.	MUESTRA VEGETAL	64

3.5.3.	MUESTRA BIOLÓGICA.....	64
3.6.	METODOLOGÍA GENERAL.....	66
3.7.	PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	67
3.7.1.	OBTENCION DE LAS BAYAS DE <i>Sambucus peruviana H.B.K.</i> (SAÚCO):.....	67
3.7.2.	OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS	67
3.7.3.	PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANOLICO DE LAS BAYAS DE <i>Sambucus peruviana H.B.K.</i> (SAÚCO).....	68
3.7.4.	ESTUDIO FITOQUÍMICO CUALITATIVO	69
3.7.5.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO DE SAÚCO (<i>Sambucus peruviana H.B.K.</i>) (37) POR EL MÉTODO DPPH.	69
3.7.6.	CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES (55)	73
3.7.7.	CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS (56).....	75
3.7.8.	FORMULACION DE GOMITAS MASTICABLES CON LA DOSIS EFECTIVA DE ANTOCIANINAS 160 mg.....	77
3.7.9.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS GOMITAS MASTICABLES CON LA INCORPORACIÓN DE EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO DE SAÚCO (<i>Sambucus peruviana H.B.K.</i>).....	78
3.7.10.	CONTROL DE CALIDAD DE LAS GOMITAS	80
3.7.11.	DETERMINACIÓN DEL EFECTO SOBRE LOS NIVELES DE MDA EN MEMBRANAS DE HEPATOCITOS DE LA FORMULACIÓN DE GOMITAS MASTICABLES CON MEJORES CARACTERISTICAS ORGANOLÉPTICAS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO IC50 MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHIDO.....	81
3.8.	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	87
3.9.	TÉCNICAS DE ANALISIS DE DATOS ESTADISTICOS	88
CAPITULO IV	89
4.5.	DE LAS PRUEBAS PRELIMINARES.....	89
4.6.	DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE LOS EXTRACTOS SECOS ACUOSO Y ETANÓLICO DE LAS BAYAS DE SAÚCO (<i>Sambucus peruviana H.B.K.</i>).	92
4.6.1.	DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN:.....	92
4.6.2.	DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE LAS MUESTRAS.....	95
4.7.	DE LA CUANTIFICACION DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	105
4.7.1.	CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES	105
4.7.2.	CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS.	108
4.8.	DE LA FORMULACIÓN DE GOMITAS MASTICABLES CON INCORPORACIÓN DE EXTRACTO SECO ACUOSO Y ETANÓLICO DE LAS BAYAS DE SAÚCO (<i>Sambucus peruviana H.B.K.</i>).....	110

4.9.	DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IC50 IN VITRO DE LAS GOMITAS MASTICABLES.....	111
4.9.1.	EXTRACTO ACUOSO:.....	111
4.9.2.	EXTRACTO ETANÓLICO	113
4.9.3.	DEL ANÁLISIS ESTADISTICO:	116
4.10.	DEL CONTROL DE CALIDAD DE GOMITAS MASTICABLES.	117
4.11.	DEL EFECTO SOBRE LOS NIVELES DE MDA SOBRE LAS MEMBRANAS DE HEPATOCITOS DE LA FORMULACIÓN DE GOMITAS MASTICABLES CON MEJORES CARACTERISTICAS ORGANOLÉPTICAS.	119
4.11.1.	DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	119
4.11.2.	DE LA EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS	121
4.11.3.	DEL ANÁLISIS ESTADISTICO:	123
	CONCLUSIONES	126
	SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES	128
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
	ANEXOS	140
	ANEXO N°13: Galería fotográfica	157

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del saúco (<i>Sambucus peruviana</i> H.B.K.).....	11
Tabla 2. Distribución del género <i>Sambucus</i> L. en el Perú.....	12
Tabla 3. análisis bromatológico del saúco.....	12
Tabla 4. Porcentaje de solidos solubles totales en diferentes estadios de maduración de las bayas de saúco (<i>Sambucus peruviana</i> H.B.K.)	13
Tabla 5. Antioxidantes exógenos y la acción que ejercer en lugar de la célula	17
Tabla 6. Antioxidantes endógenos y la acción que ejercen en un lugar de la célula y sus cofactores.....	18
Tabla 7. Principales clases de polifenoles y fuentes naturales.....	22
Tabla 8. Biomarcadores de estrés oxidativo y sus métodos de detección	34
Tabla 9. Diseño metodológico de la actividad antioxidante IC 50 de los extractos secos acuoso y etanólico de saúco.....	51
Tabla 10. Diseño metodológico de formulación de gomitas masticables.....	53
Tabla 11. Diseño metodológico de experimentación del efecto sobre los niveles de MDA.....	53
Tabla 12. Operacionalización de variables independientes.....	61
Tabla 13. Operacionalización de variables dependientes.....	62
Tabla 14. Operacionalización de variables intervinientes.....	64
Tabla 15. Curva estándar de TROLOX para DPPH.....	72
Tabla 16. Actividad antioxidante de las muestras.....	73
Tabla 17. Curva de calibración de ácido gálico.....	75
Tabla 18. Cuantificación de polifenoles en las muestras.....	76
Tabla 19. Cuantificación de antocianinas.....	77
Tabla 20. Formulación de gomitas.....	78
Tabla 21. Actividad antioxidante de gomitas masticables.....	80
Tabla 22. Tamaño muestral necesario en cada grupo.....	84
Tabla 23. Distribución de los grupos de tratamiento.....	86
Tabla 24. Curva de calibración 1,1,3,3 – tetraethoxypropane	88
Tabla 25. Determinación de MDA en muestras.....	88
Tabla 26. Prueba de solubilidad del extracto seco acuoso y etanólico de las bayas de sauco (<i>Sambucus peruviana</i> H.B.K.).....	91
Tabla 27: Marcha fitoquímica del extracto seco acuoso y etanólico de las bayas de saúco (<i>Sambucus</i> <i>peruviana</i> <i>H.B.K</i>).....	93
Tabla 28. Curva de calibración del TROLOX concentración v/s absorbancias.....	94
Tabla 29. Curva de calibración del TROLOX concentración vs porcentaje de inhibición.....	95
Tabla 30. Relación concentración vs absorbancias del extracto acuoso.....	97

Tabla 31. Relación concentración vs porcentaje de inhibición del extracto acuoso.....	98
Tabla 32. Relación concentración vs absorbancias del extracto etanólico.....	99
Tabla 33. Relación concentración vs porcentaje de inhibición del extracto etanólico.....	100
Tabla 34. Comparación de porcentajes de inhibición entre extracto acuoso y etanólico.....	102
Tabla 35. IC 50 y TROLOX equivalente de los extractos secos.....	104
Tabla 36. Curva de calibración del ácido gálico concentración vs absorbancia.....	107
Tabla 37. Evaluación de los extractos secos concentración vs absorbancia.....	109
Tabla 38. Equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra.....	109
Tabla 39. Cuantificación de antocianinas en los extractos secos (absorbancias).....	110
Tabla 40. Contenido de antocianinas por cada extracto seco.....	111
Tabla 41. Cantidad de antocianina expresada en fruta fresca.....	111
Tabla 42. Formulación de gomitas masticables.....	112
Tabla 43. Tabla de absorbancias y porcentaje de inhibición de las gomitas con incorporación de extracto acuoso determinadas por 2 semanas.....	113
Tabla 44. Tabla de comparación de porcentaje de inhibición antes y después de la incorporación del extracto acuoso.....	114
Tabla 45. Prueba de Wilcoxon para determinar la diferencia significativa del porcentaje de inhibición antes y después de la incorporación del extracto acuoso.....	114
Tabla 46. Tabla de absorbancias y porcentaje de inhibición de las gomitas con incorporación de extracto etanólico determinadas por 2 semanas.....	115
Tabla 47. Tabla de comparación de porcentaje de inhibición antes y después de la incorporación del extracto etanólico.....	116
Tabla 48. Test de WILCOXON para evaluación de la actividad antioxidante del extracto acuoso y etanólico de las bayas de sauco (<i>Sambucus peruviana H.B.K.</i>) antes y después de la incorporación a gomitas masticables.....	118
Tabla 49. Control de calidad organoléptico de las gomitas masticables.....	119
Tabla 50. Control de calidad fisicoquímico de las gomitas masticables.....	120
Tabla 51. Control de calidad microbiológico de las gomitas masticables.....	121
Tabla 52. Curva de calibración de TEP absorbancias v/s concentración.....	121
Tabla 53. Análisis de muestras en el grupo blanco absorbancias.....	123
Tabla 54. Análisis de muestras en el grupo control negativo absorbancias.....	123
Tabla 55. Análisis de muestras en el grupo control positivo absorbancias.....	124
Tabla 56. Análisis de muestras en el grupo experimental absorbancias.....	124
Tabla 57. Niveles de MDA por grupo.....	125
Tabla 58. Test de ANOVA para la evaluación del efecto antioxidante del extracto acuoso y etanólico de las bayas de sauco (<i>Sambucus peruviana H.B.K.</i>) antes y después de la incorporación a gomitas masticables.....	125

Tabla 59. Test de TUKEY para comparación múltiple de grupos.....	126
--	-----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Prueba de solubilidad de los extractos acuoso y etanólico.....	142
Anexo 2. Ficha de recolección de datos de la actividad antioxidante.....	143
Anexo 3. Ficha de recolección de datos de la cuantificación de polifenoles.....	144
Anexo 4. Cuantificación de polifenoles	145
Anexo 5. Ficha de recolección de datos de la cuantificación de antocianinas.....	146
Anexo 6. Cuantificación de antocianinas.....	147
Anexo 7. Protocolo de control de calidad de gomitas masticables.....	148
Anexo 8. Análisis microbiológicos de gomitas masticables.....	150
Anexo 9. ficha de recolección de datos para la cuantificación de MDA.....	151
Anexo 10. Certificado sanitario de los animales de experimentación (ratones).....	152
Anexo 11. Certificado de incineración de los animales de experimentación.....	153
Anexo 12. Registro de aspectos de bioética en el uso de animales de experimentación, durante los días de estudio.....	154
Anexo 13. Galería fotográfica.....	157

ÍNDICE DE FLUJOGRAMAS

Flujograma 1. Metodología general.....	67
--	----

CAPÍTULO I

1.1. GENERALIDADES

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Los radicales libres que actúan sobre nuestras células, viene siendo un problema serio en el mundo porque son la razón de aparición del estrés oxidativo que es producto de su actividad, tanto en nuestro país como en nuestra ciudad. Esto se da en la mayoría de las personas, cuya dieta alimentaria es deficiente en alimentos con propiedades antioxidantes, el problema se agrava ya que este se relaciona con diversas enfermedades crónico degenerativas como la enfermedad de Parkinson, artritis, enfermedades inflamatorias crónicas, la aterosclerosis, Alzheimer, derrame cerebral, cáncer, y entre otras. (1)

Visto de otro modo a nivel molecular, los radicales libres funcionan como potentes agentes capaces de oxidar y son causa del envejecimiento celular cuando se combinan con productos esenciales como las proteínas y el ADN a las cuales desestabilizan. (2)

Si el organismo no posee suficientes antioxidantes ya sea por baja ingesta o por agotamiento rápido, se da inicio al estrés oxidativo, que empieza dañando a las mitocondrias, produciendo menor energía para funcionar y, por consiguiente, el organismo la usa para la reparación del daño perdiendo así su capacidad de respuesta, de ese modo, tiene un inadecuado metabolismo formándose un círculo vicioso que daña a la célula seguida de los tejidos y terminando en las funciones del organismo. (7)

Los expertos coinciden en que la problemática del estrés oxidativo que existe en nuestro país, se basa en el tipo de vida actual que conlleva a malas prácticas alimentarias, ya que se ingiere mayor cantidad de alimentos con escaso valor nutricional y casi nula actividad antioxidante, siendo su dieta alimentaria; comida procesada con alto contenido de lípidos saturados y sal, alimentos chatarra, conservas que contienen productos químicos, bebidas con excesivo contenido de

sacarosa y glucosa como los refrescos, y al mismo tiempo reducen el consumo de alimentos saludables y naturales. (8)

La OMS señaló que en el año 2012 las enfermedades crónicas degenerativas por ejemplo, la diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer, cerebrovasculares y enfermedades respiratorias crónicas fueron las principales razones de mortalidad a nivel mundial y se les atribuye cerca de 56 millones de defunciones de los cuales más del 40% tenía menos de 70 años de edad y se prevé que el número seguirá creciendo cada año en regiones de bajos y medios ingresos económicos debido al insuficiente consumo de productos naturales y saludables como frutos y verduras que reducen la posibilidad de contraer estas enfermedades, más al contrario se incrementa el consumo de sal y grasas saturadas. (3)

En la actualidad existen muchos complementos nutricionales incorporados a los alimentos (alimentos funcionales); pero lamentablemente no son accesibles para toda la población por su alto costo.

En nuestro medio, encontramos muchos frutos usados por nuestros antepasados, a los cuales no se les da la debida atención como lo hacen en otros países, ignorando que estos productos alimenticios, accesibles a nosotros, podrían mejorar nuestra situación actual, frente al incremento de diversas enfermedades del tipo crónico degenerativas producidas por el estrés oxidativo.

Lo que se pretende es comprobar la acción y efecto sobre los niveles de malondialdehído (MDA) de gomitas elaboradas a base de un fruto nativo del Perú, las bayas de saúco, que contienen antioxidantes, vitaminas, minerales y fitoquímicos y así más adelante con formulaciones más saludables y libres de glucosa, brindar una nueva alternativa con actividad antioxidante apetecible para toda la población.

1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Presentarán la misma actividad antioxidante antes y después de la incorporación a gomitas masticables los extractos acuoso y etanólico de las bayas de saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.) y las gomitas formuladas con mejores características organolépticas poseerá efecto sobre los niveles de MDA?

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. OBJETIVO GENERAL:

- Valuar la actividad antioxidante de extractos acuoso y etanólico de bayas de saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.) antes y después de incorporados a gomitas masticables y determinar el efecto sobre los niveles de MDA en membranas de hepatocitos de las gomitas con mejores características organolépticas.

1.4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Realizar las pruebas preliminares (solubilidad y estudio fitoquímico cualitativo) de extractos secos, acuoso y etanólico de bayas de saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.).
2. Valuar la actividad antioxidante de extractos acuoso y etanólico de bayas de saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K), mediante la metodología de DPPH (secuestro de radicales libres).
3. Cuantificar los polifenoles totales mediante la metodología de Folin-Ciocalteu y las antocianidinas por la metodología de pH diferencial que fue descrita por Giusti y Wrolstad.
4. Formular gomitas masticables de ambos extractos, acuoso y etanólico de saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K) según dosis de antocianinas descrita en bibliografía (2.5 mg/kg).

5. Determinar la actividad antioxidante IC50 de gomitas masticables de ambos extractos, tanto acuoso como etanólico de saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K) con DPPH (secuestro de radicales libres) y así también precisar la formulación con mejor actividad antioxidante.
6. Realizar control de calidad fisicoquímico, organoléptico y microbiológico de las gomitas masticables.
7. Determinar el efecto sobre los niveles de MDA en membranas de hepatocitos de la formulación de gomitas masticables con buena actividad antioxidante in vitro y mejores características organolépticas mediante técnicas espectrofotométricas.

1.5. LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

Dificultad y obstáculos para conseguir reactivos controlados, falta de predisposición por parte de la autoridad universitaria encargada de brindar autorizaciones para la compra de estos.

1.6. JUSTIFICACIÓN

Por la practicidad, este trabajo de investigación sobre el comportamiento de los metabolitos secundarios con alto valor antioxidante frente a procesos de industrialización nos permitirá conocer y mejorar la viabilidad a la hora de industrializarlos de forma natural.

Desde el punto de vista de prioridad, este trabajo de investigación está orientada hacia enfermedades crónico degenerativas, hoy en la actualidad existe un mayor número de personas con enfermedades crónico degenerativas y evaluar un producto apetecible podría ayudarnos a sobrellevar esta situación ya que los alimentos ricos en antioxidantes considerados como alimentos funcionales a los cuales se puede describir como productos alimentarios naturales o procesados que son fundamentales de la dieta de cada día aportando gran cantidad de nutrientes; poseen adicionalmente diversos componentes bioactivos difíciles de digerir por lo cual actúan favorablemente en nuestro organismo (9), los cuales producen

un efecto benéfico deseado, es decir, son alimentos capaces de promover la salud más allá de la capacidad de nutrir.

Es importante también conocer la capacidad antioxidante real de estos alimentos, en vista de que poco a poco el mercado de alimentos funcionales se va agrandando y es necesario investigarlo partiendo de un modelo experimental in-vitro, conservando y resaltando las propiedades nutricionales y terapéuticas de la especie vegetal en estudio.

En el aspecto teórico este trabajo de investigación tiene el propósito de incrementar al conocimiento ya existente, si bien es cierto existen muchos estudios que muestran los efectos beneficiosos del Sauco como, efecto sobre los niveles de MDA, antihipertensivo, antiviral y diversos efectos beneficiosos debido a componentes fenólicos (entre ellas las antocianinas), terpenoides (6) así también son protectores contra el cáncer de próstata y diversas enfermedades neurodegenerativas (6). El aporte consiste en determinar si la actividad antioxidante presente en el extracto seco se mantiene luego de la incorporación a gomitas masticables y de ser el caso comprobar si existe efecto sobre los niveles de MDA en membranas de Hepatocitos in vivo del producto alimentario terminado.

La intención de la elaboración de un alimento funcional con gran poder antioxidante, bajo la forma de gomitas masticables puede ser una alternativa ante este problema de estrés oxidativo, ya que es un producto que talla entre los alimentos de consumo diario previniendo los efectos causados por especies reactivas (moléculas altamente reactivas) sobre la normal función fisiológica de los seres vivos. (10)

Las terapias antioxidantes y alimentos ricos o enriquecidos con antioxidantes, pueden prevenir y disminuir el deterioro de la función orgánica ocasionado por el excesivo estrés oxidativo. (4) Basado en lo anterior, se comprobó la actividad antioxidante en gomitas masticables mediante un modelo cuasi experimental in-vitro y posteriormente el efecto sobre los niveles de MDA in vivo; de modo que estas sean al alcance económico de la población. Y por

qué no, al mismo tiempo revalorar este fruto andino – nativo de nuestra región del Cusco.

1.7. HIPÓTESIS

Los extractos acuoso y etanólico de las bayas de saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.), poseen la misma actividad antioxidante antes y después de la incorporación a gomitas masticables y la formulación de gomitas con mejores características organolépticas posee efecto sobre los niveles de MDA en membranas de hepatocitos.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

Hoy en día existen alimentos con diversos agregados no digeribles (fitoquímicos), que actúan en el organismo de varias formas en su gran mayoría son antioxidantes, estas no son productos indispensables para el cuerpo, pero su consumo actúa como protector adicional contra el exceso de radicales libres que da lugar al estrés oxidativo que procede de la mala dieta alta en sales y preservantes; así también del entorno ambiental, a esta consecuencia de paralizar y/o desaparecer los procesos perjudiciales tal como los producidos en un proceso canceroso, se le denomina “quimio prevención”, por el consumo de los alimentos que contienen fitoquímicos exquisitos en antioxidantes con valores bioquímicos corroborados. Hoy en día una de las maneras de relentizar el curso canceroso es por medio del consumo de productos llenos de antioxidantes. (11)

2.1. ANTECEDENTES:

2.1.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES

- **AGUIRRE LOPEZ NICOLAS, desarrollo de un colorante natural desde el fruto del sauco negro (*Sambucus nigra*) para uso en la industria alimentaria. ECUADOR, 2018 – TESIS.**

Este estudio tuvo como objetivo desarrollar un colorante natural desde el fruto de sauco negro (*Sambucus nigra*) para uso en la industria de alimentos. Usando la metodología de distintos tipos de extracción como maceración en etanol al 90%, maceración en agua y liofilización. Así mismo se usó una metodología para la elaboración de gomitas a 10, 20 y 40 ml de adición de colorante.

Los resultados hicieron notar que el extracto acuoso daba superior aceptabilidad, en cuanto al mejor color lo dio el extracto alcohólico. (12)

2.1.2. ANTECEDENTES NACIONALES

- **RUIZ REYES SEGUNDO, Capacidad antioxidante in vitro de los flavonoides totales obtenidos de las hojas de *Sambucus peruviana* H.B.K. (sauco) proveniente de la ciudad de Huamachuco. HUAMACHUCO, 2013 -. TESIS.**

con el objetivo de evidenciar la capacidad antioxidante in vitro de flavonoides totales procedentes de hojas de *Sambucus peruviana* H.B.K, para su posible uso previniendo enfermedades causadas por estrés oxidativo, se cuantificó flavonoides totales con la metodología detallada por Kostennikova Z., Saponinas, encontrándose Aminoácidos, Triterpenos/esteroles, Antocianidinas Lactonas, Flavonoides y Polifenoles. Finalmente, el porcentaje de flavonoides totales fue de 0.4775% expresados como quercetina. En conclusión, la capacidad antioxidante de los flavonoides totales provenientes de hojas de saúco es completamente similar a su concentración y al tiempo de exposición frente al radical DPPH. (13)

- **FLORES EDILBERTO Extracción de Antioxidantes de las Bayas del Sauco (*Sambucus nigra* L. subsp. *peruviana*) con Ultrasonido, Microondas, Enzimas y Maceración para la obtención de Zumos Funcionales, AREQUIPA, 2017 – artículo científico.**

- Con el objetivo de valorar la sustracción de bioactivos antioxidantes procedentes de bayas de saúco con diversos métodos de sustracción (maceración, ultrasonido, enzimas, microondas o sus combinaciones), para obtener zumos de saúco de gran porcentaje de fenoles totales y antocianinas, una con gran actividad antioxidante, El método utilizado fue diferencial de pH para antocianinas, método de Folin para fenoles totales y tras reducir el ion de cobre y capturar el radical catión del ácido 2,2'-azino- bis- (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) se concluye que tras macerar por 20 minutos a 70 °C se obtiene mejores características

antioxidantes, seguido de microondas, enzimas y ultrasonido, con el zumo que se obtuvo mediante la maceración se preparo un refresco con buena actividad antioxidante y buen sabor (14).

- **TRONCOSO LUZMILA, efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petrosilium sativum* (Perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol., LIMA, 2011 – Artículo científico.**

En esta investigación el objetivo se centró en valorar el efecto antioxidante y hepatoprotector del perejil (*Petrosilium sativum*) en ratas con intoxicación hepática inducida por paracetamol, el método utilizado fue analítico prospectivo, transversal y cuasi experimental en el cual fueron utilizadas 40 ratas albinas Holtzman machos adultos, a los cuales se les administro extracto de perejil, se realizó determinaciones en suero sanguíneo para determinar transaminasas, por el método de Ellman se determinaron grupos sulfidrilo, mediante la metodología de biuret proteínas totales, con la metodología de verde de bromocresol albumina sérica, en sobrenadante hepático, estudiandose superóxido dismutasa, catalasa descrita por Aebi, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa según Deutsh J.

Se obtuvieron resultados positivos para el perejil (*Petrosilium sativum*), este mostro un mejor efecto frente al fármaco hepatoprotector evaluando transaminasas, la glucosa -6- fosfato deshidrogenasa y las TBARS mostraron diferencia significativa entre todos los grupos.

En conclusión, el extracto de perejil posee mejor efecto antioxidante y hepatoprotector que el fármaco patrón. (15)

2.1.3. ANTECEDENTES LOCALES

Hasta la fecha no existen trabajos relacionados a la actividad ni efecto antioxidante del Saúco (*Sambucus peruviana H.B.K.*) en la ciudad del Cusco.

2.2. BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS

2.2.1. SAÚCO (*Sambucus peruviana* H.B.K.):

El saúco, conocido también como “árbol de Dios”; es originario del Perú; pero fue introducida por los españoles y logró aclimatarse (16), se distribuye ampliamente en diversas zonas del Perú como Apurímac, Lima, Huancavelica, Ancash, Cusco y Junín tiene buena adaptación a diversos rangos altitudinales, desde los 2800 hasta los 3800 msnm, pero el óptimo rango varia de 3200 a 3800 msnm. (17,18)

El saúco del Perú produce una baya comestible que se consume como fruta y como mermelada por su aporte de vitamina C.

La base del tronco del *Sambucus peruviana* H.B.K, es voluminosa e irregular, con presencia de nudos y ramificación simpoidal opuesta, su corteza externa es áspera, llega a medir hasta 4 ó 5 metros de altura.

Su baya es triocular con 4 a 5 semillas, con embrión pequeño, carnoso de color violeta tendiente a negro. (16)

Sambucus peruviana H.B.K, tiene que ser cultivado en vista de que sus semillas no son fértiles por ello no se les encuentra en forma silvestre.

Los frutos inmaduros contienen una cantidad elevada de cloruros por lo que su ingesta suele provocar trastornos digestivos. Se sabe que el producto contiene proteínas inhibidoras de los ribosomas pero que no son toxicas. (19)

2.2.1.1. TAXONOMIA

Taxonómicamente este género se clasifica, así como se visualiza a continuación en la tabla 1.

TABLA 1. Clasificación taxonómica del saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.).

REINO	Vegetal
DIVISION	Fanerógamas
SUB-DIVISION	Angiospermas
CLASE	Dicotiledóneas
SUB-CLASE	Asteridae
ORDEN	Dipsacales
FAMILIA	Caprifoliaceas
GENERO	<i>Sambucus</i> L.
ESPECIE	<i>Sambucus peruviana</i> H.B.K.

Fuente: Rosales Torpoco. 2015

El género *sambucus* L., está distribuido entre 20 y 40 especies en todo el mundo y en nuestro país existen 3 especies distribuidas ampliamente según la tabla 2. (5)

TABLA 2: distribución del género *Sambucus* L. en el Perú.

ESPECIE	ALTITUD (msnm)	DISTRIBUCION	ESPECIE NATIVA	ESPECIE INTRODUCIDA
S. <i>canadienses</i> L.	0 – 1500 msnm	Huánuco y Lima.		X
S. <i>peruviana</i> H.B.K.	2000 – 4000 (msnm)	Amazonas, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Lima, Pasco y Junín.	X	
S. <i>mexicana</i> C. Presl Ex DC.	0 – 2000 (msnm)	Huánuco, Loreto, San Martín.	X	

Fuente: adaptado de Brako y Zarucchi, 1993., citado por Rosales 2015.

2.2.1.2. COMPUESTOS QUÍMICOS:

En cuanto al análisis bromatológico, se reporta según la tabla 3.

TABLA 3. Análisis bromatológico del saúco.

COMPONENTE	<i>S. peruviana</i> H.B.K.
MASA SECA%	14.08
CELULOSA% ¹	8.13
HEMICELULOSA% ¹	2.16
CARBOHIDRATOS SOLUBLES% ¹	40.46
ENERGIA DIGESTIBLE Kca/kg ¹	2.84
ENERGIA BRUTA Kcal/kg ¹	4.57
pH ²	4.0
PROTEINAS (gr) ²	1.5
FIBRA (gr) ²	1.7
GRASA (gr) ²	0.3
CENIZA (gr) ²	0.9
CALCIO (mg) ²	30.6
FÓSFORO (mg) ²	23
HIERRO (mg) ²	2
VIT. C. (mg) ²	17.8

Fuente: Comisión Nacional contra la piratería, Citado por Paucar Quispe, 2014.

La especie *Sambucus peruviana*, al igual que la especie *Sambucus nigra*, presenta distintos metabolitos secundarios, así como (5):

- Antocianinas.
- Azúcar.
- Aceites esenciales.
- Ácidos orgánicos.
- Abundante Vit. C.
- Glucósidos (rutina y sambunigrina).
- Taninos

En tanto durante la maduración de las bayas la cantidad de azúcares y ácidos orgánicos varía según estado de maduración.

TABLA 4. Porcentaje de sólidos solubles totales en diferentes estadios de maduración de las bayas de saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.)

ESTADO DE MADUREZ	SOLIDOS SOLUBLES TOTALES
Verde	2,3 – 3,2
Pintón	4,7 – 7,2
Maduro	6,5 – 7,2

Fuente: Cahuana, 1991; citado por Rosales 2015.

2.2.1.3. BENEFICIOS DE LAS BAYAS DE SAÚCO. (17,18)

- Reduce o elimina los estados febriles
- Aportan diversas vitaminas al organismo como la A, C y el complejo B.
- Posee propiedades hipolipemiantes.
- Aporta diversos minerales al organismo como Ca, Fe, Mg, K, P, Na, y Zn.).
- Actúa como potente antioxidante eliminando radicales libres por la presencia de antocianinas.
- Posee propiedades astringentes.
- Posee propiedades diuréticas favoreciendo la eliminación de tóxicos ingeridos a través de la orina.
- Previene y alivia los estados catarrales y gripales.
- Posee propiedades antiinflamatorias, antirreumáticos.
- Estimula el sistema inmunológico.
- Antitífico.
- Antiséptico.

2.2.1.4. PRODUCTOS QUE SE PUEDEN ELABORAR A PARTIR DE LAS BAYAS DE SAÚCO (5,18)

Las bayas de Saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.), son muy utilizadas dentro de la industria de alimentos por su llamativo color, en tanto, para tales procesos se debe eliminar la cubierta o piel de las bayas para así aprovechar

al máximo la pulpa; pero antes se transfieren los pigmentos hacia el medio líquido, los productos más comercializados son:

- Jaleas.
- Mermeladas.
- Vinos.
- Néctar.
- Yogurt.
- Helado.
- Extracto.
- Pulpa.
- Licores.
- Refrescos.

2.2.2. ANTIOXIDANTES

En general son antioxidantes los compuestos o moléculas que provienen del mecanismo endógeno de defensa y de la dieta diaria que, retardan, previenen y paralizan el proceso oxidativo (20) como se muestra en la figura 1, donando electrones para interferir con el inicio y continuación de todas las reacciones denominadas auto oxidación que se dan en cadena (3). Por otra parte, todos los seres vivos obtienen la energía a través de la utilización del oxígeno, liberando radicales libres durante el proceso, estos radicales libres se neutralizan a través de los mecanismos celulares de defensa denominados antioxidantes, pero; puede ocurrir daño celular si los niveles de los mismos son demasiado bajos para apalejar el estrés oxidativo. (21)

Los fenómenos de auto oxidación contribuyen con el inicio o aparición y favorecen el progreso de las enfermedades crónico degenerativas. (3)

Las propiedades antioxidantes de las fuentes vegetales no solo son importantes por la función químico - biológica que desempeña sino también por su capacidad

de paralizar el deterioro oxidativo que afecta a la producción en industrias alimentarias, que son adicionados a productos ricos en grasas para prevenir el comienzo de la rancidez. (20)

Así como la falta de antioxidantes causa lesión celular por acumulación excesiva de radicales libres un exceso de antioxidantes también puede desencadenar perjuicios en la salud, favoreciendo la acción oxidante en vez de impedirla. Así mismo, el consumo de vitamina E en dosis máximas aumenta el riesgo de muerte prematura. (22)

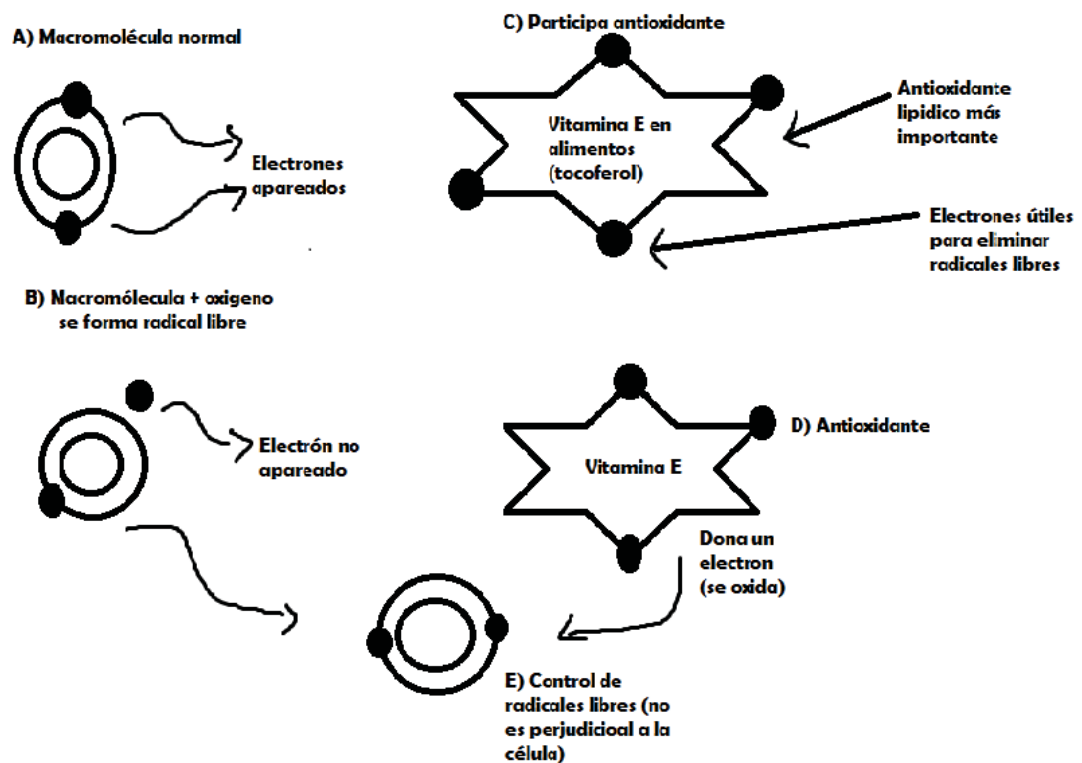


FIGURA 1. Interacción entre radicales libres y antioxidantes

Fuente: CORONADO H., 2015

2.2.2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES

Existen diferentes clases de compuestos antioxidantes, estos se clasifican según su origen en antioxidantes endógenos y antioxidantes exógenos así también según su lugar de acción como se muestra en la tabla 5 y 6. (9,21,23,24)

Tabla 5. Antioxidantes exógenos y la acción que ejercen en un lugar de la célula

EXÓGENOS	ACCIÓN	LUGAR DE ACCIÓN.
Vitamina E.	<ul style="list-style-type: none"> • Neutraliza el oxígeno singlete. • Captura radical libres hidroxilo. • Captura O₂. • Neutraliza peróxidos. 	Membrana y extracelular.
Vitamina C.	<ul style="list-style-type: none"> • Neutraliza el oxígeno singlete. • Captura radicales libres hidroxilos. • Captura O₂. • Regenera la forma oxidada de la Vitamina E. 	Extracelular
Betacarotenos	<ul style="list-style-type: none"> • Neutraliza el oxígeno singlete. 	Membrana
Polifenoles (antocianinas)	<ul style="list-style-type: none"> • Secuestrar y neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS) como (O₂, H₂O₂, HClO). • Inhiben enzimas generadoras de ROS, como la xantina oxidasa y la nicotiana-mida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH).³⁹ 	-

Fuente: elaboración propia, tomado de DRAGO M. 2006, CHASIPANTA R. 2016; QUIÑONES M. 2012.

Tabla 6. Antioxidantes endógenos, la acción que ejercen en un lugar de la célula y sus cofactores

ENDOGENOS	ACCIÓN		LUGAR DE ACCIÓN.
	Enzimáticos	cofactor	
Superóxido dismutasa (SOD)	Disminuye radicales superóxidos.	Cobre, sodio, magnesio.	Intracelular, citoplasma y mitocondria.
Catalasa (CAT)	Elimina peróxido de hidrógeno.	Hierro.	Intracelular Citoplasma y mitocondria.
Glutación peroxidasa (GPx)	Elimina el H ₂ O ₂ y los hidroperóxidos orgánicos.	Selenio.	Citoplasma y mitocondria.
No enzimáticos			
Glutación	Son barreras fisiológicas que se sobreponen al paso del oxígeno desde el aire hasta el interior de las células.		Intracelular
Coenzima Q.	Inhibe la proliferación de las células cancerosas		Membrana.
Ácido Tioctico	Actúa como transporte de metales (transferrina y ceruloplasmina)		Extracelular

Fuente: elaboración propia, tomado de DRAGO M. 2006, ZAMORA S. 2007, CHASIPANTA R. 2016.

2.2.2.2. ANTIOXIDANTES NATURALES.

En la naturaleza hay diversos antioxidantes de fuente natural estos se pueden introducir en nuestra dieta diaria.

- **Vitamina E:**

Comprende a los diversos componentes fenólicos como los tocotrienoles y tocoferoles como se muestra en la figura 2, entre estos el más común y mayoritario en acción vitamínica el tocoferol se muestra a las principales en la figura 3. (9)

Tiene por característica ser un antioxidante lipofílico que actúa a nivel de las membranas celulares y se le atribuye la protección de las moléculas lipídicas como fosfolípidos de la peroxidación; así también paraliza al oxígeno singlete, capturando los RL "OH", paraliza peróxidos y retiene el anión superóxido reduciéndoles hasta compuestos menos reactivos. (9)

La vitamina E en general presenta muchas funciones beneficiosas para el organismo, esto ha motivado a los investigadores a estudiar la relación que existe con el estrés oxidativo. (25)

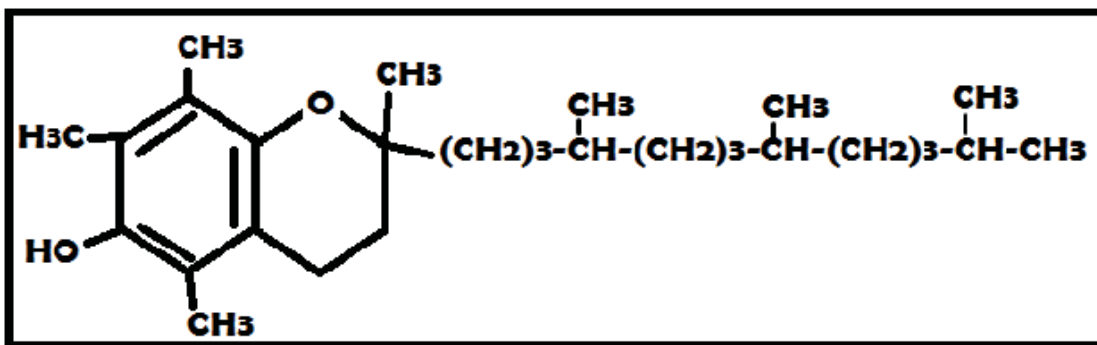


Figura 2. Estructura química de la vitamina E, Fuente: ARISTIZABAL GIRALDO (2004)

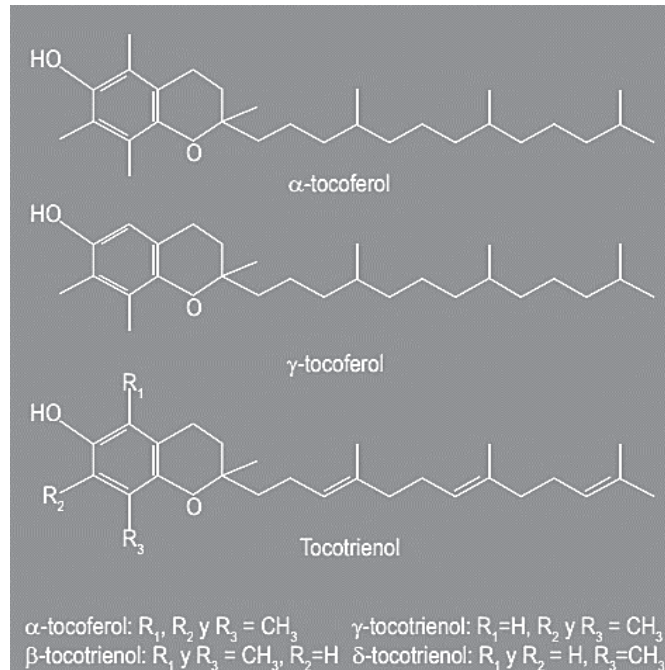


Figura 3: Estructura química de los tocoferoles más abundantes en la naturaleza. Fuente: BARRERA M., 2018.

- **Vitamina C:**

Se denomina ácido ascórbico, es una vitamina con característica afín al agua, que incrementa la actividad de la vitamina E.

Previene la oxidación lipídica y protege de la mutagénesis (26), sus funciones primordiales son paralizar al O_2 singlete, capturar radicales OH, así también aniones superóxido, por otra parte, la vitamina C es capaz de restaurar a la vitamina E oxidada gracias a su estructura como se ve en la figura 4, actuando como su aliado. (9)

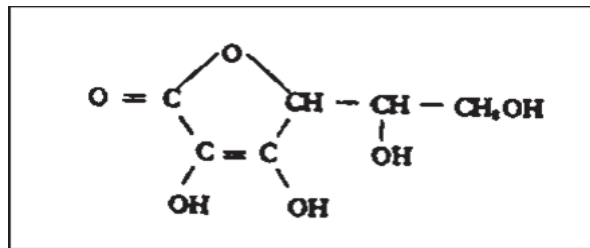


Figura 4. estructura química del ácido ascórbico. Fuente: ROBINSON 1991

- **Betacarotenos:**

Es un importante antecesor de la vitamina A, de característica liofílica que paraliza al oxígeno singlete y regenera la vitamina C que reacciona con un radical libre. (9)

Al igual que la vitamina A como se muestra en la figura 5, su deficiencia genera queratosis y ceguera, este antioxidante tiene la particularidad de capturar las ERO que se producen al nivel cutáneo por efecto de la radiación UV. Por ello se le encuentra mayoritariamente en cremas protectoras solares en vista de que previene el cáncer a la piel.

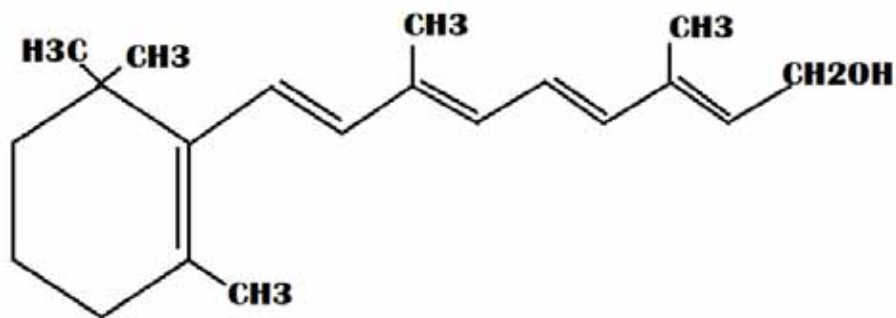


Figura 5. Estructura química del retinol (vitamina a). Fuente: ROBINSON 1991

- **Polifenoles:**

Tienen la característica de estar compuestos por varios anillos fenólicos, la biosíntesis de polifenoles se forma del metabolismo no esencial o denominado “secundario” de las plantas por diversas rutas; como la del ácido shikímico y los poli-acetatos dando lugar a diversos metabolitos secundarios como flavonoides y antocianinas.

Las propiedades de estos compuestos son similares a las de la vitamina C.

La inserción de polifenoles en la dieta diaria tiene un efecto benéfico en la cantidad en sangre de los antioxidantes que previenen la oxidación, existen fuentes significativas de polifenoles en alimentos de consumo cotidiano como se muestra en la tabla 7, algunas frutas poseen hasta 300 miligramos de polifenoles en 0,1 kilogramos, a su

vez él te o el vino solo posee 100 miligramos. Además, están conformados por diversos grupos de flavonoides siendo los principales los de la figura 6. (27)

Los polifenoles son muy importantes en vista de que capturan radicales libres formando reacciones como en la figura 7 previniendo el estrés oxidativo que produce diversas enfermedades crónico degenerativas como el cáncer (27).

Tabla 7. Principales clases de polifenoles y fuentes naturales

CLASE DE POLIFENOL	EJEMPLOS	FUENTES
ANTOCIANIDINAS	Cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina y sus glicosidos.	Vino tinto, algunos cereales, frijoles, berenjenas y rábanos.
FLAVONOLES	Catequina, epigallocatequina, epicatequina, galocatequina.	Té verde
FLAVANONAS	Hesperetina, naringina, hesperidina, homoeriodictiol, naringenina.	Pomelo, menta, naranja, jitomate, limón.
FLAVONAS	Apigenina, sinensetina, luteolina, tangeretina, nobiletina.	Perejil, piel de cítricos, apio, mijo, trigo.
FLAVONOLES	quercetina y sus glicósidos, Kaempferol, miricetina.	Cebolla, arándanos, col rizada, puerros, brócoli, vino tinto, te.
ISOFLAVONAS	Daidzeina, gliciteina genisteina.	Soya, leguminosas, cacahuete.
ACIDOS HIDROXIBENZOICOS	Ácido gálico, ácido vinílico ácido, hidroxibenzoico.	Frutas rojas (frambuesa, grosella, fresa) te, trigo.
ACIDOS HIDROXICINAMICOS	Ácido cafeico, ácido sinapico, ácido ferulico, ácido cumarico.	Kiwis, , avena arándanos, , trigo, manzanas, arroz.
LIGNANOS	Pinosinol, podofilotoxina.	Semilla de lino, brócoli, sésamo, centeno, trigo, avena, cebada, col.
ESTILBENOS	Resveratrol	Vino.
TANINOS (PROANTOCIANINAS)	Procianidinas	Te, vino, chocolate

Fuente: GONZÁLEZ J.2015

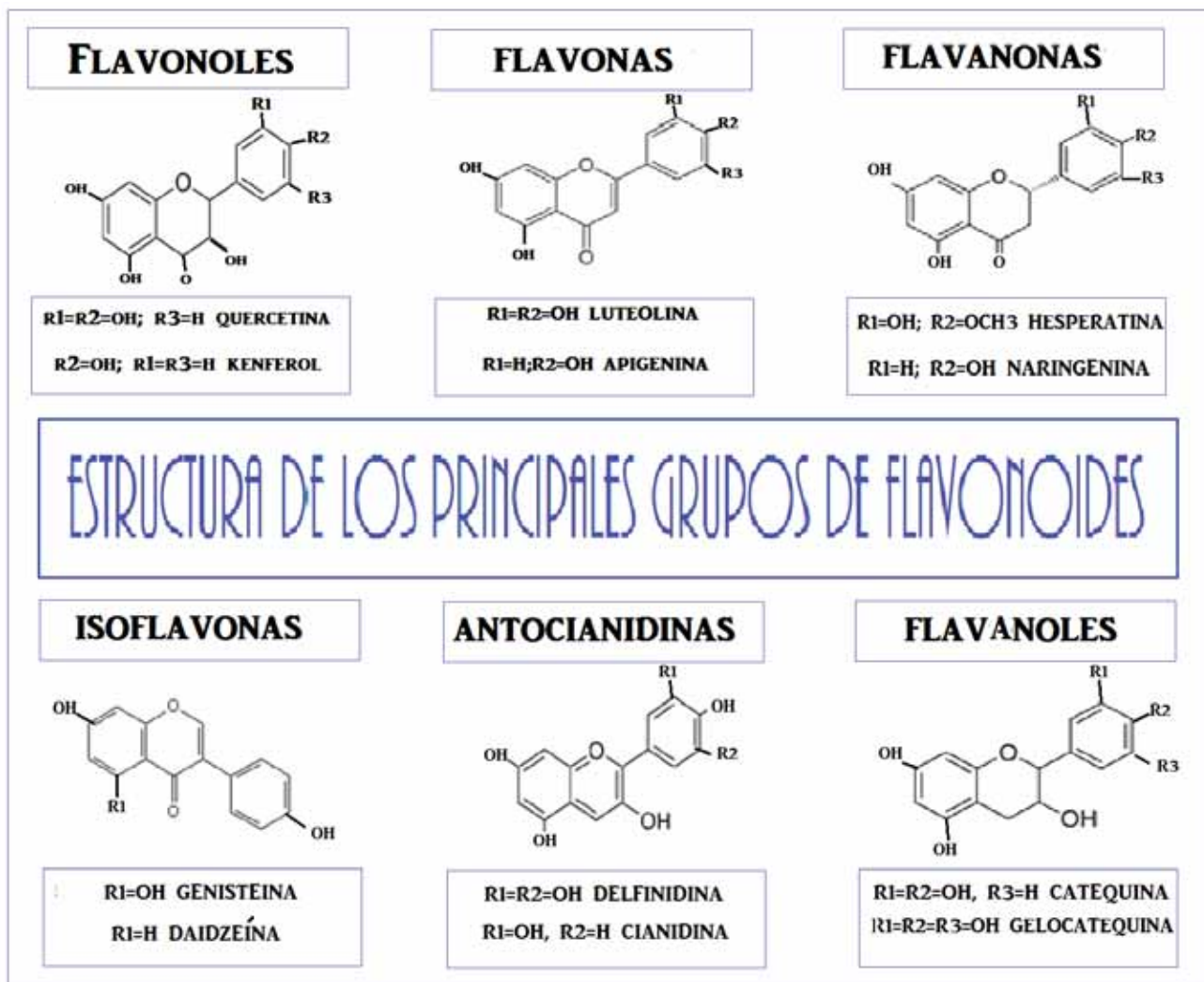


Figura 6: Estructura de los principales grupos de flavonoides. Fuente: DÍAZ G., 2015

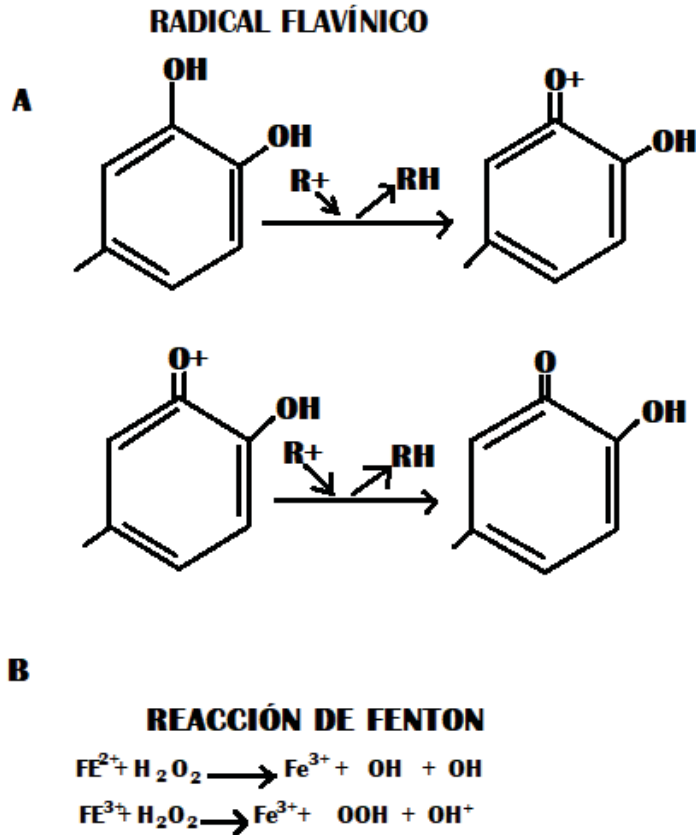


Figura 7. Formación del radical flavínico por la captura de radicales libres por los polifenoles (a); reacción de fenton (b). FUENTE: QUIÑONEZ M., 2012

- **Antocianinas:**

El termino viene del griego donde anthos tiene el significado de flor y el termino kyanos, azul (28) se compone por un grupo de colorantes naturales hidrosolubles perceptibles al ojo humano, tienen una disminuida estabilidad por su latente sensibilidad a la luz, el pH, el oxígeno, etc. (29,30), proveniente de plantas, estos metabolitos secundarios forman parte de los flavonoides del tipo fenólico que están en forma glicosilada, son la razón de formar colores como, rosa, rojo, violeta, malva y azul (28) de diversos frutos existentes en flores, bayas, frutos y hojas. (31,32)

Su estructura básica es el 2-fenilbenzopirilo, también denominada sal de flavilio como se visualiza en la figura 8, estos existen a modo de polimetoxiderivados de sal; es una aglicona a la que por medio de un enlace glucosídico se le une un azúcar. (28)

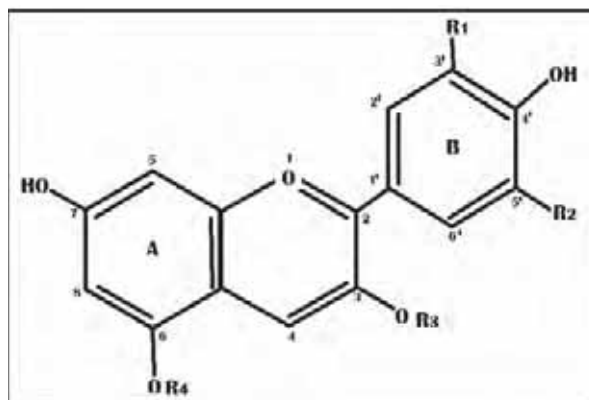


Figura 8. el catión flavilio, R1 y R2-H, -OH, O OCH3, R3 - - glicosilo, R4 = -H O – glicosilo. Fuente: SANCHEZ R., 2017

✓ **Factores que afectan su estabilidad:**

- **El pH**, las antocianinas son estables en soluciones ácidas inferiores a 2, virando hacia un color rojizo, a pH neutro son incoloras con pH basico su coloración se torna amarillenta que vira posteriormente hasta azul. (28,32)
- **Alta temperatura**, mayores a 70°C destruye las antocianinas las hacen inestables y retornar al estado flavilio es muy lento. El incremento del calor hace que se pierda una estructura de azúcar específicamente en el puesto 3 rompiendo el anillo pasando a formar chalconas incoloras. Estos metabolitos resisten altas temperaturas, pero solo por un corto tiempo. (28)

- **presencia de oxígeno**, con su presencia los productos viran a color marrón con ayuda del ácido ascórbico los cuales las inestabiliza provocando perdida de color, son más estables a ausencia de oxígeno y cantidades de ácido ascórbico bajas, fenoles, azúcares reductores y aminoácidos. (33)
- **presencia de metales** como cobre, aluminio y hierro alteran el color en antocianinas que poseen un anillo B. (32)
- **El efecto de la luz**, porque apresura la oxidación de antocianidinas, los sulfonatos de flavonas poli hidroxiladas, auronas y las isoflavonas, realizan foto protección para evitar la foto degradación, este efecto hace posible la interacción de los anillos intermoleculares entre el sulfonato que tiene carga negativa y el ion flavilio que posee carga positiva. (28)
- **los azúcares**, la alta concentración de azúcar estabiliza a las antocianinas, porque la actividad del agua se ve disminuida, la degradación de las antocianinas se basa en la reacción química denominada Maillard, estas moléculas complejas se adensan con las antocianinas y forman compuestos de coloración parda. (28)

2.2.3. CRIOCONCENTRACIÓN (34)

Es un proceso habitual en las industrias de alimentos líquidos, a este proceso también se le conoce como concentración por congelación, la ventaja de esta técnica es que conserva de mejor manera el olor, color y sabor además de sus propiedades nutritivas alimentarias. Consiste en concentrar sólidos

solubles de las soluciones acuosas a partir del congelamiento parcial o total del fluido alimenticio. (35)

- VENTAJAS (34):
 - ✓ Requiere equipos simples.
 - ✓ Se ejecuta muy bien a pequeña escala.
 - ✓ Permite manejar diferentes etapas en el proceso, dentro del mismo equipo, como son la congelación, maduración y separación.
 - ✓ La eficiencia en la separación es controlada por medio del ajuste de las variables de proceso.
 - ✓ Conserva la calidad del principio activo.

2.2.4. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

METODO ABTS (36):

Según KUSKOSKI, el radical $ABTS^{*+}$ proviene de la reacción obtenida de ABTS (7Mm) tratado en presencia de persulfato potásico (2.45 Mm, a concentración final) incubando a 25°C, alejado de la luz por 16 horas.

Cuando se forma el radical $ABTS^{*+}$ se hace una dilución usando alcohol para tener una absorbancia de 0.70 a 754 nm, las antocianinas se filtran y se diluyen con alcohol hasta producir una inhibición del 20% al 80%, con referencia al blanco después de añadida la muestra.

Se toma 980 μ L del radical $ABTS^{*+}$ se lee a A_{754} a 30°C, luego se le agrega 20 μ L de la antocianina y se lee nuevamente a A_{754} después de 1 minuto y luego de 7 minutos.

Se usa el trolox como antioxidante sintético a concentración final de 0 – 15 μ m en alcohol bajo el mismo tratamiento, el resultado se expresa como TEAC.

METODO DPPH (37)

El DPPH posee un electrón sin par, por ello tiene un color violeta a 517 nm.

El porcentaje de inhibición se define como:

$$Q = 1 - \frac{A_m}{A_c} \times 100$$

Donde:

Am: Absorbancia de la muestra

Ac: Absorbancia del reactivo DPPH.

Se toma 0,2 mL de la anterior solución de la muestra a evaluar, adicionar 2 mL de DPPH, agitando vigorosamente y reservar por 30 min. Luego se lee por espectrofotometría UV – V a 517 nm.

Se realiza los mismos pasos para el trolox o ácido gálico.

MÉTODO DE CAPACIDAD DE ABSORCION DE RADICALES LIBRES DE OXÍGENO (ORAC) (38)

Se prepara 3 ml de la siguiente solución: 2,899 mL de buffer fosfato a concentración 75 mM y a Ph 7.4, 21 µL de fluoresceína 10 µM, 0,05 mL de AAPH 600 mM (2,20-Azo-bis (2-amidinopropano) dicloruro) y 0,03 mL de muestra o trolox 500 µg (estándar).

Se registra la fluorescencia en un espectrofluorómetro con multicelda termostaticada. El resultado ORAC es calculado mediante una curva de calibración con trolox.

2.2.5. RADICALES LIBRES

Son átomos los cuales poseen un electrón desapareado en su nube electrónica exterior, por ello, son muy inestables y de alta energía debido a que los electrones libres le proporcionan una gran reactividad lo que les permite capturar cualquier electrón libre de la molécula más cercana para alcanzar su estabilidad electroquímica. (39)

Los radicales libres especialmente el OH⁻ y -O₂, facilitan la secuencia de reacciones de lipoxidación y daños semejantes en ácidos nucleicos y proteínas en vista de que producen alquilperóxidos. (23)

Cabe resaltar que el proceso en el que se pierden electrones captando así el oxígeno o también cediendo hidrógeno (deshidrogenación) se denomina oxidación y la reducción es todo lo contrario ya que se captura electrones o se pierde oxígeno; entonces las reacciones de oxidación y reducción siempre van como pares conjugados, mientras uno se oxida el otro se reduce, así una de las moléculas se convierte en un radical libre creando un ciclo de oxidación, a pesar que estos son de vida muy corta son altamente reactivos llegando a dañar millones de moléculas mediante un proceso continuo por siempre. (23,39)

Por otra parte, las ROS y las RNS se producen por el metabolismo celular que son reguladas mediante enzimas tales como las NADPH y la NOS, estas enzimas son beneficiosas para la salud por su función a nivel celular, pero si las cantidades se elevan podrían ser nocivas para la salud. (39)

Los radicales libres a bajas concentraciones son beneficiosas para la salud ya que participan en procesos de señalización celular; el problema ocurre cuando se rompe el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, entonces si se supera el límite de generación de radicales libres en comparación a antioxidantes se da inicio al estrés oxidativo que es promotor de las

enfermedades crónico degenerativas ya que al incrementar la producción de radicales libres o estimulación continua de las NADPH daña los lípidos celulares, membranas, proteínas y ADN, así de esta forma se altera el normal funcionamiento celular. (39)

2.2.5.1. RADICALES LIBRES DERIVADOS DEL OXÍGENO (39).

Son especies transitorias, pero por su elevada reactividad producen la oxidación celular entre estos se tiene:

- Alcoxilo (RO°)
- Superóxido (O°_2)
- Óxido nítrico (NO°)
- Peroxilo (ROO°)
- Hidroxilo ($^\circ\text{OH}$)

Existen otras moléculas reactivas importantes tales como el oxígeno singlete, el HOCL y el H_2O_2 , este último es el principal precursor de la especie reactiva hidroxilo ($^\circ\text{OH}$).

Los seres vivos dependen de oxígeno para vivir por tanto los procesos oxidativos son inevitables, se estima que alrededor del 1 – 3% del O_2 no respirado pasa a ser parte de la especie reactiva O°_2 . Por otra parte, en la cadena respiratoria se crea ATP (trifosfato de adenosina) en las mitocondrias; pero en este proceso también se escapan un número reducido de electrones que actúan con el oxígeno molecular dando de esta forma origen a nuevos radicales O°_2 .

Estos radicales formados en las mitocondrias poseen una alta carga eléctrica por tanto el ADN mitocondrial (ADN mt), se ve severamente afectado por las ROS, de esta forma se da origen a las enfermedades crónico degenerativas.

Otra característica de las O°_2 , es que posee alta afinidad hacia proteínas ricas en hierro (Fe) y grupos tioles provocando alteración en la actividad de las proteínas.

La excesiva cantidad de radicales O°_2 promueven la liberación de Fe de las estructuras moleculares que lo poseen; este catión libre Fe^{2+} participa en la reacción fenton y genera el radical $^{\circ}OH$.



En el organismo se poseen enzimas que apalean estas reacciones de oxidación como la xantina oxidoreductasa (XOR), esta enzima posee un flavin adenin dinucleotido (FAD) que actúa en el catabolismo de las purinas generando ácido úrico y este último actúa como potente antioxidante y secuestradores de radicales libres.

Así también los ROS se forman en los peroxisomas, organelos del citosol ya que estos son ricos en oxidasas que actúan en funciones metabólicas celulares, en este tipo de proceso el consumo de oxígeno (O_2) produce peróxido de hidrogeno (H_2O_2) el cual posteriormente oxida las estructuras celulares, pero gracias a la enzima catalasa (CAT) se transforma en H_2O y se evita la acumulación. (39)

2.2.5.2. ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DEL NITRÓGENO. (39)

Estos radicales libres poseen moléculas de N y son potencialmente oxidativos así tenemos al NO° y NO°_2 .

Estos generan un estrés nitrosante o nitrosativo, que produce una nitrosilación de estructuras proteicas incorporando un nitrosilo a las proteínas $-N=O$, alterando su formación y funcionalidad. Así como alteran las proteínas también hacen lo mismo con el ADN y junto con las ROS rompen la cadena de nucleótidos generando grandes daños a la célula que incluso deja de funcionar muriendo por apoptosis.

Existen otros compuestos altamente reactivos como el anión peroxinitrito que puede dañar la molécula y por ende la funcionalidad de las estructuras, aminoácidos y enzimas.

2.2.6. ESTRÉS OXIDATIVO

Este término no se relaciona con el estrés cotidiano emotivo que tiene raíces en la problemática que afecta al ser humano en su vida cotidiana (familia, labores, etc.). Este término está ligado a la función celular y su acción frente a los radicales libres y otras especies reactivas endógenas y exógenas, específicamente se refiere al incremento descontrolado de radicales libres. (20,23)

Si se logra una estabilidad y equilibrio entre la producción de antioxidantes y radicales libres, la toxicidad por oxidación es disminuida y produce menor daño a las células, al ocurrir un desequilibrio se asocia con un decaimiento del sistema antioxidante y se descontrola la propagación. (20)

La obesidad también es un factor muy crucial en el incremento del estrés oxidativo en vista de que el tejido adiposo almacena grasa y actúa como secretor de citoquinas y hormonas, produciendo un gran número de especies reactivas de oxígeno, también segrega una elevada cantidad de péptidos fisiológicamente activos como son la leptina, PAI-1, TNF - α , IL-6 y adiponectina, entonces se establece que la obesidad es una respuesta al estrés oxidativo con producción de especies reactivas de oxígeno. (40)

2.2.6.1. BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO (41):

Se han desarrollado diversas investigaciones en la búsqueda de biomarcadores confiables; así mismo este debe ser una entidad química que tenga ciertas características como, por ejemplo:

- Ser producto de un excesivo daño oxidativo, que se relacione directamente con la aparición y desarrollo de la afección.
- Debe ser de fácil acceso a un tejido diana, que reproduzca el cambio post oxidativo en el tejido.
- Debe tener una concentración adecuada para que pueda ser detectada por distintos tipos de análisis y sea reproducible.
- Debe ser estable, para un mejor procesamiento y almacenamiento.

La interacción de los radicales libres procedentes de oxígeno o nitrógeno con los lípidos séricos toma la denominación de peroxidación lipídica, en este proceso se generan diversos metabolitos, uno de estos es el malondialdehído (MDA), este metabolito es el único trazable por lo que es muy utilizado para determinar estrés oxidativo. (42)

Así tenemos:

Tabla 8. Biomarcadores de estrés oxidativo y sus métodos de detección

TIPO DE MEDICIÓN		MARCADORES	PRUEBAS Y METODOS	
ERON	DIRECTA	ERO	Electrón spin resonancia (ESR) Espectroscopia	
		ERN	Fluorescencia (2,7 diclorofluorescencia) Ion electrode method.	
	INDIRECTA	Lípidos	MDA (Malondialdehido)	Colorimétrico, fluorométrico, ELISA, HPLC
			TBARS	Colorimétrico, fluorométrico.
			HNE (4 – hidroxinonenal)	GC-MS, HPLC
			(f2 – isoprostanos) 8-ISO-PGF ₂	Colorimétrico, fluorométrico, ELISA
		HEL (hidroperoxidacion lipídica- hexanoil- Lys aducto	ELISA, HPLC.	
		LDL oxidada		
		Proteínas	Carbonilo	
			Tiolproteína	Colorimétrico, ELISA
ADN	3- nitrotirosina	GC-MS, HPLC, ELISA		
	8-Hidroxi- ² deoxiguanosina	HPLC, LC, MC, ELISA		
	Ruptura de ADN	Ensayo cometa, citometría de flujo.		
Antioxidante	Enzimáticas	Superóxido dismutasa, xantina glutatión catalasa, glutatión reductasa, peroxidasa, oxidasa.	Colorimétrico, ELISA	
		Glutatión	Colorimétrico, fluorométrico, HPLC,	
	No enzimáticas	ácido ascórbico, vitamina E, Betacarotenos, licopeno.	Colorimétrico	
		Zn, Se, Mn, Cu, Fe.	Fotometría de llama	
Capacidad antioxidante		Antioxidantes totales	Colorimétrico	
		TEAC		
		FRAP		
		ADMA		

Fuente: modificado de SHAH et al. 2014

2.2.7. GOMITAS MASTICABLES

Son dulces preparados con glucosa, saborizantes, sacarosa, colorantes y gomas de contextura gelatinosa. Se le conoce como confite porque en su formulación contiene agente gelante, que le proporciona la textura elástica, esto hace que la presión ejercida por los dedos no lo deforma ya que recupera su forma rápidamente. (43)

Deben ser cristalinas, estables, es decir la humedad que poseen deben estar equilibradas con el entorno, esto depende del medio en el que se conserven. (44)

2.2.7.1. FUNCIÓN DE LOS INSUMOS

❖ ACIDULANTE:

Este insumo se usa para hidrolizar el azúcar y mantener un PH adecuado para el comportamiento óptimo del gelificante, así mismo afecta la dulzura de los confites volviéndolos más higroscópicos; de esta forma se prolonga su tiempo de vida ayudando con el aroma del producto, entre estos se hallan: el ácido tartárico, málico y cítrico. (43)

❖ GLUCOSA:

Se usa para endulzar, potenciar el sabor, mejorar la consistencia, evitar la deshidratación, también se le conoce como jarabe de glucosa, se obtiene por la descomposición enzimática de almidón de diversos granos (44)

❖ GELATINA SIN SABOR:

Se usa para incrementar la viscosidad y darles la consistencia a las gomitas, actúa como gelante que no se desnaturaliza. Esta proteína tiene

un color amarillento sin carbohidratos, colesterol ni grasas, tiene la característica de hidratarse fácilmente; pero al calentarse forma un sistema coloidal fluido y a medida que va enfriando se solidifica en forma de gel. (43)

❖ **SACAROSA:**

Se usa para endulzar las gomitas y hacerlos más apetecibles.

❖ **SABORIZANTE:**

Se usa para potenciar el sabor o para conferirle sabor al producto elaborado, este insumo puede ser extraído de la naturaleza o sintetizado de forma artificial, (43)

❖ **COLORANTE:**

Se usa para potenciar el color o para conferirle color al producto elaborado y hacerlo más apetecible a la vista. Generalmente se incorpora en la fase final durante el enfriamiento, este insumo puede ser extraído de la naturaleza o sintetizado de forma artificial, (43)

❖ **AGUA:**

Este insumo se usa como vehículos de los demás insumos.

2.2.7.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS GOMITAS (44,45)

Las gomitas elaboradas serán medicamentosas para tal fin no existen parámetros establecidos por lo que se adaptó algunas características generales de gomitas (de confitería) y de otras formas medicamentosas (tabletas) de acuerdo a su forma así tenemos:

- Las gomitas medicamentosas deben ser transparentes y homogéneas.
- El peso de gomita a gomita no debe variar en un número mayor a 2 de 10 unidades.
- Las gomitas no deben sobrepasar los límites microbianos para mesófilos aerobios mayores a 1000 UFC/g, así mismo deben estar libres de patógenos.
- Las gomitas deben desintegrarse en el disolutor con agua como como liquido de inmersión a 30 minutos de exposición a 37°C en una cantidad no inferior a 16 de 18 unidades.
- Se debe alcanzar una temperatura de 103 a 110°C durante la elaboración para obtener la fase perla o hebra.
- Debe tener como máximo 10 a 25% de humedad.
- El azúcar debe alcanzar el 50% de la formulación.
- La consistencia debe ser suave, masticable, esponjosa, no debe pegarse en los dientes.
- El proceso termina cuando al verter una gota de jarabe en un vaso con agua la gota llega sin deformarse.
- El porcentaje de sólidos soluble final de las gomitas varía entre (78-80%). (46)

2.2.7.3. ELABORACIÓN DE GOMITAS (46)

- Se pesan los insumos.
- Se hidrata la grenetina, goma arábica y la pectina 30 minutos antes de empezar.
- Se calienta el agua.
- Se coloca el azúcar, se disuelve completamente.
- Se agrega la glucosa, se hierve por 5 minutos.
- Se agrega la goma arábica hidratada y el ácido cítrico, se hierve por 6 minutos.

- Se adiciona la grenetina y la pectina hidratada, se disuelve y se hierva por 5 minutos.
- Se añade el saborizante y colorante, se hierva por 5 minutos.
- Se coloca la mezcla caliente en moldes de silicona.
- Se lleva a refrigeración por 5 horas.
- Se coloca los moldes a un secador de aire a 50°C por 3 horas.
- Se coloca a temperatura ambiente y se desmolda.
- Se cubre las gomitas en una mezcla de chile y sal.
- Están listas para envasar.

2.2.8. ANATOMÍA Y FISIOLÓGIA DEL HÍGADO

2.2.8.1. DEFINICIÓN

Este órgano compacto de 1400 gramos, se ubica en la zona superior derecha en la zona abdominal, tiene múltiples funciones como: Metabólicas, hemostáticas, inmunológicas, digestivas y de reserva. El flujo de sangre alcanza 1,5 L cada 60 segundos. (15,47)

2.2.8.2. ANATOMÍA MACROSCOPICA

Esta es una glándula que tiene el mayor peso del cuerpo humano, su forma es de cuña, su base esta hacia la derecha mientras que el ápice esta hacia la izquierda.

Su ligamento falciforme es parte del peritoneo parietal ya que es uno de sus repliegues que va desde la cara inferior del diafragma, que ayuda a suspenderlo. (47)

2.2.8.3. ANATOMÍA MICROSCOPICA

❖ HEPATOCITOS

Son células que forman parte de aproximadamente el 80% del hígado, tienen forma laminar, se unen unas con otras a modo de esponja.

Disponen de vida larga ya que son renovadas cada 5 meses y cuando hay daño hepático, tienen gran capacidad de proliferación y regeneración de la parte dañada.

Su función es metabolizar las sustancias que provienen de la digestión del intestino a través de la vena porta; además participan en la detoxificación de moléculas dañinas para el organismo. Así mismo los hepatocitos se encargan de secretar la bilis que será conducida al intestino para ayudar con la digestión. Por otra parte, los hepatocitos actúan en la captación y almacenamiento de glucógeno.

También sintetizan lipoproteínas que participan esencialmente en el transporte de lípidos por la sangre, además transportan fibrinógeno que será usado para la coagulación sanguínea en caso apertura cutánea, también almacenan vitaminas A y B, y heparina.

En el proceso de detoxificación alcohólica los hepatocitos degradan las sustancias tóxicas en sus peroxisomas, para la eliminación de toxinas y fármacos participan enzimas que se hallan en el retículo endoplasmático por ende en casos de medicamentación prolongada el retículo endoplasmático tiende a incrementar su volumen. La eliminación de fármacos por lo general es por conjugación con otras moléculas, por ejemplo, la glucuroniltransferasa. (48)

❖ SINUSOIDES

Llenan un total del 6 al 8% de todo el espacio endotelial, participan durante la creación de la matriz fuera de la célula, produce vasorreguladores (óxido nítrico), colágeno III y IV, interleucinas 1 y 6, fibronectina y prostaglandinas E2. (47)

❖ **CELULAS DE KUPFFER**

Estos macrófagos son del sistema fagocitario mononuclear los cuales están adheridos a la parte endotelial emitiendo sus prolongaciones en dirección al espacio Disse. Tienen como función tragar los glóbulos rojos envejecidos y algunos antígenos; así mismo participan a modo de presentadores de antígeno. (15)

❖ **CELULAS ESTRELLADAS O CELULAS DE ITO**

Son denominadas perisinusoidales cumplen el rol de almacenar lípidos especialmente el retinol.

Así mismo al modular la descomposición de la matriz extracelular producen: proteoglicanos, colágeno y glicoproteínas. Además, estabilizan el flujo de la sangre sinusoidal gracias a que son contráctiles frente a los tromboxanos A₂, sustancia P, prostaglandinas F₂. (47)

2.2.8.4. FUNCIÓN HEPÁTICA

El hígado cumple diversas funciones como el metabolismo de hidratos de carbono, desdoblando glucógeno en glucosa que posteriormente libera al torrente sanguíneo, así mismo captura glucosa y triglicéridos para convertirlos en glucógeno y almacenarlos hasta su requerimiento. Así también sintetizan colesterol para producir sales biliares.

Por otra parte, los hepatocitos se encargan de dividir el grupo amino de los aminoácidos para producir ATP o convertirlo en grasa o hidrato de carbono y el amoniaco resultante se transforma en urea para desecho por la orina que es mucho menos toxica.

Así mismo en caso de tóxicos realiza una conjugación con ácido glucurónico para su fácil eliminación por esos. (47)

2.2.8.5. ENZIMAS HEPÁTICAS

2.2.8.5.1. TRANSAMINASAS

Estas enzimas favorecen la reacción de transferencia del grupo -NH₂ de un aminoácido a un alfa cetoglutarato. (15)

❖ TRANSAMINASA GLUTAMICO PIRUVICA (TGP)

Esta enzima es muy abundante en el hígado a comparación de los riñones, corazón y músculos, utiliza la alanina como sustrato, aparece elevada en enfermedades que dañan el hígado por eso en las enfermedades víricas como la hepatitis el cociente (GTP/GOT) será mayor a 1, pero es menor a 1 en cirrosis que afecta al hígado o tumor hepático. (47)

α -cetoglutarato + alanina \rightleftharpoons glutamato + piruvato

❖ TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALACETICA (TGO)

Está en una enzima de predominancia en el corazón, hígado y músculos, aparece en sangre cuando hay daño en estos órganos. Esta enzima utiliza al ácido aspártico como sustrato. (47)

L-aspartato + 2-oxoglutarato \rightleftharpoons oxaloacetato + L-glutamato

❖ GAMMAGLUTAMILTRANSPEPTIDASA (GGT)

Está presente en distintos órganos como: riñón, corazón, bazo, hígado, cerebro, conducto biliar y vesículas seminales, esta enzima se eleva cuando hay daño en el drenaje de la bilis o daño hepático por drogas.

Su función es metabolizar el glutatión transfiriendo la fracción glutamil a las moléculas receptoras como el H₂O, péptidos y algunos L-aminoácidos, sin tocar a la cisteína que preservara la homeostasis al interior de las

células del estrés oxidativo. (47) la reacción del metabolismo del glutatión por la GGT es la siguiente:



PARACETAMOL

Es un analgésico no esteroideo (AINE). Su absorción oral es muy buena y se metaboliza por glucuruno conjugación eliminándose por orina. En combinación con el citocromo P450 2E1 puede oxidarse dando lugar a un metabolito altamente reactivo responsable de la lipoperoxidación del tejido hepático debido a una sobredosis (10 – 15 g ó 150 mg/kg). (49)

2.2.8.6. MECANISMO DE GENERACION DE RADICALES LIBRES POR PARACETAMOL (50)

El citocromo P450 convierten al paracetamol en metabolitos tóxicos, especialmente en N-acetil -p- benzoquinoneimina (NAPQUI), en forma natural es detoxificado del organismo mediante la participación del glutatión y los grupos sulfidrilos; pero a dosis elevadas de paracetamol se incrementa también la producción de NAPQUI que agota las reservas de glutatión del hígado haciendo que este se unifique con moléculas grandes y de origen a radicales libres que alteraran la homeostasis iniciando la apoptosis celular en el hígado iniciando con una necrosis tisular que termina en disfunción orgánica.

2.2.8.7. INJURIA OXIDATIVA EN TEJIDO HEPÁTICO

El 85 – 90% de este farmaco se metaboliza en el tejido hepatico por medio de la fase II de la conjugación a metabolitos glucuronizados y sulfatados que son excretados por orina. El 10 – 15% de fármaco es metabolizado en la fase I donde después de la oxidación se da origen a su metabolito intermediario toxico y reactivo, N-acetil p-benzoquinoneimina (NAPQI),

esto gracias al citocromo p450, la principal enzima responsable de este proceso es el citocromo CYP2E1. Este metabolito interacciona con los grupos sulfidrilos del glutatión dando lugar a la cisteína no toxica que se elimina vía renal; pero cuando se exceden las dosis de paracetamol, se crea más NAPQI que termina con las reservas de glutatión y reacciona con los hepatocitos; entonces se une covalentemente a los grupos de cisteína provocando una lesión irreversible a nivel celular que posteriormente será una injuria oxidativa.

Además de que la peroxidación lipídica y la disfunción mitocondrial empeoran la injuria celular, en este proceso se liberan cito-quinas como respuesta normal a la inflamación secundaria, así dando origen a las ERO y NOS que se encargan de extender la lesión del hepatocito. (51)

2.2.8.8. ORIGEN DEL ESTRÉS OXIDATIVO POR CONSUMO EXCESIVO DE PARACETAMOL

El desequilibrio entre la producción de radicales y la actividad antioxidante, da inicio al estrés oxidativo.

Las ERO pueden oxidar las proteínas y especialmente a los ácidos grasos, que por consecuencia generan efectos negativos en el metabolismo celular por la generación de peróxidos lipídicos, estas se generan por incrementación en la NADPH oxidasa gracias a su producción de aniones de $-O_2^\circ$ a partir de O_2 .

El radical $-O_2^\circ$ genera H_2O_2 y otras ERO y NOS.

Por tanto, la acumulación excesiva de radicales libres es un factor importante en la continuación de diversas enfermedades que afectan al hígado. Algunos minerales como el selenio y el cobre son cofactores de antioxidantes endógenos que eliminan radicales libres por ende su deficiencia eleva la concentración de radicales libres de oxígeno; cabe resaltar que la acumulación excesiva de cobre en el organismo también provoca estrés oxidativo ya que produce radicales libres de hidroxilo. (49,51)

2.2.9. METODOS PARA EVALUAR ESTRÉS OXIDATIVO EN TEJIDO HEPÁTICO (47)

- **Malonaldehido:**

Sus niveles elevados se deben a la peroxidación lipídica, de transaminasas y glutatión mostrando su relación con la aparición de estrés oxidativo y daño hepática severo por exceso de radicales libres en este tejido.

2.2.10. SILIMARINA COMO PATRON PARA LA METODOLOGÍA

Es un complejo flavonoide, compuesto por 3 flavonoides, silibina, silidianina y silicrisina. Este complejo se aísla de un cardo mariano, que es utilizado desde la antigüedad por sus propiedades hepato protectoras, al ser extraída de una planta, en algunos países no se considera un medicamento sino un suplemento alimentario. (52)

2.2.10.1. ACCIÓN TERAPEÚTICA

Este complejo de flavonoides aumenta en más del 35% el nivel de glutatión (antioxidante endógeno) en el tejido hepático, esencial para capturar radicales libres de la sangre producto de las sustancias toxicas que se consumen con los productos alimentarios, el alcohol, fármacos, etc., que a largo plazo podrían ser agentes de daños severos. El antioxidante endógeno Glutatión paraliza a los radicales libres actuando como un excelente Antioxidante, más aún en presencia de Se, de esta manera se transforma en la potente enzima Glutatión Peroxidasa. (47)

2.2.10.2. INDICACIONES

- Tratamiento para síntomas de los trastornos de origen digestivo asociados a deficiencias hepáticas.
- Terapia hepática, en lesiones toxico-metabólicas que se caracterizan por peroxidación provocada por medicamentos hepato tóxicos y la ingesta crónica de alcohol. (47,52)

2.2.10.3. MECANISMO DE ACCIÓN:

Es un excelente antioxidante que paraliza a los RL los cuales provocan daño a las células hepáticas que se exponen a toxinas. Es 10 veces más poderoso que la vitamina E.

incrementa la síntesis de glutatión (neutralizador de radicales libres) más del 35% y de proteínas en el hígado, estimulando la polimerasa I y la transcripción del ARNr, así se generan más células hepáticas que reemplazaran a las células dañadas; por otra parte, la silimarina inhibe la síntesis de leucotrienos que son mediadores de la inflamación que provocan la psoriasis y otras patologías. (47,52)

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

- **Equipos:**
 - ✓ Balanza analítica de alta precisión 0.0001 gr (marca Accuris instruments).
 - ✓ Congeladora -20°C
 - ✓ Cocina
 - ✓ Rota vapor (modelo IKARV 10 digital).
 - ✓ vortex. (marca isolab)
 - ✓ centrifuga (modelo GT 119-100 T).
 - ✓ Espectrofotómetro UV (marca JENWAY 6850).
 - ✓ Sonicador.
 - ✓ Agitador magnético (marca ISOLAB)
 - ✓ Refractómetro (marca ISOLAB rango 10-90)
 - ✓ Refrigeradora.
 - ✓ Cocina eléctrica.
 - ✓ Potenciómetro (PHS-25CW MICROPROCESSOR)
 - ✓ Cocinillas eléctricas.
 - ✓ Bioterio portátil (mogelgrosch MG-BIOTERIO-2)

- **Material vegetal:**
 - ✓ bayas de saúco (*Sambucus peruviana H.B.K.*).

- **Material de laboratorio:**
 - ✓ Vaso precipitado capacidad 1 L.
 - ✓ Probetas de vidrio de capacidad 500 mL.
 - ✓ Erlenmeyer de capacidad 100 mL
 - ✓ Vaso precipitado PIREX capacidad 500 mL

- ✓ Embudos
- ✓ vasos de precipitado capacidad 50 mL
- ✓ Baguetas
- ✓ Placas Petri.
- ✓ Tubos de ensayo de capacidad 10 mL.
- ✓ Vasos de precipitado capacidad 100 mL.
- ✓ Tubos de ensayo con tapa rosca de 10 mL
- ✓ Tubos de ensayo de 10 mL forrados con cinta aislante.
- ✓ Pipeta de 10 mL.
- ✓ Propípetas.
- ✓ Micropipetas de (1-10, 10-100, 100-1000 μ L, 1500 μ L), (marca ISOLAB).
- ✓ Tips o puntas de micropipeta
- ✓ Papel filtro.
- ✓ Matraz aforado color ámbar de 100 mL.
- ✓ Matraz aforado color ámbar de 25 mL.
- ✓ Rollo de papel aluminio.
- ✓ Algodón
- ✓ Bisturíes
- ✓ Crio viales de 2 mL.

- **Material diverso:**

- ✓ Bolsas de polietileno de 5 kg de capacidad.
- ✓ Molino rustico.
- ✓ Dama juana.
- ✓ Moldes de silicona
- ✓ Cucharilla
- ✓ Jaulas de polietileno.
- ✓ Viruta de madera estéril
- ✓ Concentrado para ratón
- ✓ Catéter oro gástrico

- ✓ Alfileres.
 - ✓ Rasurador.
 - ✓ Hielo
 - ✓ Pinzas metálicas
 - ✓ Cronometro
 - ✓ Envases de metal.
- **Material de estudio:**
 - ✓ Extracto seco (acuoso y etanolico) de sauco (*Sambucus peruviana H.B.K.*).
 - ✓ Gomas masticables con incorporación de extracto seco acuoso y etanolico.
 - ✓ Gomas masticables con incorporación de extracto seco acuoso (formulación con mejores características organolépticas y actividad antioxidante).
- **Reactivos:**
 - ✓ Reactivo de Dragendorff.
 - ✓ Ácido sulfúrico.
 - ✓ Reactivo de Mayer.
 - ✓ Sal de Reineckato de amonio.
 - ✓ Peróxido de hidrogeno.
 - ✓ Tolueno.
 - ✓ Hidróxido de amonio al 2%
 - ✓ Éter de petróleo.
 - ✓ Metanol.
 - ✓ Ácido clorhídrico concentrado.
 - ✓ Reactivo gelatina-sal.
 - ✓ Cloruro férrico al 10%.
 - ✓ Hidróxido de sodio al 5%
 - ✓ Cloruro férrico.

- ✓ Carbonato de sodio al 20%
- ✓ Agua destilada.
- ✓ Etanol 70°.
- ✓ Metanol.
- ✓ Agua acidulada
- ✓ Acetona
- ✓ Buffer KCl 0.025 M (Ph 1.0)
- ✓ Hexano
- ✓ Reactivo de Folin Cicocateu 0.2 N
- ✓ Agua destilada.
- ✓ Etanol al 10%.
- ✓ Ácido fórmico.
- ✓ Buffer KCl 0.025 M (Ph 4.5)
- ✓ Agua destilada.
- ✓ Reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (0.12 mg/mL).
- ✓ Trolox (Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (0.025 mg/ml).
- ✓ Paracetamol (LABORATORIO GENFAR)
- ✓ Silimarina (LABORATORIO GENFAR)
- ✓ Reactivo butil-hidroxi-tolueno BHT (2.2 gr/L)
- ✓ FeCL₃ (2.7 gr/L)
- ✓ HCL-glicocola Ph, 3.5 (75.05 gr/L –Gly+ 58.44 gr/ L-NaCl)
- ✓ ácido 2-tiobarbutirico TBA (5 gr/L –TBA en SDS 3%)
- ✓ N-butanol piridina (15-1)
- ✓ 1,1,3,3 – tetrahidroxiopropano (83.5 μmol/L)
- ✓ suero fisiológico. (0.9%)

- **Insumos**

- ✓ Azúcar blanca.
- ✓ Zumo de sauco.
- ✓ Glucosa líquida.
- ✓ Grenetina.

- ✓ Ácido cítrico.
 - ✓ Goma arábica.
 - ✓ Sorbato de potasio.
 - ✓ Pectina cítrica 105.
 - ✓ Maicena.
 - ✓ Aceite vegetal.
- **Animales de experimentación:**
 - ✓ Ratones albinos de la cepa (*balb/c*).

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO.

El presente estudio se desarrolló en el laboratorio institucional de investigación, farmacología y toxicología, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, en la Facultad de Ciencias de la Salud, específicamente en la Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica.

3.2.2. DISEÑO METODOLÓGICO

Para valorar la actividad antioxidante de extractos secos acuoso y etanólico de bayas de saúco antes y después de la incorporación a gomitas masticables se realizó un estudio in vitro comparativo, de diseño cuasi experimental con múltiples grupos a los cuales se les midió la misma variable independiente (cantidad de extracto seco acuoso y etanólico), actividad que se comparó con el patrón antioxidante (trolox).

Para evaluar el efecto sobre los niveles de MDA de las gomitas con extracto acuoso seco de las bayas de saúco (*Sambucus peruviana H.B.K.*) se realizó un estudio comparativo cuasi experimental con 4 grupos, un grupo que no

recibió tratamiento y 3 grupos que, si recibieron tratamiento, a todos se les realizó la medición sobre la variable dependiente en evaluación, efecto que se comparó con el fármaco patrón.

❖ **Nivel de la investigación:**

cuasiexperimental, se realizó en el laboratorio en dos fases, in vitro e in vivo.

❖ **Tipo de investigación:**

- Según variables manipuladas: Cuasi experimental.
- Según la temporalidad: Prospectivo.
- Según número de mediciones: Transversal.

❖ **Diseño de la investigación:**

TABLA 9. Diseño metodológico de la actividad antioxidante IC 50 de los extractos secos acuoso y etanólico de saúco

MUESTRA	TRATAMIENTO	OBSERVACIÓN
BLANCO	X1	O1
M1.1	X2	O2
M1.2	X2	O3
M1.3	X2	O4
M1.4	X2	O5
M1.5	X2	O6
M2.1	X2	O7
M2.2	X2	O8
M2.3	X2	O9
M2.4	X2	O10
M2.5	X2	O11

Fuente: Elaboración propia

Se realizó el ensayo por triplicado para cada muestra

B: 2250 μ L de Etanol al 70%

M_{1.1}: Extracto etanólico de Saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.). a concentración 50 μ g/mL.

M_{1.2}: Extracto etanólico de Saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.). a concentración 100 μ g/mL.

M_{1.3}: Extracto etanólico de Saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.). a concentración 150 μ g/mL.

M_{1.4}: Extracto etanólico de Saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.). a concentración 200 μ g/mL.

M_{1.5}: Extracto etanólico de Saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.). a concentración 250 μ g/mL.

M_{2.1}: Extracto acuoso de Saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.). a concentración 50 μ g/mL.

M_{2.2}: Extracto acuoso de Saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.). a concentración 50 μ g/mL.

M_{2.3}: Extracto acuoso de Saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.). a concentración 50 μ g/mL.

M_{2.4}: Extracto acuoso de Saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.). a concentración 50 μ g/mL.

M_{2.5}: Extracto acuoso de Saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.). a concentración 50 μ g/mL.

X₁: tratamiento administrado (750 μ L de DPPH)

X₂: tratamiento administrado (750 μ L de DPPH + Etanol para completar a 3 mL).

O_n: Observación de las muestras

O₁₋₁₁: % de inhibición de DPPH.

Tabla 10. Diseño metodológico de formulación de gomitas masticables

GRUPO	TRATAMIENTO	OBSERVACIÓN
G1	—	O1
G2	X1	O2
G3	X2	O3

Fuente: Elaboración propia

La distribución de los se hizo al azar.

G₁: Grupo blanco o control.

G₂: Grupo experimental 1.

G₃: Grupo control experimental 2.

X_n: Tratamiento administrado.

X₁: Incorporación de 6.31% de extracto seco etanólico de las bayas de saúco.

X₂: Incorporación de 6.31% de extracto seco acuoso de las bayas de saúco.

O₁₋₃: Control de calidad de las gomitas.

Tabla 11. Diseño metodológico de experimentación del efecto sobre los niveles de MDA

GRUPO	TRATAMIENTO	OBSERVACIÓN
G1	—	O1
G2	X2	O2
G3	X3	O3
G4	X4	O4

Fuente: Elaboración propia

La distribución de los ratones se hizo tomando en cuenta el peso de cada ratón, formándose 4 grupos experimentales formado por 6 ratones cada uno.

G₁: Grupo blanco o control.

G₂: Grupo control negativo (paracetamol – agente liberador de radicales libres).

G3: Grupo control positivo (patrón silimarina – complejo flavonoide altamente antioxidante).

G4: Grupo experimental (gomitas con incorporación de extracto acuoso de *Sambucus peruviana* H.B.K.).

Xn: Tratamiento administrado.

X1: Administración de fármaco liberador de radicales libres (paracetamol)

X2: Administración de fármaco liberador de radicales libres (paracetamol) más fármaco antioxidante (silimarina)

X3: Administración de fármaco liberador de radicales libres (paracetamol) más gomitas masticables equivalente a dosis de cianidina equivalentes a 2,5 mg/kg.

On: Medición de los animales de experimentación

O1-4: Medición de la concentración de Malondialdehido (MDA) en tejido hepático.

3.3. CONSIDERACIONES ÉTICAS (45.53):

El efecto sobre los niveles de MDA fue evaluado en animales de experimentación siguiendo rigurosamente las normas de bioética que están establecidas en la vigente ley a favor de la protección y bienestar animal N° 30704.

El investigador y el cuidador deben asegurar bienestar a los animales a utilizar durante la experimentación según se establezca en las normas vigentes en cuanto a espacio, luz y alimento, según la especie del animal.

Se cumplió con las 3 R de Rusell y Burch, reemplazar, reducir y refinar; se disminuyó al máximo la cantidad de animales de experimentación y la cantidad de experiencias para conseguir los fines científicos esperados; así mismo se usó eutanasia para no producir dolor a los animales de experimentación según el manual de eutanasia. (53)

3.4. IDENTIFICACIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

A. VARIABLES INDEPENDIENTES:

- a. **Extracto seco acuoso y etanólico al 70% de las bayas de sauco (*Sambucus peruviana H.B.K.*)**

DEFINICION CONCEPTUAL: Son soluciones concentradas de principios activos de drogas crudas, que se obtienen mediante maceración y posterior extracción. (54).

DEFINICION OPERACIONAL:

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa

Escala: Razón.

Instrumento: Balanza analítica de sensibilidad 0.0001 g.

Procedimiento de medición: Los miligramos de extracto seco de *Sambucus peruviana H.B.K.* Se pesaron en la balanza analítica según los cálculos tanto para actividad in vitro como durante la elaboración de gomitas masticables.

Expresión final: mg de extracto seco de *Sambucus peruviana H.B.K.*

- b. **Formulación de gomitas masticables con la incorporación de extracto seco acuoso y etanólico de sauco (*Sambucus peruviana H.B.K.*), a dosis 160 mg de antocianinas por formulación.**

DEFINICION CONCEPTUAL: Son dulces que generalmente se elaboran a partir de glucosa, sacarosa, saborizantes, colorantes y gomas de textura gelatinosa, pero que también se pueden reemplazar por otro tipo de endulzantes menos perjudiciales para la salud como la miel de abeja y stevia; se formulan con incorporación de 160 mg de

antocianinas equivalentes a extracto seco de sauco por cada formulación (43,44).

DEFINICION OPERACIONAL:

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa

Escala: Razón.

Instrumento: Balanza analítica de sensibilidad 0.0001 g.

Procedimiento de medición: Los miligramos de gomitas masticables con incorporación de extracto seco acuoso y etanólico de Saúco (*Sambucus peruviana H.B.K.*). Se pesaron con una balanza analítica según los cálculos tanto para actividad in vitro como para el efecto in vivo.

Expresión final: mg de gomitas masticables.

B. VARIABLES PENDIENTES:

- a. **Actividad antioxidante del extracto seco acuoso y etanólico de saúco (*Sambucus peruviana H.B.K.*) antes y después de la incorporación a gomitas masticables.**

DEFINICION CONCEPTUAL: Los radicales libres son electrones desapareados completamente inestables, por su parte el DPPH, tiene un electrón sin par lo cual lo convierte en color violeta y al unirse con él electrón de otra molécula da una reacción de color amarilla lo que nos ayuda a medir el porcentaje de inhibición de radicales libres (37).

DEFINICION OPERACIONAL:

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa

Escala: Razón.

Instrumento: Espectrofotómetro UV.

Procedimiento de medición: El porcentaje inhibitorio de extractos secos acuoso y etanólico del Saúco (*Sambucus peruviana H.B.K.*), se realizó midiéndose la absorbancia en el espectrofotómetro UV según los cálculos tanto para antes y como para después de la incorporación a gomitas masticables.

Expresión final: Porcentaje de inhibición de DPPH.

- b. **Efecto sobre los niveles de MDA de la Formulación de gomitas masticables con mejores características organolépticas y actividad antioxidante in vitro.**

DEFINICION CONCEPTUAL: El cálculo de productos de reacción con el ácido tiobarbiturico (TBARS), como el malondialdehido sirve para medir la cabida de peroxidación lipídica de las membranas celulares. La medición de este metabolito nos permite identificar indirectamente el nivel de peroxidación de un tejido ya que es un buen indicador de la función de esta vía oxidativa; además tiene la ventaja de colorearse reaccionando con el ácido tiobarbiturico, esto hace posible su cuantificación por espectrofotometría (57)

DEFINICIÓN OPERACIONAL:

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa

Escala: Razón.

Instrumento: Espectrofotómetro UV.

Procedimiento de medición: La cuantificación de malondialdehido (MDA) por espectrofotometría. Midiéndose la absorbancia por espectrofotometría UV según los cálculos.

Expresión final: $\mu\text{mol/L}$ de MDA.

C. VARIABLES INTERVINIENTES:

a. DE LA MUESTRA VEGETAL:

- i. **Estadío de crecimiento:** fase de desarrollo y crecimiento de la especie vegetal, en tanto el aumento irreversible de la masa se le denomina crecimiento que se consigue por procesos como: división y elongación celular. (58)

DEFINICION OPERACIONAL:

Naturaleza: Cualitativa.

Forma de medición: Directa

Escala: Nominal.

Expresión final:

- Germinación.
- Floración.
- Fructificación.
- Maduración.

- ii. **Altitud de recolección:** elevación altitudinal a la que se halla el lugar de recolección con respecto al nivel del mar, se obtiene con un altímetro o GPS. (59)

DEFINICION OPERACIONAL:

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa

Escala: Razón.

Expresión final:

- Chala (0 – 500 m.s.n.m).
- Yunga (500 – 2300 m.s.n.m).
- Quechua (2300 – 3500 m.s.n.m).
- Suni (3500 – 4000 m.s.n.m).
- Puna (4000 – 4800 m.s.n.m).
- Janca (4800 – 6746 m.s.n.m).

- Rupa rupa
- omagua

iii. **temporada de recolección:** espacio y tiempo superior a una semana e inferior a un año, durante el que se realiza la recolección de la especie vegetal.

DEFINICIÓN OPERACIONAL:

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa

Escala: Razón.

Expresión final:

- Temporada seca (abril – octubre).
- Temporada de lluvias (noviembre – marzo)

b. DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN:

RATONES:

i. **Edad:** esta variable extraña de experimentación se define por el tiempo transcurrido desde el nacimiento de los animales de experimentación hasta el momento de su utilización como parte de la experimentación (60).

DEFINICIÓN OPERACIONAL:

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa

Escala: Razón.

Expresión final:

- 3 meses

ii. **Sexo:** carácter distintivo basado en el tipo de gametos producidos por las gónadas (60).

DEFINICIÓN OPERACIONAL:

Naturaleza: Cualitativa.

Forma de medición: Directa

Escala: nominal.

Expresión final:

- Macho.
- Hembra.

- iii. **Peso:** Es la condición del animal de experimentación que se define como masa que presenta al momento de iniciar la experimentación (60).

DEFINICION OPERACIONAL:

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa

Escala: Razón.

Expresión final:

- 25 – 30 gramos.

- iv. **Raza:** Es la distinción entre especies del mismo género que se basa en caracteres genéticos y morfológicos (60).

DEFINICIÓN OPERACIONAL:

Naturaleza: Cualitativa.

Forma de medición: Directa

Escala: nominal.

Expresión final:

- *Mus musculus – balb/c C57.*

Tabla 12. Operacionalización de variables independientes.

	DEFINICIÓN	NATURALEZA	TIPO E INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	ESCALA	TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS	PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN	EXPRESIÓN FINAL	
	Extracto seco acuoso y etanólico al 70% de las bayas de saúco (<i>Sambucus peruviana</i> H.B.K.)	Son soluciones concentradas de principios activos de drogas crudas, que se obtienen mediante maceración y posterior extracción. (54).	Cuantitativa	Directa/ Balanza analítica de sensibilidad 0.0001 g.	Razón	Observación experimental/ ficha de recopilación de datos	Los miligramos de extracto seco de <i>Sambucus peruviana</i> H.B.K. Se pesaron en la balanza analítica según los cálculos tanto para actividad in vitro como para la elaboración de gomitas masticables.	mg de extracto seco de <i>Sambucus peruviana</i> H.B.K.
	Formulación de gomitas masticables con la incorporación de extracto seco acuoso y etanólico de saúco (<i>Sambucus peruviana</i> H.B.K), a dosis 160 mg de antocianinas por formulación.	Son dulces preparados a partir de glucosa, saborizantes, sacarosa, colorantes y gomas de contextura gelatinosa; se formulan con incorporación de 160 mg de antocianinas equivalentes a extracto seco de saúco por cada formulación (43,44).	Cuantitativa	Directa/ Balanza analítica de sensibilidad 0.0001 g.	Razón	Observación experimental/ ficha de recopilación de datos	Los miligramos de gomitas masticables con incorporación de extracto seco acuoso y etanólico de Saúco (<i>Sambucus peruviana</i> H.B.K). Se pesaron en la balanza analítica según los cálculos tanto para actividad in vitro como para el efecto in vivo.	mg de gomitas masticables.

Fuente: elaboración propia

Tabla 13. Operacionalización de variables dependientes.

	DEFINICIÓN	NATURALEZA	TIPO E INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	ESCALA	TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS	PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN	EXPRESIÓN FINAL
							INDICADOR
Actividad antioxidante del extracto seco acuoso y etanólico de saúco (<i>Sambucus peruviana H.B.K.</i>) antes y después de la incorporación a gomitas masticables.	Los radicales libres son electrones desapareados completamente inestables, por su parte el DPPH, tiene un electrón sin par lo cual lo convierte en color violeta y al unirse con él electrón de otra molécula da una reacción de color amarilla lo que nos ayuda a medir el porcentaje de inhibición de radicales libres (37).	Cuantitativa	Directa/ espectrofotómetro UV	Razón	Observación experimental/ ficha de recolección de datos	El porcentaje de inhibición del extracto seco acuoso y etanólico del Sauco (<i>Sambucus peruviana H.B.K.</i>). Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV según los cálculos tanto para antes y como para después de la incorporación a gomitas masticables.	Porcentaje de inhibición de DPPH.
							Presencia de polifenoles totales y antocianinas.
Efecto sobre los niveles de MDA de la Formulación de	La cuantificación de moléculas de reacción con el ácido	cuantitativa	Directa/ espectrofotómetro UV	Razón	Observación experimental/ ficha de	La cuantificación de malondialdehído (MDA) por	μmol/L de MDA

<p>gomitas masticables con mejores características organolépticas y actividad antioxidante in vivo.</p>	<p>tiobarbiturico (TBARS), como el malondialdehido sirve para medir la capacidad de lipoperoxidacion de las membranas de las celulas. La medición de este metabolito nos permite identificar indirectamente el nivel de peroxidacion de un tejido ya que es un buen indicador de la función de esta vía oxidativa; además tiene la ventaja de colorearse reaccionando con el ácido tiobarbiturico, esto hace posible su cuantificación por espectrofotometría (57).</p>				<p>recolección de datos</p>	<p>espectrofotometría. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV según los cálculos.</p>	<p>Presencia de polifenoles totales y antocianinas.</p>
--	---	--	--	--	-----------------------------	---	---

Fuente: elaboración propia

Tabla 14. Operacionalización de variables intervinientes.

		NATURALEZA	MEDICION	ESCALA	EXPRESIÓN FINAL
De la muestra vegetal	ESTADIO DE CRECIMIENTO	Cualitativa	Directa	Nominal	Germinación, floración, fructificación, maduración.
	ALTITUD DE RECOLECCION	cuantitativa	Directa	Razón	Chala (0 – 500 m.s.n.m)., Yunga (500 – 2300 m.s.n.m)., Quechua (2300 – 3500 m.s.n.m)., Suni (3500 – 4000 m.s.n.m). , Puna (4000 – 4800 m.s.n.m)., Janca (4800 – 6746 m.s.n.m)., Rupa rupa , omagua.
	TEMPORADA DE RECOLECCION	cuantitativa	Directa	Razón	Temporada sin lluvias (abril – octubre)., Temporada con lluvias (noviembre – marzo).
De los animales de experimentación.	EDAD	Cuantitativa	Directa.	Razón	3 meses
	SEXO	Cualitativa	Directa	Nominal	Macho – hembra.
	PESO	cuantitativa	Directa	Razón	25 – 30 gramos.
	RAZA	Cualitativa	Directa	Nominal	<i>Mus musculus – balb/c C57</i>

Fuente: elaboración propia

3.5. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.5.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Constituido por 24 ratones albinos de la cepa *Mus musculus – balb/c C57* de aproximadamente 90 días de vida procedentes del Bioterio automatizado de la Universidad Andina del Cusco, los cuales se distribuyeron en 4 grupos, teniendo 6 ratones como blanco, 6 ratones como control positivo, 6 ratones como control negativo y 6 ratones para el grupo experimental al que se le administro paracetamol y gomitas masticables.

3.5.2. MUESTRA VEGETAL

17 kilogramos de bayas de saúco (*Sambucus peruviana H.B.K.*) que se obtuvieron de productos alimentarios Misky S.A.C. de procedencia (Distrito de Limatambo – Provincia de Anta – Departamento del Cusco.) a 2577 msnm

3.5.3. MUESTRA BIOLÓGICA

❖ IDENTIFICACIÓN DE LA UNIDAD DE ESTUDIO

Se utilizaron 24 ratones albinos *Mus musculus –“balb/c” C57* machos de 75 - 93 días de edad.

La obtención de la muestra fue por muestreo aleatorio simple, entre los ratones que cumplían con todos los criterios de inclusión detallados para experimentos.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Ratones de 2.5 - 3 meses de vida.

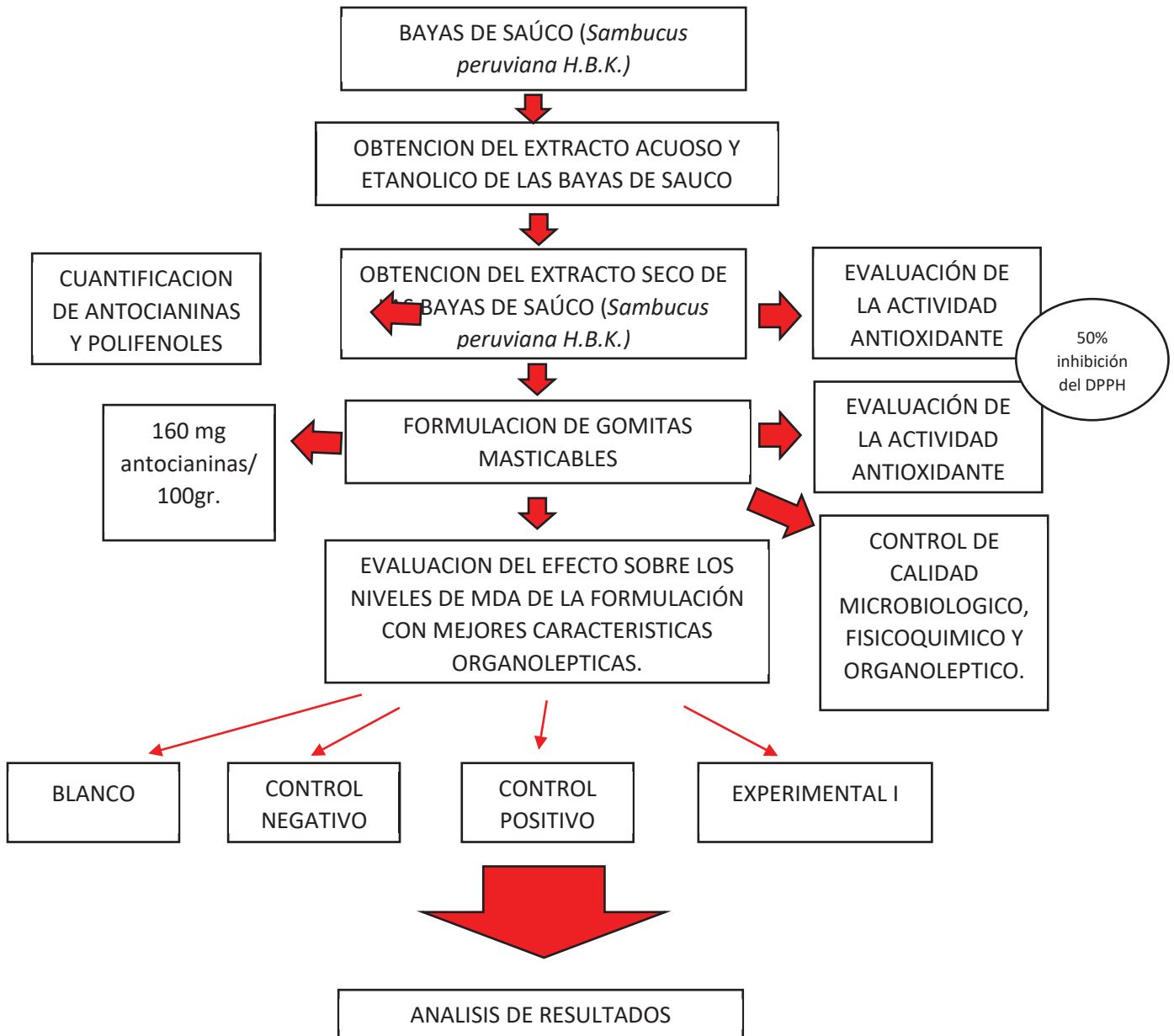
- Ratones albinos de la cepa (*balb/c*).
- Que tengan pesos de 25 a 30 gramos.
- Animales aparentemente sanos.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Ratones menores o mayores de 2.5 - 3 meses de vida.
- Ratones que no pertenezcan a la cepa (*balb/c*).
- Ratones con pesos menores o mayores de 25 a 30 gramos.
- Ratones con signos o síntomas de alguna enfermedad.
- Ratones que hubieran sido utilizados en alguna otra investigación.

3.6. METODOLOGÍA GENERAL

Flujograma 1: Metodología general



Fuente: elaboración propia

3.7. PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

3.7.1. OBTENCION DE LAS BAYAS DE *Sambucus peruviana H.B.K.* (SAÚCO):

Sambucus peruviana H.B.K. (saúco), se obtuvo de productos alimentarios MISKY S.A.C. de procedencia de la provincia de Anta distrito de Limatambo ubicada a 2577 msnm.

3.7.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.

3.7.2.1. EXTRACTO ACUOSO

Se realizó mediante una digestión a temperatura leve 50 - 70°. (14) y posterior crio concentración a -19°C (35), finalmente una evaporación a 50°C.

Se recibieron 15 kilos de Sauco (*Sambucus peruviana H.B.K.*) maduro, lavado, seleccionado y congelado de Productos Alimentarios Misky S.A.C.

- Se colocó las bayas de saúco en una olla sin retirar sus cascara tampoco se adició de agua y se calentó a 50 – 70°C y se mantuvo homogenizando levemente por 20 minutos.
- Se filtró el zumo y se dejó templar a temperatura ambiente.
- Luego se puso el zumo en bolsas de polietileno y se congeló.
- Se retiró las bolsas del congelador y se colocaron sobre un soporte con un agujero en la esquina inferior para que el zumo concentrado discurriera poco a poco hasta quedar en la bolsa solo un trozo de hielo transparente.
- Se volvió a congelar el zumo y se repitió el proceso anterior 3 veces más.

- Una vez que se obtuvo un zumo espeso se puso en placas Petri para concentrar en una estufa a 50°C. hasta la sequedad.

3.7.2.2. EXTRACTO ETANÓLICO

Se realizó mediante una maceración en etanol de 70° a temperatura ambiente protegido de la luz (54).

- Se recepcióno 2 kilos de saúco (*Sambucus peruviana H.B.K.*) maduro de Productos Alimentarios Misky S.A.C., previamente lavado con abundante agua, seleccionado, solo fruta entera sin magulladuras y posteriormente deshidratado a 50 - 60°C por 18 horas.
- Las bayas secas se trituraron en un molino rustico.
- Se macero en etanol de 70° por 15 días.
- Se filtró y se concentró a rota vapor 100 rpm a 40°C por 40 min.
- Luego se colocó el extracto restante en placas Petri y se colocó en estufa a 50°C hasta sequedad.

3.7.3. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANOLICO DE LAS BAYAS DE *Sambucus peruviana H.B.K.* (SAÚCO)

Se fundamenta en la interacción de diferentes fuerzas intermoleculares de compuestos entre sí, los cuales dependiendo de su naturaleza puede dar lugar a una interacción entre un soluto y el solvente (54,61,62)

- Se colocó 2.5 mg de extracto seco acuoso y etanólico en diferentes tubos de ensayo para disolver con solventes de distinta polaridad, como agua, etanol al 70°, metanol, cloroformo, hexano, etc.

3.7.4. ESTUDIO FITOQUÍMICO CUALITATIVO

Se realizaron pruebas de coloración y formación de precipitado al extracto acuoso y etanólico de los frutos de saúco que se fundamenta en los cambios a nivel estructural en los metabolitos presentes que dan lugar a una coloración o desaparición de color, dilución o formación de un precipitado o desprendimiento de algún gas (54).

Se hicieron pruebas para metabolitos secundarios como: flavonoides, alcaloides, taninos, azúcares reductores, antocianinas, etc.

Para antocianinas se utilizó el método de adición de HCl 1N, el cambio de coloración a un rojo más claro evidenció la presencia de antocianinas.

3.7.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO DE SAÚCO (*Sambucus peruviana* H.B.K.) (37) POR EL MÉTODO DPPH.

El radical 2,2-difenil-1-picrihidrazilo (DPPH) tiene un electrón sin pareja, lo cual le confiere un notable color violeta a 517 nm.

Se define como:

$$\%inhibicion = \frac{Ar - Am}{Ar} \times 100$$

Donde:

Am: Absorbancia de la muestra

Ar: Absorbancia de la referencia

3.7.5.1. PROCEDIMIENTO (55)

❖ PREPARACIÓN DEL RADICAL DPPH

- Se pesaron 0.0060 gramos del radical DPPH aforándose en una fiola color ambar a 50 ml con etanol de 70° obteniendo una concentración igual a 0.12 mg/mL (0.003M / 0.3mM) que es

aplicable ya que corresponde a una dilución menor a 10^{-2} M (63), para 517 nm de longitud de onda que está en la región visible que va desde 400-780 nm (63).

- Se trasvaso todo a un vaso de precipitado protegiendo de la luz y se colocó al agitador magnético por 1 hora y 43 minutos a 310 rpm.
- Se filtró con un filtro de jeringa y se guardó la solución protegida de la luz y refrigerada hasta su uso.

❖ PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

- Se disolvió 100 miligramos de trolox en 5 ml de etanol al 70% y se aforo a 10 ml utilizando el mismo solvente.
- Se retiró 250 μ L y se volvió a aforar a 10 ml con el mismo solvente consiguiendo una concentración final de 25 μ g/mL.
- Se realizaron diluciones para la curva de calibración y para calcular el volumen necesario para cada concentración de trolox por tubo de ensayo se utilizó la siguiente formula:

$$25 \mu\text{g/mL} \times V_1 = C \times 3000 \mu\text{L}$$

Donde:

V_1 = Volumen a pipetear de la solución 10 mg/mL

C = concentración requerida.

según la siguiente tabla:

Tabla 15. Curva estándar de trolox para DPPH

N°	CONCENTRACIÓN DE TROLOX (µg/mL)	VOLUMEN DE TROLOX (µL)	ETANOL 70° (µL)	DPPH (µL)	VOLUMEN FINAL (mL)
1*	0	0	2250	750	3
2	1.0	120	2130	750	3
3	2.0	240	2010	750	3
4	3.0	360	1890	750	3
5	4.0	480	1770	750	3
6	5.0	600	1650	750	3

Fuente: elaboración propia de acuerdo a la metodología. *referencia.

- Los reactivos se adicionaron en el orden de la tabla en tubos forrados con cinta aislante para protegerlos de la luz.
- Después de colocado el DPPH se homogenizo cada tubo en el vórtice por 10 segundos.
- Se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiental por 16 minutos para luego realizar las lecturas de sus absorbancias por el espectrofotómetro UV a longitud de onda de 517 nm.
- Se realizó el ensayo por triplicado.

❖ **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS MUESTRAS.**

- Se pesó 100 miligramos de cada extracto seco (acuoso y etanólico) de saúco (*Sambucus peruviana H.B.K.*).
- Se completó la solución con etanol de 70% a 10 mL para obtener 10 mg / mL de concentración, luego se sacó 1 mL de la disolución madre y se completó nuevamente a 10 mL con etanol al 70% para tener una concentración 1mg/mL.
- Se realizó más diluciones del extracto y para calcular el volumen necesario para cada concentración de extracto requerida por tubo de ensayo se utilizó la siguiente formula:

$$1000 \text{ ug / mL} \times V1 = C \times 3000 \text{ uL}$$

Donde:

V1= Volumen a pipetear de la solución 1 mg/mL

C= concentración requerida.

según la siguiente tabla:

Tabla 16. Actividad antioxidante de las muestras

N°	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO (µg/mL)	VOLUMEN DE EXTRACTO 10mg/ml (µL)	ETANOL 70° (µL)	DPPH (µL)	VOLUMEN FINAL (mL)
1*	0	0	2250	750	3
2	50	150	2100	750	3
3	100	300	1950	750	3
4	150	450	1800	750	3
5	200	600	1650	750	3
6	250	750	1500	750	3

Fuente: elaboración propia de acuerdo a la metodología. *referencia.

- Los reactivos se adicionaron en el orden de la tabla en tubos forrados con cinta aislante para proteger de la luz.
- Después de colocado el DPPH se homogenizo cada tubo en el vórtice por 10 segundos.
- Se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiental por 16 minutos para luego realizar las lecturas de sus absorbancias por el espectrofotómetro UV a longitud de onda de 517 nm.
- Se realizó el ensayo por triplicado.
- Se expresa los resultados como porcentaje de inhibición, IC50 de la ecuación: $y = 11.677x - 0.401$. El valor TEAC fue hallado con la ecuación:

$$TEAC = \frac{IC50TROLOX}{IC50MUESTRA}$$

3.7.6. CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES (55)

3.7.6.1. FUNDAMENTO.

El reactivo utilizado denominado Folin-Ciocalteu tiene tungstato sódico y molibdato en su composición, los cuales hacen reacción con los fenoles, formando complejos denominados fosfomolibdico-fosfotúngstico (55). Cuando se transfieren electrones a pH alcalino se reducen los complejos formados convertidos en óxidos, como compuestos cromógenos que poseen un color azul intenso gracias al tungsteno (W_8O_{23}) y al molibdeno (Mo_8O_{23}), este color es directamente proporcional al número de grupos OH de la molécula (55).

3.7.6.2. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- Se preparó 25 mL del reactivo Folin Ciocalteu 0.2 N con agua destilada, midiendo 5 ml de Folin 2 N y aforando a 25 mL.
- Se preparó Na_2CO_3 al 20%, pesando 5 gramos de Na_2CO_3 , se disolvió en el sonicador con 10 mL de agua y se completó a 25 mL con el mismo solvente.

3.7.6.3. PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

- El estándar fue el ácido gálico que se preparó a concentración de 1 mg/mL, se pesó 10 miligramos y se aforo con 10 mL de etanol al 70%.
- Se realizó las disoluciones para la curva extracto y para calcular el volumen necesario para cada concentración de extracto por tubo de ensayo se utilizó la siguiente formula:

$$1000 \mu\text{g/mL} \times V1 = C \times 2000 \mu\text{L}$$

Donde:

V1= Volumen a pipetear de la solución 10 mg/mL

C= concentración requerida.

según la siguiente tabla:

Tabla 17. Curva de calibración de ácido gálico

N°	CONCENTRACIÓN $\mu\text{g/mL}$	VOLUMEN μL	FOLIN C. μL	NA ₂ CO ₃ μL	H ₂ O μL	VOLUMEN TOTAL μL
1	5	10	100	200	700	2000
2	10	20	100	200	1600	2000
3	20	40	100	200	1500	2000
4	40	80	100	200	1300	2000
5	100	200	100	200	900	2000

Fuente: elaboración propia a partir de la metodología

- Los reactivos se adicionaron en el orden de la tabla en tubos forrados con cinta aislante para proteger de la luz.
- Después de colocado el Na₂CO₃ se homogenizo cada tubo en el vórtice por 10 segundos.
- se protegió de la luz a temperatura ambiente por media hora y se realizó la lectura de sus absorbancias por espectrofotometría UV a 765 nm.
- Se realizó el ensayo por triplicado.

3.7.6.4. EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Se elaboró una solución de 0.5 mg/ mL pesando 50 mg de cada extracto disolviéndose en 10 mL con etanol al 70% usando un vórtice.
- Se llevó las muestras a centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos y se utilizó un volumen entero de 50 μL para cada muestra cuyas concentraciones de extracto correspondían a 12.5 $\mu\text{g/mL}$.

según la siguiente tabla:

Tabla 18. Cuantificación de polifenoles en las muestras

N°	CONCENTRACIÓN µg/mL	VOLUMEN µL	H2O µl	FOLIN C. µL	Na₂CO₃ µL	VOLUMEN TOTAL µL
0	BLANCO	0	1700	100	200	2000
1	12.5	50	1650	100	200	2000
2	12.5	50	1650	100	200	2000

Fuente: elaboración propia a partir de la metodología

- Los reactivos se adicionaron en el orden de la tabla en tubos forrados con cinta aislante para proteger de la luz.
- Después de colocado el Na₂CO₃ se homogenizo cada tubo en el vórtice por 10 segundos.
- Se protegió de la luz a temperatura ambiente por media hora y se realizó la lectura de absorbancias por espectrofotometría UV a 765 nm.
- Se realizó el ensayo por triplicado.

3.7.7. CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS (56)

Se procedió a realizar según el método desarrollado por Giusti y Wrolstad para PH diferencial. (56)

El cambio del pH en las antocianinas desarrolla transformaciones estructurales reversibles que se verifica por el espectro a distintas absorbancias. A pH 1,0 predomina la forma del oxonio provisto de color y a pH 4,5. la forma hemiacetal desprovista de color (64)

Según la siguiente formula:

$$C=A \times PM \times FD \times VPm / E \times L$$

Donde:

C: Contenido de antocianinas P/P (mg/1 gr de muestra).

A: absorbancia ($ABS = (ABS\ 520 - ABS\ 700)\ PH1 - (ABS\ 520 - ABS\ 700)\ PH\ 4.5$).

PM: Peso molecular de la cianidina 3 – glucosido (449,6 g/l)

FD: Factor de dilución

Pm: Peso de la muestra en mg

V: volumen final

E: Absortividad molar de la cianidina-3-glucósido (26 900 L cm⁻¹mg⁻¹)

L: Grosor de la cubeta (1cm)

3.7.7.1. PROCEDIMIENTO:

- Se pesaron 100 mg de extracto seco acuoso y etanolico de saúco.
- Se llevo a disolución con 10 ml de etanol al 10%.
- Se añadió 100 µl de ácido fórmico para estabilizar la solución según la metodología usada por el químico Choquenaira J. analista del laboratorio de cromatografía y espectrometría de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del cusco.
- Se preparó los buffers de KCL 0.025 M a PH 1.0 Y PH 4.5.
- Se procedió según la siguiente tabla:

Tabla 19. Cuantificación de antocianinas

MUESTRAS	volumen (100 mg/10 mL)	buffer KCl Ph 1	buffer KCl ph 4.5
EXTRACTO ACUOSO	1 mL	4 mL	4 mL
EXTRACTO ETANOLICO	1 mL	4 mL	4 mL

Fuente: elaboración propia según la metodología.

- Se realizó el ensayo por triplicado.
- Se leyó las absorbancias a 520 nm para el PH 1.0 y 700 para el PH 4.5.

3.7.8. FORMULACION DE GOMITAS MASTICABLES CON LA DOSIS EFECTIVA DE ANTOCIANINAS 160 mg:

Tabla 20. Formulación de gomitas 100 gr.

INSUMO	Gr
Zumo de sauco	20.62
Azúcar	66
Glucosa	8.8
Grenetina	7.91
Pectina	0.88
Ácido cítrico	0.44
Goma arábica	5.28
Extracto acuoso seco	7.5
Aceite vegetal	1.3
Conservante	0.1

Fuente: elaboración propia

Las antocianinas no tienen reportes de toxicidad, estas no se han reportado y no causan interacción con otros metabolitos, hay investigaciones que demuestran que no son tóxicas ni con 20 mg/kg de peso en ratas (65).

Se han reportado diversas investigaciones que usan dosis de 2.5 mg/k como dosis efectiva antioxidante (65,66), así mismo en el mercado se cuenta con suplementos alimenticios a base de antocianinas como el “colladeen” en las dosis diarias de 160 mg equivalente a 2.3 mg/ kg. (67)

Por la referencia presente se usó la dosificación de antocianinas presente en “colladeen” en la elaboración de las gomitas en vista de que se trata de una dosis ya estandarizada y efectiva en un ser humano.

3.7.8.1. PROCEDIMIENTO (46,68)

- Se pesan los insumos.
- Se hidrata la grenetina, goma arábica y la pectina 30 minutos antes de empezar.
- Se calienta el agua.
- Se coloca el azúcar y se disuelve completamente.

- Se agrega la glucosa, se ebulle por 5 minutos.
- Se agrega la goma arábica hidratada y el ácido cítrico, se ebulle por 6 minutos.
- Se adiciona la gretina y pectina hidratada a toda la mezcla, se disuelve y se ebulle por 5 minutos.
- Se concentra hasta 75° brix.
- Se deja enfriar hasta 70°C y se añade el extracto seco disuelto calentado a 50 °C y se mezcla completamente
- Se añade el aceite vegetal y se mezcla.
- Se pasa la mezcla bien homogenizada a moldes de silicona, se lleva a refrigeración por 5 horas.
- Se coloca a temperatura ambiente y se desmolda.
- Se cubre las gomitas en una mezcla de maicena previamente calentada en estufa a 30°C.
- Se limpia el exceso de maicena con una brocha.
- Se envasa en presentaciones de 100 gramos.

3.7.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS GOMITAS MASTICABLES CON LA INCORPORACIÓN DE EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO DE SAÚCO (*Sambucus peruviana* H.B.K).

❖ PREPARACIÓN DEL RADICAL DPPH (55)

- se pesó 0.0060 gramos de DPPH para la concentración de 0.12 mg/mL y en un matraz aforado color ambar se aforo a 50 mL con etanol de 70%.
- Se trasvaso todo a un vaso de precipitado color ambar y se colocó al agitador magnético por 1 hora y 43 minutos a 310 rpm.
- Se filtró con un filtro de jeringa y se guardó la solución protegida de la luz y refrigerada hasta su uso.

❖ **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (69)**

- Se separaron 2 gramos de gomitas de cada formulación que corresponden a 100 miligramos de extracto seco.
- Se disolvió cada una en 10 mL con etanol al 70% en baño maría en tubos con tapa para evitar evaporación así se obtuvo la concentración de 0.01 g/mL.
- Se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y se apartó 1 mL del sobrenadante.
- Se aforó a 10 mL con el mismo solvente anterior hasta obtener la concentración de 1mg/mL de muestra.
- Se guardó refrigerado hasta su uso.
- Se realizó las diluciones para cada extracto y para hallar el volumen correspondiente a la concentración de extracto referente al IC 50 de la evaluación de actividad antioxidante antes de la incorporación a gomitas se utilizó la siguiente formula:
 $1000 \mu\text{g/mL} \times V1 = 198 \mu\text{g/mL} \times 3$ para el extracto etanólico y
 $1000\mu\text{g/mL} \times V1 = 234 \mu\text{g/mL} \times 3$ para el extracto acuoso según la tabla 21.

Tabla n°21: Actividad antioxidante de gomitas masticables

TIPO	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO ($\mu\text{g/mL}$)	VOLUMEN (μL)	ETANOL 70° (μL)	DPPH (μL)	VOLUMEN FINAL (mL)
ETOH	198	594	1656	750	3
ACUOSO	234	702	1548	750	3

Fuente: Elaboración propia

- Los reactivos se adicionaron en el orden de la tabla en tubos forrados con cinta aislante para proteger de la luz.
- Después de colocado el DPPH se homogenizo cada tubo en el vórtice por 10 segundos.

- Se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiental por 16 minutos para luego realizar las lecturas de sus absorbancias por el espectrofotómetro UV a longitud de onda de 517 nm.
- Se realizó el ensayo por triplicado.

3.7.10. CONTROL DE CALIDAD DE LAS GOMITAS

Se elaboró un protocolo de control de calidad siguiendo los parámetros detallados a continuación:

3.7.10.1. CONTROL DE CALIDAD FISICOQUÍMICO

Se realizó un control fisicoquímico teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

- **Cantidad de sólidos solubles (Grados Brix).** Durante la elaboración se verifico los sólidos solubles con ayuda de un refractómetro manual el proceso termino cuando se llegó a 75° brix, para que durante el enfriado y amoldado llegara a 78 - 80° brix. (46)
- **Variación de peso:** Se Pesaron 10 gomitas individualmente. Luego se calculó el peso promedio, según la metodología, los pesos de no más de 2 gomitas pueden diferir del promedio, pero en no más del $\pm 5\%$ del peso promedio. Este método fue adaptado de acuerdo a las características del producto final. (45,70)
- **PH:** se midió con ayuda de un potenciómetro durante la elaboración, el pH debe oscilar entre 3 - 3.5 debido a la característica gelificánte de la pectina ya que esta es estable a este pH, además a este pH se garantiza la conservación de la gomita (71).

3.7.10.2. CONTROL DE CALIDAD ORGANOLÉPTICO

Se realizó un control organoléptico teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

- **Olor:** Agradable, dulce y frutal.
- **Sabor:** Agridulce.
- **Color:** morado oscuro similar al sauco.
- **Textura o consistencia.** Suave y elástico, no pegajoso.

3.7.10.3. CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO

Según la norma sanitaria de la DIGESA, se requiere un control microbiológico para aerobios mesófilos y mohos. (72)

Los límites establecidos para aerobios mesófilos $< 10^3$ UFC/g y para moho $< 3 \times 10^2$ UFC/g.

Se llevó 100 gramos de muestra de gomitas a un laboratorio certificado para hacer la valoración microbiológica.

Se utilizó el siguiente formato para control de calidad de las gomitas masticables (ver anexo 7)

3.7.11. DETERMINACIÓN DEL EFECTO SOBRE LOS NIVELES DE MDA EN MEMBRANAS DE HEPATOCITOS DE LA FORMULACIÓN DE GOMITAS MASTICABLES CON MEJORES CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO IC50 MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHIDO.

3.7.11.1. MODELO EXPERIMENTAL (15, 57, 73)

Fundamento:

La cuantificación de TBARS, como el malondialdehido (MDA) sirve para medir la capacidad de lipoperoxidación de las membranas celulares.

El proceso de hidrólisis del endoperóxido cíclico PGH2 junto al ácido 12-hidroxiheptadecatrienoico produce el MDA que es un derivado del metabolismo del ácido araquidónico.

La medición de este metabolito nos permite identificar indirectamente el nivel de peroxidación de un tejido ya que es un buen indicador de la función de esta vía oxidativa; además tiene la ventaja de colorearse reaccionando con el ácido tiobarbiturico, esto hace posible su cuantificación por espectrofotometría (57).

El proceso reactivo del MDA con el ácido tiobarbiturico es la más popular en las muestras biológicas la reacción es la siguiente:

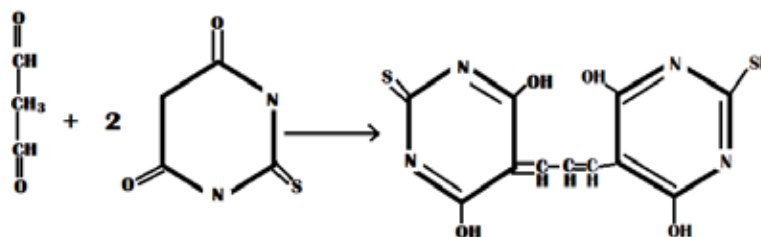


Figura 9. Reacción del MDA y el ácido tiobarbitúrico, Fuente: Assay kit 200 (2015)

3.7.11.2. DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES (15,73,74,75):

Se empleó un lote de 24 ratones adultos jóvenes de 3 meses de edad de la cepa *balb/c* de pesos aproximados 25 a 30 gr, para la reducción de la muestra según lo establecido por lo principios de bioética (reemplazo, reducción, refinamiento) se realizó ensayos estadísticos logrando así la reducción del número de animales de experimentación a 6 unidades por grupo con una fiabilidad del 85% Boada M y Colom A, hablan sobre la reducción de animales de experimentación y recomiendan tratamientos estadísticos; para ello se recomienda trabajar con una potencia mayor al 80%. (75). Se toma los antecedentes de la tesis de Santa Cruz 2019, “Efecto de la administración de la harina de *Myrciaria dubia* (camu

camu) sobre daño hepático inducido por paracetamol en ratones” (73). Donde se utilizan 8 ratones y con el tratamiento estadístico se logra la reducción a 6 animales para una potencia del 85% con un valor de P = 5%. que está dentro del rango aceptable como se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 22. Tamaño muestral necesario en cada grupo

ALPHA LEVEL (VALOR "P")	POTENCIA				
	95%	90%	85%	80%	50%
0.10	7	6		4	2
0.05	9	7	6	5	3
0.02	11	9		7	4
0.01	12	10		8	4

Fuente: datos experimentales obtenidos

Estos animales de experimentación fueron distribuidos en unas jaulas de polietileno a temperatura constante de 21°C, con fotoperiodos de 12 horas de luz y 12 horas sin luz.

Se aclimato a los ratones una semana antes de iniciar la experimentación, los ratones recibieron una dieta normo proteica y normo calórica y agua a libertad, posteriormente se dividieron los grupos según su peso en 4 grupos experimentales, n=6 por grupo como se muestra en la tabla N°10 y continuaron recibiendo dieta normoproteica y agua a libertad así también los respectivos tratamientos, se suministró los tratamientos de forma oral a la misma hora , durante 10 días, los tratamientos estaban formados por paracetamol (300 mg/kg de peso) como inductor de toxicidad en el hígado, silimarina (150 mg/kg) como fármaco hepatoprotector, agua destilada como placebo y la dosis de gomitas (160 mg de antocianinas equivalente a gomita /kg) como grupo experimental, según se detalla en la tabla N°12.

TABLA 23. Distribución de los grupos de tratamiento (68)

GRUPO	NOMBRE DEL GRUPO	DESCRIPCION
1	BLANCO	Constituido por 6 ratones, que no recibieron tratamiento solo agua destilada 0.5 mL durante los 10 días de estudio como placebo.
2	PARACETAMOL (CONTROL NEGATIVO)	Constituido por 6 ratones a los cuales se les administró paracetamol vía oral 300 mg/kg a partir del sexto día hasta el décimo día.
3	SILIMARINA (CONTROL POSITIVO)	Formado por 6 ratones a los cuales se les suministro silimarina 150 mg/kg vía oral por los 10 días y paracetamol vía oral 300mg/kg a partir del sexto día hasta el décimo día.
4	GRUPO EXPERIMENTAL 1	Constituido por 6 ratones a los cuales se les suministro la dosis de gomitas 160 mg de antocianinas/kg por los 10 días y paracetamol vía oral 300mg/kg a partir del sexto día hasta el décimo día.

Fuente: Elaboración propia según protocolo.

Al término del periodo experimental, se les sometio a un ayuno de 12 horas, luego de ello fueron sometidos a eutanasia por aplicación de pentobarbital intraperitoneal (150 mg/ kg) (76), luego se aseguró la muerte mediante métodos físicos verificando temperatura, latido cardiaco y/o exanguinación, inmediatamente después se retiró

el tejido hepático el cual se perfundido por una mezcla isotónica de NaCl, todo el procedimiento se realizó en baño de hielo.

3.7.11.3. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA (15,73,74,75):

- HIGADO: Se colocó a los ratones sobre una superficie plana, se les colocó alfileres en las cuatro patas.
- Se rasuro el abdomen para realizar la incisión.
- Se les extrajo el hígado en un vaso de precipitado provisto de suero fisiológico helado a 5°C.
- Se retiró cuerpos extraños del hígado, grasa, tejidos de otros órganos, etc.
- se trituro para ser homogenizado, todo el proceso se realizó en hielo.
- Se llevo a centrifugar a 6000 rpm por 10 min.
- Se guardó el sobrenadante a -20°C.

3.7.11.4. CUANTIFICACIÓN DE MALONDIALDEHIDO:

❖ PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Patrón TEP: Se separó 20 µL de TEP y aforo a 100 mL de solución buffer PH 3.5, luego se añadió 400 µL de HCL 0.1 N; se extrajo 1 mL y aforo a 10 mL con solución amortiguadora; así se obtuvo la concentración de 83.5 µmol/L.

Preparación de BHT: Para la solución antioxidante, se pesó 0.110 gramos de BHT y se aforo a 50 mL con etanol absoluto.

Cloruro férrico hexa-hidratado (Fe₃Cl. 6H₂O): Se pesó 0.0625 gramos aforandose con 25 mL de agua destilada.

Solución tampón PH 3.5: Se pesó 37.525 gramos de glicina y 29.22 gramos de NaCl y se aforo a 0,5 L con agua destilada previamente se ajusta el PH a 3.5 con 2.2 mL de HCl ©.

Ácido tiobarbiturico TBA: Se pesó 1.05 gramos de SDS (lauril sulfato de sodio) y se aforo a 350 mL de agua destilada (SDS al 0.3%), luego se pesó 1.75 gramos de TBA y se aforo a 350 mL con el SDS previamente disuelto.

N-Butanol piridina: Se usó la relación (15-1); se midió 375 mL de butanol y 25 ml de piridina.

❖ CURVA DE CALIBRACION

Se procedió según la siguiente tabla:

TABLA 24. Curva de calibración 1,1,3,3 – tetraetoxipropano

N°	CONCENTRACION (µmol/L)	VOLUMEN TEP (µL)	BHT (µL)	FECL3 6H2O (µL)	BUFER (µL)	TBA (µL)	5°C	90-100 °C	BAÑO DE HIELO	BUTIL – PIRIDINA (µL)	H2O (µL)	VOLUMEN TOTAL (µL)
1	0	0	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	800	6500
2	0.64	50	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	750	6500
3	1.28	100	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	700	6500
4	2.56	200	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	600	6500
5	5.13	400	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	400	6500
6	10.27	800	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	0	6500

Fuente: Elaboración propia según la metodología

- Los reactivos se añadieron en orden de acuerdo a la tabla N°13.
- Se leyeron las absorbancias a 532 nm.
- Se realizó todo por triplicado.

❖ EVALUACION DE LAS MUESTRAS

Para la determinación de MDA se procedió según la siguiente tabla:

TABLA 25. Determinación de MDA en muestras

N°	VOLUMEN DE SUERO (µL)	BHT (µL)	FECL3 6H2O (µL)	BUFER (µL)	TBA (µL)	5°C	90-100 °C	BAÑO DE HIELO	BUTIL – PIRIDINA (µL)	H2O (µL)	VOLUMEN TOTAL (µL)
1	100	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	700	6500
2	100	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	700	6500
n	100	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	700	6500

Fuente: Elaboración propia según la metodología.

- Se retiró 100 μL del sobrenadante con una micro pipeta de capacidad 100 μl .
- El sobrenadante se colocó en tubos de ensayo con tapa rosca.
- Se adiciono el reactivo antioxidante butil-hidroxi-tolueno BHT 100 μL .
- Se adiciono el reactivo catalizador FeCl_3 100 μL .
- Se adiciono la disolución tampón de HCL-glicola (Ph, 3.5) 1500 μL .
- Se adiciono el ácido 2-tiobarbutirico TBA 1500 μL .
- Se homogenizo el tubo en un vórtice por 30 segundos.
- Se mantuvo la mezcla por 60 minutos a 5°C .
- Se llevo a ebulir en baño de agua a $95 - 100^\circ\text{C}$, durante 60 minutos.
- Se taparon los tubos para evitar perdida de líquido.
- En un baño de hielo se enfriaron los tubos por 5 minutos.
- Se agregó butanol 2500 μL .
- Se agregó 700 μL agua destilada.
- Se Agito por 1 minuto y se llevó a centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos.
- Se extrajo los sobrenadantes 2,5 a 3 ml.
- Se leyeron las absorbancias en el espectrofotómetro a 532 nm.

3.8. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Son herramientas que sirven como fuente de recolección de información estos pueden ser entrevistas, encuestas, cuestionarios, observación, etc.

Se usó la técnica de observación experimental que se basa en el registro visual de los sucesos que ocurren durante la experimentación en tiempo real, del mismo modo se clasificó y consignó la información según el esquema previsto para cada etapa utilizando instrumentos de recolección de datos para la actividad antioxidante invitro, cuantificación de polifenoles totales y antocianinas y determinación del efecto sobre los niveles de MDA como se muestra en los anexos 2,3,5,9 y 12, gracias a ello se obtuvieron datos cuantitativos como cualitativos.

Para la evaluación del efecto antioxidante se realizó la medición de la concentración de MDA en tejido hepático, lo cual fue determinado por espectrofotometría mediante una curva de calibración. De TEP (0.84 $\mu\text{mol/L}$) usando diversas fichas de recopilación de información.

3.9. TÉCNICAS DE ANALISIS DE DATOS ESTADISTICOS

Los resultados finales los cuales fueron obtenidos en las fichas de recopilación de información se analizaron con el programa SPSS versión 21, siendo los resultados expresados como desviación estándar, media, nivel de significancia.

Se procesaron por ANOVA para verificar varianza, luego se usó la prueba de TUKEY para comprobar si existe similitud o diferencia entre los grupos de experimentación utilizando un nivel de confiabilidad del 95% y un nivel de significancia $p < 0.05$.; así mismo con la prueba de Wilcoxon para validar la hipótesis.

CAPITULO IV

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.5. DE LAS PRUEBAS PRELIMINARES

TABLA 26. Prueba de solubilidad de los extractos secos acuoso y etanólico de las bayas de sauco (*Sambucus peruviana H.B.K.*).

SOLVENTE	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ETANOLICO
AGUA	(+++)	(+++)
AGUA ACIDULADA	(+++)	(+++)
METANOL	(++)	(++)
ACETONA	(-)	(-)
CLOROFORMO	(-)	(-)
HEXANO	(-)	(-)

LEYENDA

(+++)	MUY SOLUBLE
(++)	SOLUBLE
(+)	POCO SOLUBLE
(-)	NO SOLUBLE

Fuente: Datos experimentales obtenidos con el anexo N°1

INTERPRETACIÓN

En la tabla N° 15, se muestra la prueba de solubilidad del extracto seco tanto acuoso como etanólico enfrentado a solventes de distintas polaridades; se observa que ambos extractos son muy solubles frente al agua lo cual se representa por tres cruces, seguido del agua acidulada el cual muestra la misma afinidad, disminuyendo frente a metanol representado por dos cruces que indican solubilidad. Así mismo se muestra la falta de afinidad en ambos extractos frente a acetona, cloroformo y hexano que se representan con una

raya mostrando que ninguno de los dos extractos es soluble en dichos solventes.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El proceso de solubilidad se fundamenta en la interacción de diferentes fuerzas intermoleculares de compuestos entre sí, los cuales dan lugar a una interacción entre soluto y solvente según su naturaleza. (54)

Los extractos acuoso y etanólico son altamente solubles en solventes polares como agua, agua acidulada y levemente en metanol por tanto según Mesa García en su libro titulado Química menciona lo siguiente: "...los disolventes moleculares polares tienden a disolver solutos polares, pero, generalmente, no disuelven sustancias apolares. Los disolventes apolares disuelven sustancias apolares y, en cambio, no suelen disolver sustancias polares." Por ende, se puede afirmar que los extractos tanto acuoso como etanólico son de naturaleza polar al ser altamente solubles en solventes polares como el agua.

Del mismo modo según menciona Martínez J (62), Las fuerzas dipolo-dipolo: fuerzas de keeson, se forman solo entre moléculas de característica polar. Los dipolos suelen atraerse entre ellos mismos. cuanto mayor sea la polaridad de las moléculas estas fuerzas serán más intensas así mismo con un mayor tamaño de los átomos los dipolos serán más intensos cuando haya número mayoritario de electrones involucrados.

Según esta cita se puede afirmar que las fuerzas que unen al solvente con el soluto (extracto acuoso /etanólico) son fuerzas de Van Der Waals unión dipolo – dipolo esto por su naturaleza polar.

TABLA 27 marcha fitoquímica del extracto seco acuoso y etanólico de las bayas de saúco (*Sambucus peruviana H.B.K.*).

ENSAYO	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ETANOLICO
FENOLES	(+)	(+)
TANINOS	(-)	(-)
SAPONINAS	(+)	(+)
ANTOCIANOS	(+++)	(+++)
FLAVONOIDES	(+)	(+)

LEYENDA	
(+++)	ABUNDANTE
(++)	PRESENCIA
(+)	PRESENCIA LEVE
(-)	NO HAY PRESENCIA

Fuente: Datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la tabla N° 16 se muestra la marcha fitoquímica de ambos extractos tanto acuoso como etanólico, indicando que ambos extractos poseen abundante cantidad de antocianinas que está representado por tres cruces, seguido de fenoles, saponinas y flavonoides que en ambos casos tienen una presencia leve representado por una cruz, así mismo se muestra que en ambos casos no hay presencia de metabolitos como taninos lo cual se representa con una raya.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

La marcha fitoquímica se basa en los cambios que ocurren a nivel estructural en los metabolitos que dan lugar a fenómenos como coloración, de separación de color, dilución, formación de un precipitado o desprendimiento de algún gas. (54)

En la tabla anterior se observa la marcha fitoquímica que concuerda con Verde García P., para los metabolitos secundarios flavonoides, saponinas,

taninos y antocianinas. A diferencia de nuestra investigación Verde García P., también reporta presencia de alcaloides, esteroides y mucílago. (16)

Las antocianinas y flavonoides cumplen un papel fundamente en la actividad antioxidante (66) por ende se sostiene que la actividad antioxidante del extracto seco de saúco (*Sambucus peruviana HBK*) se debe a la cantidad elevada de estos metabolitos.

Por otra parte, león Silva J. reporta presencia mayoritaria de flavonoides en las hojas de *Sambucus peruviana HBK* (17); por tanto, se demuestra q la planta en investigación posee flavonoides tanto en hojas como en frutos.

4.6. DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE LOS EXTRACTOS SECOS ACUOSO Y ETANÓLICO DE LAS BAYAS DE SAÚCO (*Sambucus peruviana H.B.K*).

4.6.1. DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN:

TABLA 28. Curva de calibración del trolox concentración v/s absorbancias.

N°	CONCENTRACION µg/mL	ABSORBANCIAS			
		E1	E2	E3	PROM
1	0	0.8827	0.8826	0.8827	0.8826
2	1	0.7895	0.7895	0.7813	0.7867
3	2	0.6763	0.6809	0.6748	0.6773
4	3	0.5722	0.5757	0.5708	0.5729
5	4	0.4772	0.4717	0.4769	0.4752
6	5	0.3762	0.3766	0.3644	0.3724

Fuente: datos experimentales obtenidos con el anexo N°2

INTERPRETACIÓN

En la tabla N° 17 se muestra la relación concentración v/s absorbancias del patrón TROLOX, el cual se usó 5 distintas concentraciones que varían desde 0 µg/mL hasta 5 µg/mL, del mismo modo se observa que las absorbancias van disminuyendo mientras las concentraciones se elevan indicando que son inversamente proporcionales, así como se puede observar en la figura 10.

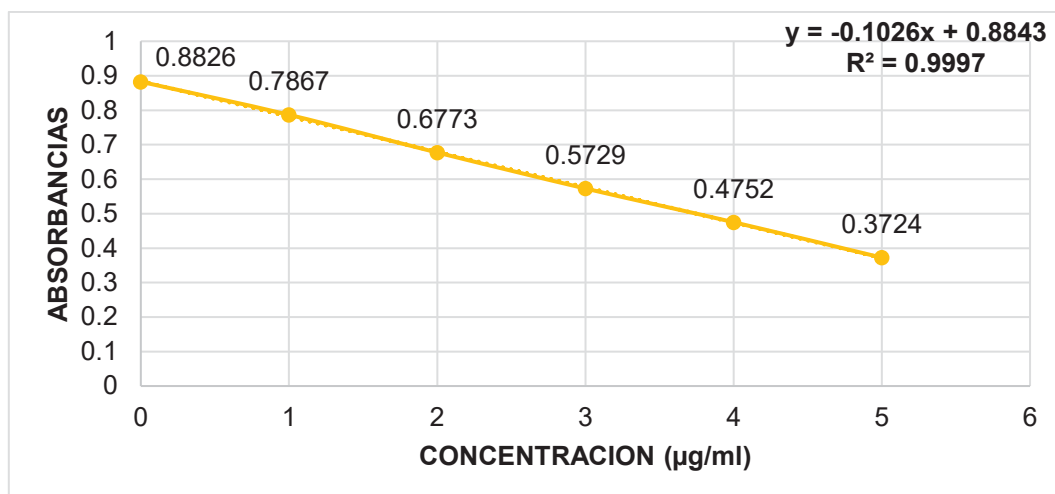


Figura 10. Curva de calibración del trolox concentración vs absorbancias.

Fuente: Datos experimentales obtenidos

INTERPRETACION

En la figura N° 10 se observa la curva de calibración del TROLOX, se observa una línea recta descendente que va desde 0.8826 hasta 0.3724, con un r de ecuación R: 0.9997, un valor cercano a 1.

Tabla 29. Curva de calibración del trolox concentración vs porcentaje de inhibición.

N°	CONCENTRACION µg/mL	% INHIBICION
1	1	10.86
2	2	23.26
3	3	35.08
4	4	46.15
5	5	57.8

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la tabla N° 18 se observa la relación entre la concentración del patrón TROLOX en (µg/mL) frente a la actividad antioxidante de las mismas, mostrando un porcentaje de inhibición bajo de 10.86% a concentración 1 µg/ml de; mientras la concentración incremente el porcentaje de inhibición también lo hace llegando hasta 57.8% de inhibición a concentración 5 µg/mL

de TROLOX, indicando que ambos parámetros son directamente proporcionales como se muestra en la figura 11.

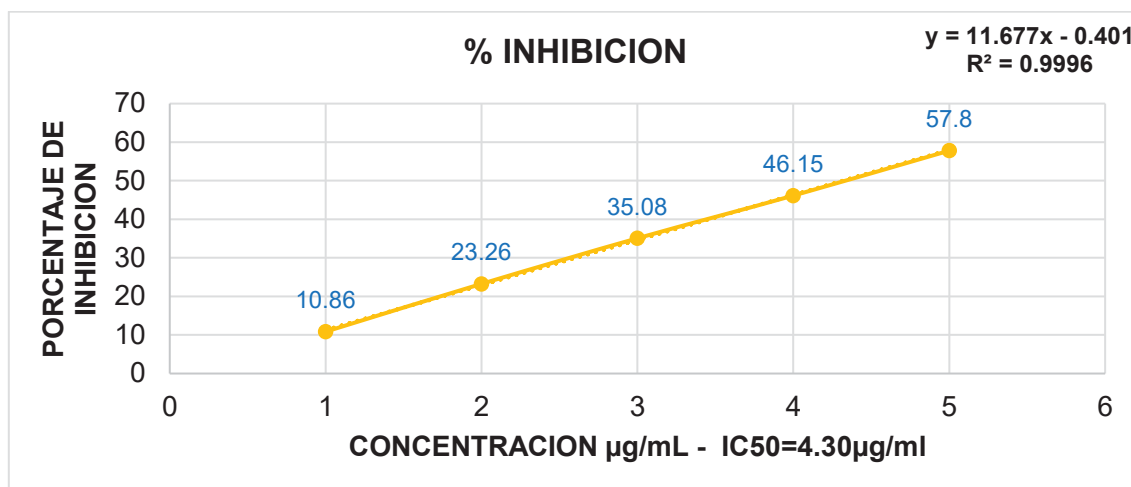


Figura 11. Curva de calibración del trolox concentración vs porcentaje de inhibición. Fuente: Datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la figura N° 11 se muestra la curva de calibración de concentración v/s porcentaje de inhibición del TROLOX, observándose una línea recta ascendente que va desde el 10.86% hasta el 57.8%; así mismo se observa una ecuación con un r de ecuación $R=0.9996$ que es cercano a 1. Así mismo se muestra un $IC_{50}= 4.30$, que se refiere a la cantidad de sustancia antioxidante en 1 mL de reacción capaz de reaccionar con el 50% de DPPH, denominada concentración inhibitoria 50 (55).

ANALISIS Y DISCUSIÓN

El IC_{50} del TROLOX en nuestra investigación muestra un valor de 4.30 $\mu\text{g/mL}$, un valor aproximado al presentado por Aguado María I., quien reporta un IC_{50} de 1.90 $\mu\text{g/mL}$, en su trabajo de investigación (55). Se obtuvo un valor cercano, pero no idéntico en vista de que el procedimiento experimental no se llevó a cabo bajo las mismas circunstancias ni factores que intervienen en las reacciones químicas como tiempo, temperatura, naturaleza de los reactivos y humedad. (77)

4.6.2. DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE LAS MUESTRAS

4.6.2.1. EXTRACTO ACUOSO

Tabla 30. Relación concentración vs absorbancias del extracto acuoso

N°	CONCENTRACION µg/mL	ABSORBANCIA			
		A1	A2	A3	PROMEDIO
	0	0.8827	0.8826	0.8827	0.8827
1	50	0.773	0.7586	0.7486	0.76
2	100	0.6626	0.6655	0.6609	0.663
3	150	0.567	0.5823	0.579	0.5761
4	200	0.5106	0.5071	0.5005	0.506
5	250	0.4297	0.4267	0.4233	0.4265

Fuente: datos experimentales obtenidos con el anexo N°2

INTERPRETACION

En la tabla N° 19 se muestra la relación concentración del extracto seco acuoso v/s absorbancia; así mismo se observa que estas son inversamente proporcionales, mientras la concentración aumenta la absorbancia disminuye; se toman 5 concentraciones del extracto (0, 50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL), las absorbancias disminuyen de la siguiente forma: 0.8827 a concentración 0 µg/mL, 0.76 a concentración 50 µg/mL, 0.663 a 100 µg/mL, 0.5761 a 150 µg/mL, 0.506 a 200 µg/ml, 0.4265 a 250 µg/mL. De esta forma se representa una relación inversamente proporcional.

Tabla 31. Relación concentración vs porcentaje de inhibición del extracto acuoso

CONCENTRACION µg/mL	% INHIBICION
0	0
50	13.9
100	24.88
150	34.73
200	42.67
250	51.68

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACION

En la tabla N° 20 se muestra la relación existente de concentración y el porcentaje de inhibición, se observa que ambos parámetros son directamente proporcionales en vista de que mientras la concentración se incrementa el porcentaje de inhibición también se incrementa, en cuanto a concentración esta va desde 0 hasta 250 µg/mL y el porcentaje de inhibición va desde 0 hasta 51.68% respectivamente como se observa en la figura 12.

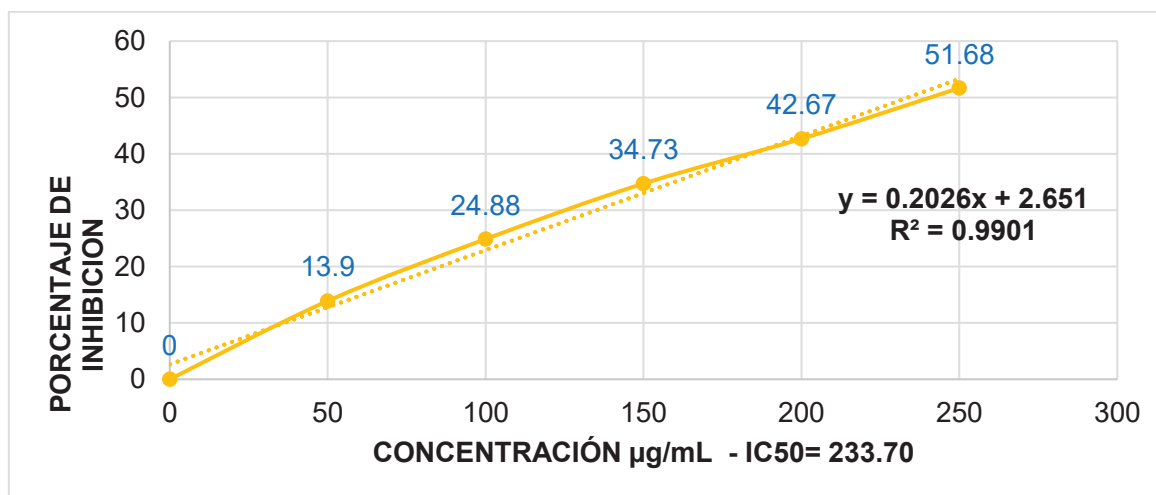


Figura 12. Relación concentración vs porcentaje de inhibición del extracto acuoso

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN: En la figura N°12 se muestra la relación de concentración v/s porcentaje de inhibición; así mismo vemos la formación de una línea ascendente que va desde 0 hasta 51.68% con un valor de IC50 = 233.70 µg/mL.

4.6.2.2. EXTRACTO ETANÓLICO

Tabla 32. Relación concentración vs absorbancias del extracto etanólico

N°	CONCENTRACIÓN ug/mL	ABSORBANCIA			
		A1	A2	A3	PROMEDIO
	0	0.8827	0.8826	0.8827	0.8827
1	50	0.7503	0.7242	0.7227	0.7324
2	100	0.606	0.6614	0.6195	0.6289
3	150	0.5445	0.5205	0.5075	0.5241
4	200	0.4174	0.4613	0.4235	0.434
5	250	0.3493	0.352	0.3637	0.355

Fuente: datos experimentales obtenidos con el anexo N°2

INTERPRETACION:

En la tabla N° 32 se observa la relación entre la concentración del extracto etanólico y las absorbancias, se observa que existe una relación inversamente proporcional en vista de que mientras las concentraciones aumentan las absorbancias disminuyen; siendo las concentraciones (0, 50, 100, 150, 200, 250 µg/mL), en tanto las absorbancias van disminuyendo de la siguiente forma: a 0 µg/mL una absorbancia de 0.8827, a 50 µg/mL una absorbancia de 0.7324, a la concentración de 100 µg/ml la absorbancia de 0.6289, a una concentración de 150 una absorbancia de 0.5242, a concentración de 200 µg/mL la absorbancia de 0.434 y por ultimo a concentración de 250 µg/mL la absorbancia de 0.355.

Tabla 33. Relación concentración vs porcentaje de inhibición del extracto etanólico

CONCENTRACIÓN $\mu\text{g/mL}$	% INHIBICIÓN
0	0
50	17.02
100	28.75
150	40.62
200	50.83
250	59.78

Fuente: datos experimentales

INTERPRETACIÓN

En la tabla N° 33 se muestra la relación entre la concentración del extracto etanólico y el porcentaje de inhibición, mostrando una relación directamente proporcional en vista de que si la concentración incrementa el porcentaje de inhibición también se incrementa.

Mostrando una concentración mínima 0 $\mu\text{g/ml}$ y la máxima 250 $\mu\text{g/mL}$, siendo las concentraciones (0, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/ml}$), en tanto los porcentajes de inhibición van desde 0% a 59.78 % siendo estos, 0% a 0 $\mu\text{g/mL}$, 17.02% a 50 $\mu\text{g/mL}$, 28.75% a 100 $\mu\text{g/mL}$, 40.62% a 150 $\mu\text{g/mL}$, 50.82% a 200 $\mu\text{g/mL}$, 59.78% a 250 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente así como se muestra en la figura 13.

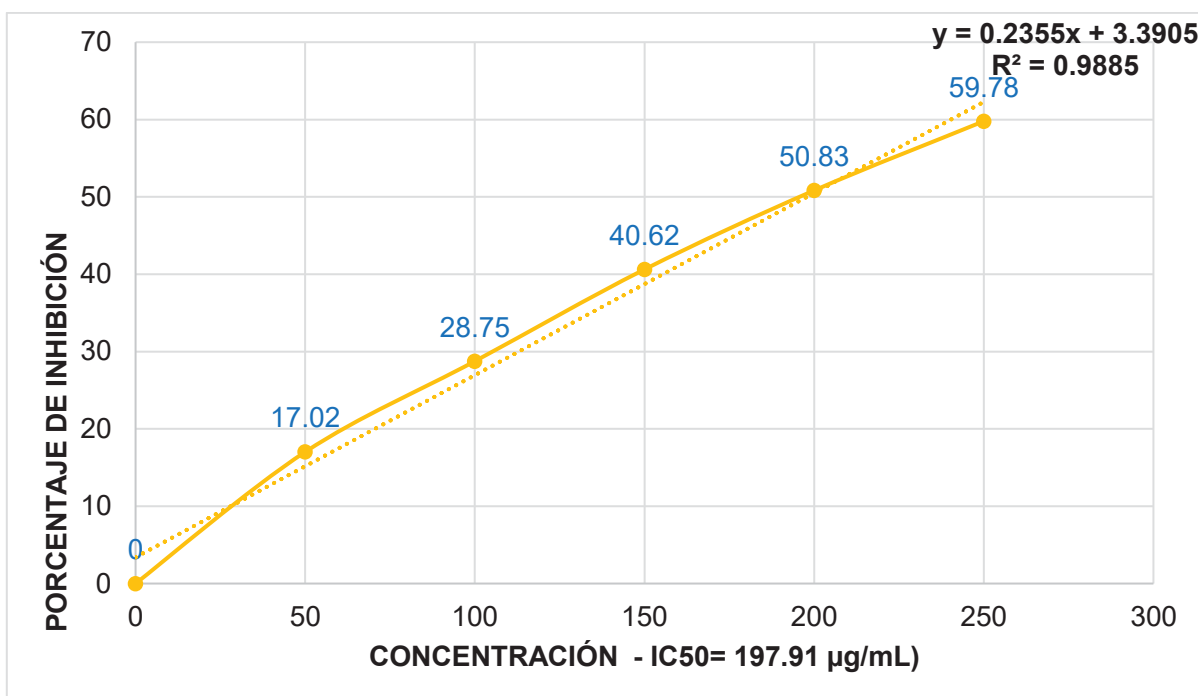


Figura 13. Relación concentración vs porcentaje de inhibición del extracto etanólico

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la figura N° 13 se muestra una línea ascendente representando la relación entre la concentración del extracto etanólico y el porcentaje de inhibición, estos datos van desde 0% hasta 59.78%, de la misma manera se muestra un IC50= 197.91 µg/mL con un r de ecuación R=0.9885.

Los porcentajes de inhibición varían de la siguiente manera, 0% a 0 µg/mL, 17.02% a 50 µg/mL, 28.75% a 100 µg/mL, 40.62% a 150 µg/mL, 50.82% a 200 µg/mL, 59.78% a 250 µg/mL respectivamente.

Tabla 34. Comparación de porcentajes de inhibición entre extracto acuoso y etanólico

N°	CONCENTRACIÓN ug/mL	% EXT. ACUOSO	% EXT. ETANÓLICO
	0	0	0
1	50	13.9	17.02
2	100	24.88	28.75
3	150	34.73	40.62
4	200	42.67	50.83
5	250	51.68	59.78

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la tabla N° 34 observamos la relación entre la concentración de los extractos acuoso y etanólico y los porcentajes de inhibición para ambos casos.

Se observa que para una concentración 0 $\mu\text{g/mL}$ en ambos casos hay 0% de inhibición, para la concentración perteneciente a 50 $\mu\text{g/mL}$ se presenta un porcentaje de inhibición de 13.9% para el extracto acuoso y 17.02% para el extracto etanólico; para la concentración perteneciente a 100 $\mu\text{g/L}$ se muestra un porcentaje de inhibición de 24.88% para el extracto acuoso mientras que 28.75% para el extracto etanólico; para la concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$ se muestra un porcentaje de inhibición de 34.73% para el extracto acuoso y 40.62% para el extracto etanólico; para la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ se presenta un porcentaje de inhibición de 42.67% para el extracto acuoso y 50.83% para el extracto etanólico y finalmente para la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ se muestra un porcentaje de inhibición de 51.68% para el extracto acuoso y 59.78% para el extracto etanólico, como se presenta en la figura 14.

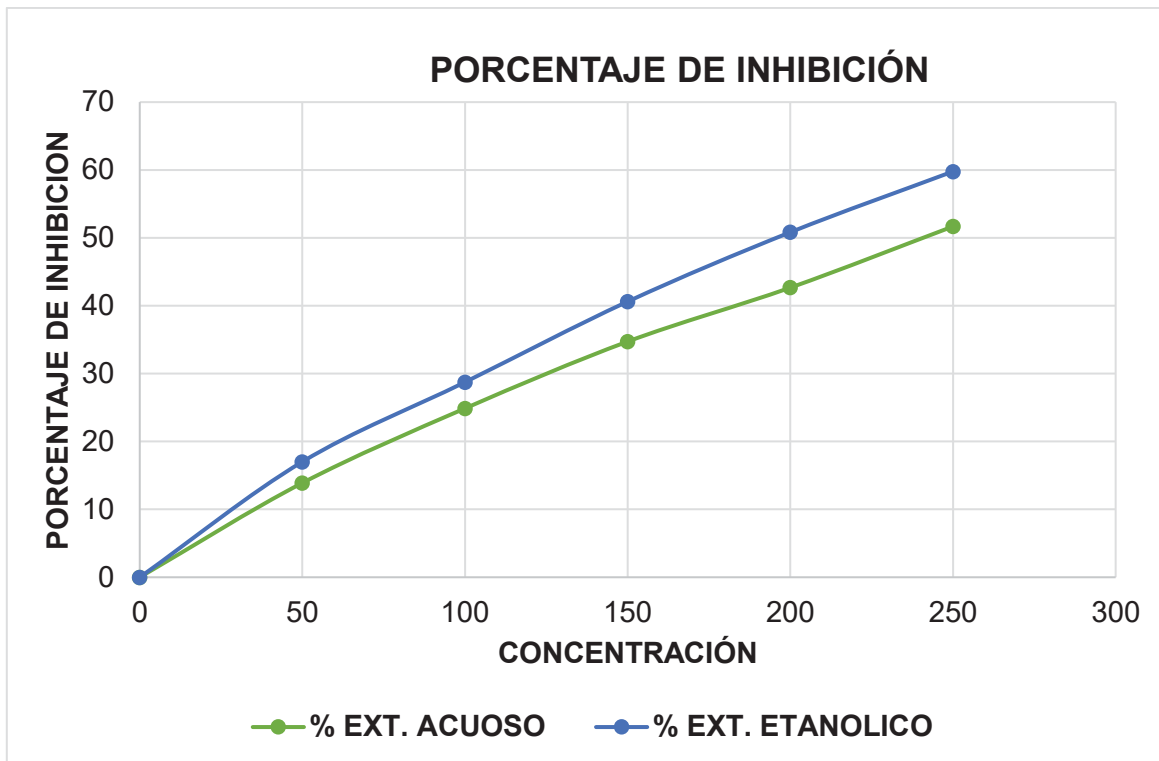


Figura 14. Comparación de porcentajes de inhibición entre extracto acuoso y etanólico Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la figura N° 14 se observa la comparación entre los porcentajes de inhibición del extracto etanólico y acuoso a concentraciones similares; mostrando que el extracto etanólico representado de color azul tiene resultados relativamente elevados a diferencia que el extracto acuoso representado por el color verde en vista de que su línea se encuentra por encima.

A pesar que la diferencia no sea tan elevada es evidente para todas las concentraciones concordando solo a concentración 0 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 35. IC 50 y trolox equivalente de los extractos secos

SUSTANCIA	IC50 µg/mL	TEAC µg trolox/ µg de ext.	TEAC mg/g
EXT. ACUOSO	230.70	0.0186	18.6
EXT. ETANÓLICO	197.91	0.0217	21.7
TROLOX	4.31		

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACION

En la tabla 35 se muestra los IC50 en ambos extractos acuoso y etanólico así como el del patrón trolox que se interpreta como la concentración de extracto a la que se llega a un 50% de inhibición de DPPH, mostrando un IC50 de 230.70 µg/mL para el extracto acuoso, 197.91 µg/mL para el extracto etanólico y 4.31 µg/mL para el patrón TROLOX; así mismo en la tabla podemos observar el TEAC que se interpreta como el TROLOX equivalente por cada extracto siendo el TEAC mayor para el extracto etanólico con un 21.7 mg/g de extracto y 18.6 mg/g para el extracto acuoso respectivamente como se muestra en la figura 15.

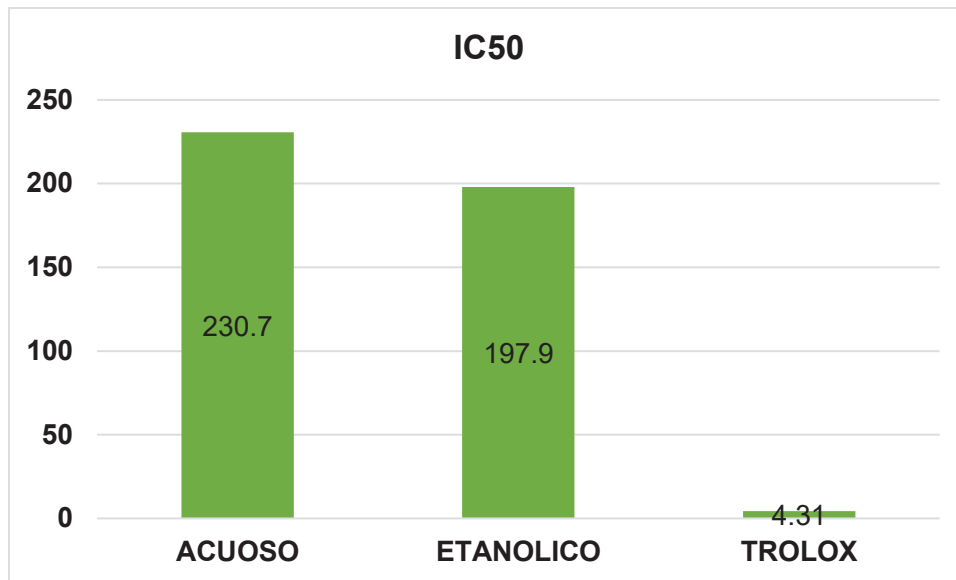


Gráfico 15. Comparación ic 50 entre el extracto acuoso, etanólico y trolox.

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En el grafico 15 se muestra una comparación entre los IC50 de los extractos etanólico, acuoso y del patrón TROLOX; se observa el mayor IC50 para el extracto acuoso con 230.7 µg/mL seguido del extracto etanólico con un IC50 de 197.9 µg/mL y el menor IC50 para el patrón TROLOX con 4.31 µg/mL, siendo el IC50 del extracto etanólico el más cercano al patrón y el IC50 del extracto acuoso el más lejano del patrón.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Según Villar del fresno el etanol extrae muchos más metabolitos secundarios que el agua. En el grafico podemos observar que el patrón posee el menor IC50 seguido del etanol, entonces se afirma que el extracto seco con menor IC50 posee mejor actividad antioxidante, siendo este el extracto etanólico como se muestra en el gráfico 16.

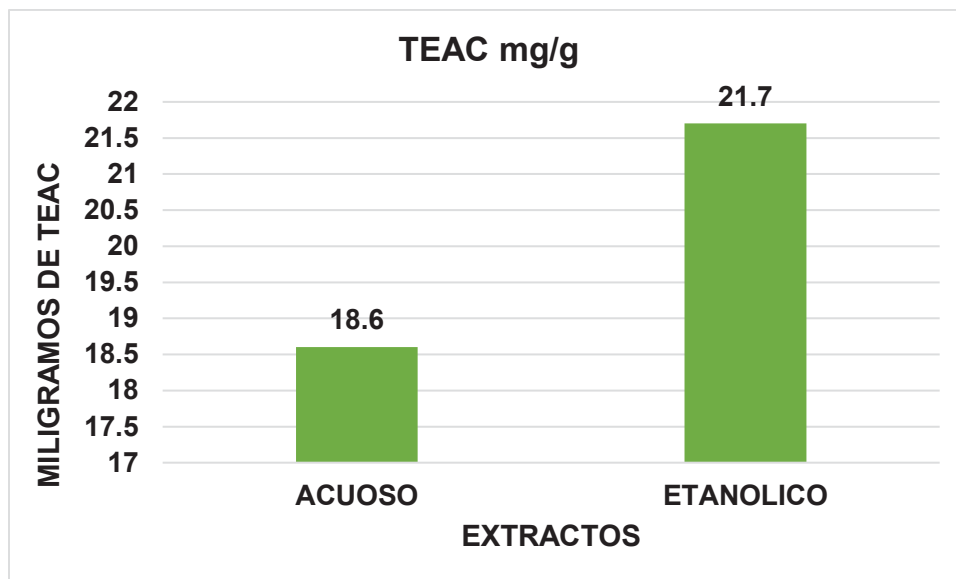


Gráfico 16. Comparación TEAC entre el extracto acuoso y etanólico. Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En el gráfico 16 se muestra la comparación del TEAC entre el extracto acuoso y el extracto etanólico, se observa un TEAC mayor para el extracto etanólico con 21.7 mg/g y uno menor para el extracto acuoso con 18.6 mg/g.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Según Villar del Fresno (54) el etanol extrae muchos más metabolitos secundarios que el agua. En el gráfico podemos observar que el extracto etanólico posee el mayor TEAC seguido del acuoso, entonces se afirma que el extracto seco con mayor TEAC posee mejor actividad antioxidante, siendo este el extracto etanólico.

4.7. DE LA CUANTIFICACION DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

4.7.1. CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

4.7.1.1. DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Tabla 36. Curva de calibración del ácido gálico concentración vs absorbancia

N°	CONCENTRACION µg/MI	ABSORBANCIA 1	ABSORBANCIA 2	ABSORBANCIA 3	PROMEDIO
1	5	0.1879	0.1876	0.1877	0.1877
2	10	0.343	0.3429	0.3428	0.3429
3	20	0.7245	0.725	0.7249	0.7248
4	40	1.4329	1.4391	1.4332	1.435
5	100	3.6061	3.606	3.6065	3.6062

Fuente: datos experimentales obtenidos con el anexo N°3

INTERPRETACION

En la tabla 36 se muestra la relación entre la concentración y las absorbancias del ácido gálico para la curva de calibración. Se observa concentraciones que van desde 5 µg/mL hasta 100 µg/mL y absorbancias que van desde 0.1877 hasta 3.6062; se muestra una relación directamente proporcional en vista de que al incrementar las concentraciones las absorbancias también se incrementan como se muestra en la figura 17.

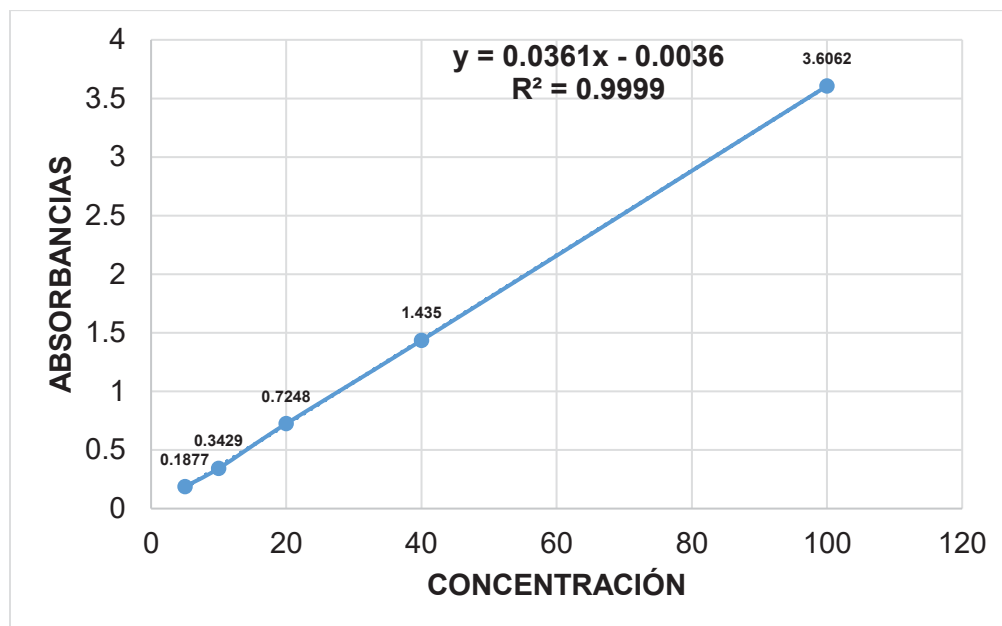


Figura 17. Curva de calibración del ácido gálico concentración vs absorbancia. Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACION

En la figura 17 se observa la curva de calibración para el ácido gálico que se representa por la relación entre la concentración del ácido gálico y sus absorbancias, dibujándose una línea recta ascendente con un r de ecuación $R = 0.9999$.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El R de la ecuación muestra un valor muy próximo al 1, lo cual muestra que tiene mucha confiabilidad. Según Gutiérrez y Salazar (78) R en la ecuación es una medida relativa del grado de asociación de la línea X y Y ; en tanto si $R=0$ entonces el modelo no halla nada de relación Y a partir de X , se interpreta como una baja capacidad explicativa de la recta; si el $R=1$ es un ajuste perfecto Y depende completamente de X , se interpreta como una alta capacidad explicativa de la recta.

4.7.1.2. DE LAS MUESTRAS

Tabla 37. Evaluación de los extractos secos concentración vs absorbancia

N°	MUESTRAS	ABSORBANCIA	ABSORBANCIA	ABSORBANCIA	PROMEDIO
		1	2	3	
1	EXTRACTO ETANOLICO	0.385	0.386	0.388	0.3863
2	EXTRACTO ACUOSO	0.242	0.243	0.249	0.2446

Fuente: datos experimentales obtenidos con el anexo N°3

INTERPRETACIÓN

En la tabla 37 se muestran las absorbancias de los extractos acuoso y etanólico siendo la más alta la del extracto etanólico con 0.3863 y la más baja la del extracto acuoso con 0.2446.

Tabla 38. Equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra

MUESTRA	EQ-Ac Gálico mg/g extracto	EQ-Ac Gálico mg/100 gramos de fruta
extracto etanólico	40.89	523.392
extracto acuoso	26.01	317.322

Fuente: datos experimentales obtenidos con el anexo N°4

INTERPRETACION

En la tabla 38 se presenta la comparación de equivalencia de ácido gálico por cada gramo de extracto siendo el valor superior para el extracto etanólico con 40.89 mg/g y valor inferior para el extracto acuoso con 26.01 mg/g; así mismo se muestra el equivalente de ácido gálico por 100 gramos de fruta fresca siendo 523.392 mg para el extracto etanólico y 317.322 mg para el extracto acuoso.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El extracto etanólico muestra mayor equivalente de ácido gálico con un valor de 40.89 mg/g de extracto, seguido del extracto acuoso con 26.01 mg/g de extracto, representado en miligramos de ácido gálico por 100 gramos de fruta

fresca tenemos, 523.392 mg para el extracto etanólico y 317.322 mg para el extracto acuoso.

Beltrán Chávez (2010), reporta en su tesis de grado 744.5 mg ácido gálico/100 gramos de muestra de Sauco de procedencia Yauyos región de Lima a una altura de 3564 m.s.n.m., del mismo modo Jorge Meza Esaud (2011) reporta en su tesis de grado 661.13 mg de ácido gálico/100 gramos de saúco de procedencia Tarma Huaracayo a 2800 m.s.n.m. valor que se aproxima al del extracto etanólico.

4.7.2. CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS.

Tabla 39. Cuantificación de antocianinas en los extractos secos (absorbancias)

EXTRACTO	PH 1		PH 4.5		ABSORBANCIAS	PROMEDIO
	520 nm	700 nm	520 nm	700 nm		
ETANÓLICO AL 70%	0.384	0.048	0.23	0.042	0.148	0.146
	0.385	0.048	0.234	0.043	0.146	
	0.385	0.048	0.235	0.043	0.145	
ACUOSO	0.224	0.005	0.096	0.005	0.128	0.126
	0.225	0.005	0.099	0.005	0.126	
	0.226	0.005	0.1	0.005	0.126	

Fuente: datos experimentales obtenidos con el anexo N°5

INTERPRETACIÓN

En la tabla 39 se muestran las absorbancias tanto para el extracto acuoso como para el extracto etanólico mostrando una absorbancia de 0.126 para el extracto acuoso y 0.146 para el extracto etanólico.

Tabla 40. Contenido de antocianinas por cada extracto seco

EXTRACTO	CONTENIDO DE ANTOCIANINAS EN 1 GRAMO DE EXTRACTO (mg)
ETANÓLICO AL 70%	24.4
ACUOSO	21.05

Fuente: datos experimentales obtenidos con el anexo N°6

INTERPRETACIÓN

En la tabla N° 40 se muestra el contenido de antocianina como cianidina tanto en extracto acuoso como en extracto etanólico siendo el mayor para el extracto etanólico con 24.4 mg/g de extracto y el menor para el extracto acuoso con 21.05 mg/g de extracto seco respectivamente.

Tabla 41. Cantidad de antocianina expresada en fruta fresca

EXTRACTO ETANOLICO	EXTRACTO ACUOSO
312.32 mg/100g fruta	256.81 mg/100 g de fruta

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACION

En la tabla 41 se observa la cantidad de antocianinas en 100 gramos de fruta fresca representadas como cianidina para ambos extractos, siendo el mayor para el extracto etanólico con 312.32 mg y el menor para el extracto acuoso con 256.81 mg, el cálculo para expresar los resultados en fruta fresca se realizó a partir de los datos obtenidos de la constancia emitida por Choquenaira J. en el anexo 6.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Del Carpio Jiménez (64) cita un valor de 450 para el saúco negro (*Sambucus nigra*) Flores Edilberto (14) reporta 438 mg de antocianinas /100 gramos de fruta fresca para *Sambucus nigra*; por otra parte, Rosales Torpoco (5), reporta en su tesis de grado 117.949 para *Sambucus peruviana* H.B.K en Huancayo Perú., estos son valores que se aproximan al valor del extracto etanólico de 312.32 mg de antocianinas/100 gramos de fruta fresca para *Sambucus peruviana* de la provincia de Anta – Cusco – Perú.

4.8. DE LA FORMULACIÓN DE GOMITAS MASTICABLES CON INCORPORACIÓN DE EXTRACTO SECO ACUOSO Y ETANÓLICO DE LAS BAYAS DE SAÚCO (*Sambucus peruviana* H.B.K).

Tabla 42. Formulación de gomitas masticables

INSUMO	%
Zumo de saúco	16.83
Azúcar	55.54
Glucosa	7.40
Grenetina	6.65
Pectina	0.74
Ácido cítrico	0.31
Goma arábica	4.44
Extracto acuoso seco	6.31
Aceite vegetal	1.68
Conservante	0.1

Fuente: datos experimentales obtenidos

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la tabla 42 se muestra la formulación de gomitas masticables. Según Báez Gonzales las gomitas deben alcanzar más del 50% de azúcar en la formulación (46) con lo cual es posible alcanzar un valor de 78 – 80 °Brix en la formulación final, esto se consiguió tras varias reformulaciones llegando a obtener 55.54 %. Con 78° Brix final de formulación.

4.9. DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IC50 IN VITRO DE LAS GOMITAS MASTICABLES

4.9.1. EXTRACTO ACUOSO:

Tabla 43. Tabla de absorbancias y porcentaje de inhibición de las gomitas con incorporación de extracto acuoso determinadas por 2 semanas

DIAS	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	ABSORBANCIA				% INHIBICIÓN
		E1	E2	E3	PROMEDIO	
1	230.7	0.4857	0.4925	0.4839	0.4873667	44.79
7		0.5013	0.4907	0.4927	0.4949	43.93
14		0.5236	0.5072	0.5153	0.5153667	41.62

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACION

En la tabla 43 se muestran las absorbancias y porcentajes de inhibición a una sola concentración 230.7 $\mu\text{g/mL}$, en vista de que a esta concentración de extracto acuoso se consigue el IC50 para la actividad antioxidante de esta forma será posible realizar la comparación entre la actividad antioxidante antes y después de la incorporación a gomitas, las muestras fueron evaluada por 14 días, al primer día, al séptimo día y al décimo cuarto día. Se observa una absorbancia de 0.4873 y 44.79 % de inhibición al primer día, 0.4949 de absorbancia y 43.93 % de inhibición al séptimo día y por último 0.5153 de absorbancia y 41.62 % de inhibición para el décimo cuarto día. La relación de días y porcentaje de inhibición es inversamente proporcional en vista que a medida que los días se incrementan el porcentaje de inhibición disminuye.

Tabla 44. Tabla de comparación de porcentaje de inhibición antes y después de la incorporación del extracto acuoso

CONCENTRACIÓN	% INHIBICIÓN	
	ANTES	DESPÚES
230.7 µg/mL	50%	44%

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACION

En la tabla 44 se muestra la comparación entre el porcentaje de inhibición a una concentración IC50 antes e IC50 después de la incorporación a gomitas masticables, mostrando 50% antes de la incorporación y 44% después de la incorporación a gomitas masticables. Esta disminución se debe a que las antocianinas tienen una baja estabilidad frente a distintos factores según Gorriti (79) importa mucho el tipo de solvente utilizado siendo el mejor el etanol a 60%, pH, acidez, luz, grupos OH, etc. En este caso no se utilizó estabilizadores de pH ni solvente tipo etanol por ello el porcentaje de inhibición disminuye en un 6%. Aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa ya que el valor obtenido es $p > 0.005$ lo cual indica que no existen diferencias significativas, para este resultado se utilizó una prueba paramétrica de wilcoxon para muestras relacionadas (como el clásico antes y después) en el paquete estadístico SPSS V.21 como se muestra en la siguiente tabla 45.

Tabla 45. Prueba de Wilcoxon para determinar la diferencia significativa del porcentaje de inhibición antes y después de la incorporación del extracto acuoso

Test Statistics ^a	
	% de inhibición DESPUES - % de inhibición ANTES
Z	-1,732 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	.083
a. Wilcoxon Signed Ranks Test	
b. Based on positive ranks.	

Fuente: datos experimentales obtenidos

4.9.2. EXTRACTO ETANÓLICO

Tabla 46. Tabla de absorbancias y porcentaje de inhibición de las gomitas con incorporación de extracto etanólico determinadas por 2 semanas

DIAS	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia				% INHIBICION
		E1	E2	E3	PROMEDIO	
1	197.91	0.451	0.4427	0.4464	0.4467	49.39
7		0.4813	0.4607	0.4927	0.47823	45.82
14		0.5657	0.5428	0.5295	0.546	38.14

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACION

En la tabla 46 se muestran las absorbancias y porcentajes de inhibición a una sola concentración 197.91 $\mu\text{g/mL}$, en vista de que a esta concentración de extracto etanólico se consigue el IC50 para la actividad antioxidante de esta forma será posible realizar la comparación entre la actividad antioxidante antes y después de la incorporación a gomitas, las muestras fueron evaluada por 14 días, al primer día, al séptimo día y al décimo cuarto día. Se observa una absorbancia de 0.4467 y 49.39 % de inhibición al primer día, 0.4782 de absorbancia y 45.82 % de inhibición al séptimo día y por último 0.546 de absorbancia y 38.14 % de inhibición para el décimo cuarto día. La relación de días y porcentaje de inhibición es inversamente proporcional en vista a que según los días se incrementan el porcentaje de inhibición disminuye y disminuye aún más que en el caso del extracto acuoso como se observa en la figura 18.

Tabla 47. Tabla de comparación de porcentaje de inhibición antes y después de la incorporación del extracto etanólico

CONCENTRACIÓN	% INHIBICION	
	ANTES	DESPÚES
197.91 µg/mL	50%	49.39%

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la tabla 47 se muestra la comparación entre el porcentaje de inhibición a una concentración IC50 antes y después de la incorporación a gomitas masticables, mostrando 50% antes de la incorporación y 49.39% después de la incorporación a gomitas masticables. En esta tabla la diferencia entre el porcentaje de inhibición inicial y final no difiere ni el 1%, según Gorriti (79) existen mejores condiciones para una buena extracción de antocianinas que favorecen su estabilidad y una de ellas es la extracción etanólica.

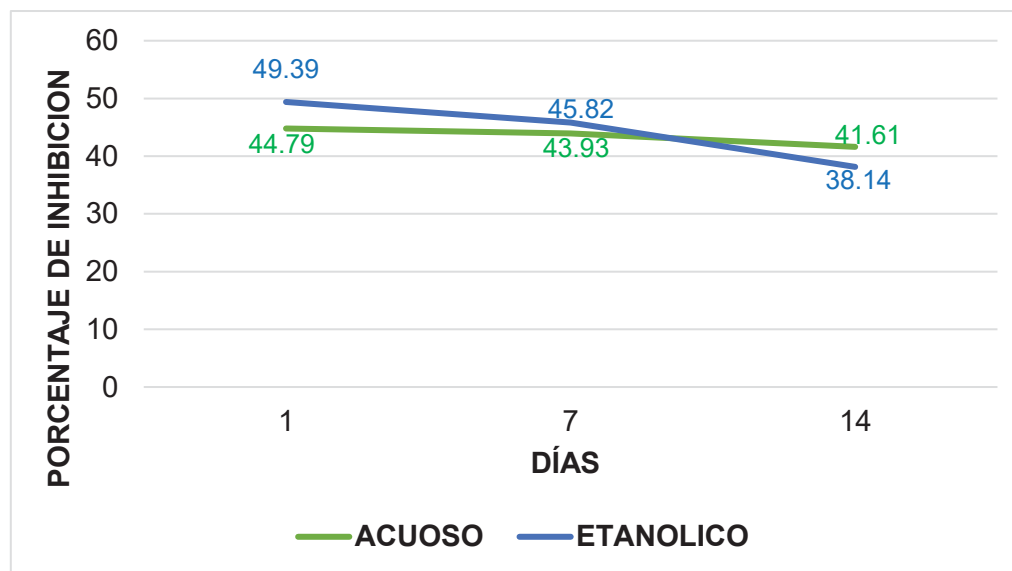


Figura 18. Comparación de porcentaje de inhibición de las gomitas masticables con extracto acuoso y etanólico durante los 14 días. Fuente: datos experimentales obtenidos

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la figura 18 se presenta la relación entre el porcentaje de inhibición y los días de evaluación de los extractos acuoso y etanólico de sauco a lo largo de 14 días de observación, se observa un porcentaje mayor al primer día para el extracto etanólico con 49.39% y uno bajo para el extracto acuoso de 44.79%, al séptimo día se observa un valor superior para el extracto etanólico de 45.82% mientras que de 43.93% para el extracto acuoso al décimo cuarto día el valor superior le corresponde al extracto acuoso con 41.63% y uno inferior para el extracto etanólico con tan solo 38.14%.

Se observa que las gomitas con incorporación de extracto acuoso tienen mejor estabilidad en cuanto a actividad antioxidante frente a las gomitas con incorporación de extracto etanólico.

Según Villar del Fresno (54), el etanol extrae muchos más metabolitos secundarios que el agua eso se corrobora con la primera medición las gomitas con extracto etanólico en vista de que tienen mejor actividad antioxidante que las gomitas incorporadas con extracto acuoso, por otra parte, las antocianinas soportan temperaturas de hasta 70°C por tiempo corto además que son estables a PH ácidos como el de las gomitas 3.5, (14,23,29) en la gráfica vemos que las gomitas masticables con incorporación de extracto etanólico pierden actividad antioxidante rápidamente a diferencia que las gomitas masticables incorporadas con extracto acuoso que mantienen relativamente alta su actividad antioxidante. En las gomitas con extracto etanólico se encuentran otros metabolitos secundarios con potencial antioxidante además de las antocianinas que ayudan con su actividad pero que a diferencia de las antocianinas no son muy estables en la forma farmacéutica de gomitas como las antocianinas del extracto acuoso.

4.9.3. DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Tabla 48. Test de Wilcoxon para evaluación de la actividad antioxidante del extracto acuoso y etanólico de las bayas de saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.) antes y después de la incorporación a gomitas masticables.

TEST STATISTICS ^A	
	% de Inhibición - % de Inhibición
Z	-1,342 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.180
a. Wilcoxon Signed Ranks Test > 0.05	
b. Based on negative ranks.	

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la tabla 48 se muestra la prueba de WILCOXON para validar la hipótesis, en vista de que esta prueba se utiliza cuando se realizan pruebas de un antes y un después de muestras relacionadas, para ello la diferencia tiene que cumplir con la prueba de normalidad; se observa un valor de $p = 0.180$, siendo esta > 0.05 que es el límite.

Siendo las hipótesis:

Ho: El extracto acuoso y etanólico de las bayas de saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.), posee la misma actividad antioxidante antes y después de la incorporación a gomitas masticables.

H1: El extracto acuoso y etanólico de las bayas de saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K.), **no** posee la misma actividad antioxidante antes y después de la incorporación a gomitas masticables

*en este caso cambiamos la hipótesis nula por la hipótesis del trabajo de investigación y no por la alterna, en vista de que en este test se trata de hallar la variación y la hipótesis nula contradice a la hipótesis alterna siendo la hipótesis alterna que existe variación.

Siendo la confiabilidad del 95 % y el nivel de significancia, 5% = 0.05 para el Test de Wilcoxon, se obtuvo una estimación del p-valor, $p = 0.18$ tal como se muestra en la tabla N° 34, como este valor es $p > 0.05$ entonces rechazamos la hipótesis Alternativa y nos quedamos con la hipótesis Nula. Es decir, no existe diferencia significativa entre los ensayos antes y después de la incorporación tanto en el extracto acuoso y etanólico; por lo que presentan misma actividad antioxidante. Lo cual se aprecia en las tablas 44 Y 47.

4.10. DEL CONTROL DE CALIDAD DE GOMITAS MASTICABLES.

Tabla 49. Control de calidad organoléptico de las gomitas masticables

PARAMETRO	ESPECIFICACIONES	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ETANOLICO
OLOR	Dulce y frutal, similar al sauco	conforme	se percibe etanol y fermento
COLOR	Morado intenso similar a las bayas maduras de sauco.	conforme	conforme
SABOR	Agridulce, frutal, similar al sauco.	conforme	frutal y ligeramente amargo
TEXTURA O CONSISTENCIA	Suave y elástico, no pegajoso.	conforme	conforme

Fuente: datos experimentales obtenidos

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la tabla 49 se muestra el control de calidad organoléptico de las gomitas masticables para ambos extractos tanto acuoso como etanólico, en el parámetro olor se especifica que las gomitas deben ser de olor dulce, frutal similar al sauco, en el extracto acuoso se cumple con estos parámetros mientras que en el etanólico se percibe etanol y fermento; por ese motivo se optó por el extracto acuoso para continuar con la investigación, en el parámetro de color se especifica un color morado intenso similar a las bayas maduras de sauco y se cumple en ambos

extractos; en cuanto al parámetro de sabor se especifica que debe ser agridulce, frutal, similar al sauco y solo lo cumple el extracto acuoso mientras que el extracto etanólico presenta un sabor frutal pero ligeramente amargo; en el parámetro de textura y/o consistencia se especifica que debe ser suave elástico y no pegajoso en ambos extractos se cumple con dichas especificaciones.

Aguirre López, en su tesis del 2018, reporta mejores resultados organolépticos con el colorante acuoso de sauco que con el colorante etanólico (12), lo cual también se evidencia en esta investigación.

Tabla 50. Control de calidad fisicoquímico de las gomitas masticables

PARAMETRO	ESPECIFICACIONES	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ETANOLICO
GRADOS BRIX	78 – 80 brix	CONFORME	CONFORME
PESO	6 gr. (2 / 10 pueden diferir +/- 5% del promedio.)	CONFORME	CONFORME
PH	3.3 – 3.5	CONFORME	CONFORME

Fuente: datos experimentales obtenidos del anexo N°:7

INTERPRETACIÓN

En la tabla 50 se muestra el control de calidad fisicoquímico de las gomitas para ambos extractos; en cuanto al parámetro de grados brix o solidos solubles se especifica como aceptable un rango de 70 – 80 °Brix en ambos extractos se cumple con la especificación; en el parámetro de peso se especifica que de cada 10 gomitas pesadas solo dos pueden diferir en un 5% del promedio total en ambos extractos es conforme; en el parámetro de PH se especifica un rango de 3.3 – 3.5 como máximo y en ambas gomitas se cumple con las especificaciones.

Báez Gonzales, reporta en su investigación valores de 78 – 80° Brix para su formulación de gomitas y 3.5 de PH (46), esto se evidencia en esta investigación.

Tabla 51. Control de calidad microbiológico de las gomitas masticables

ENSAYO	RESULTADOS	LIMITES SEGÚN DIGESA
AEROBIOS MESOFILOS	<10 UFC/g	< 10 ³ UFC/g
HONGOS Y LEVADURAS	15	<3 X 10 ²

Fuente: datos experimentales obtenidos del anexo N°:8

INTERPRETACIÓN

En la tabla 51 se observa el control de calidad microbiológico de las gomitas masticables con incorporación de extracto acuoso, en el parámetro de aerobios mesófilos la DIGESA especifica un límite de < 10³ unidades formadoras de colonia por gramo y se obtiene como resultado <10 unidades formadoras de colonia por gramo dato que se encuentra por debajo del límite establecido; en el parámetro de hongos y levaduras la DIGESA establece un límite máximo de <3 X 10² y se obtiene de resultado 15 que es un valor bajo en comparación al límite.

4.11. DEL EFECTO SOBRE LOS NIVELES DE MDA SOBRE LAS MEMBRANAS DE HEPATOCITOS DE LA FORMULACIÓN DE GOMITAS MASTICABLES CON MEJORES CARACTERISTICAS ORGANOLÉPTICAS.

4.11.1. DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Tabla 52. Curva de calibración de TEP, absorbancias vs concentración

N°	CONCENTRACION (µmol/L)	ABSORBANCIA 1	ABSORBANCIA 2	ABSORBANCIA 3	PROMEDIO
1	0	0.0838	0.0906	0.0809	0.0851
2	0.64	0.3498	0.3001	0.2991	0.316333333
3	1.28	0.5813	0.586	0.5819	0.583066667
4	2.56	1.0649	1.0781	1.0577	1.0669
5	5.13	2.0161	2.0121	2.0345	2.0209
6	10.27	4.297	4.2967	4.2965	4.296733333

Fuente: datos experimentales obtenidos del anexo N°:9

INTERPRETACIÓN

En la tabla 52 se muestra la curva de calibración del patrón TEP (tetraetoxipropano) a distintas concentraciones en el rango de 0 hasta 10.27 µmol/L, según la

metodología usada por ESTEPA y RODENAS (80) las absorbancias a distinta concentración siendo el promedio de las absorbancias de la concentración 0, 0.0851 y el promedio de absorbancias de la concentración 10.27, 4.29; así mismo se observa que existe relación directamente proporcional entre la concentración y las absorbancias en vista de que la concentración se incrementa la absorbancia también se incrementa así como se observa en la figura 19.

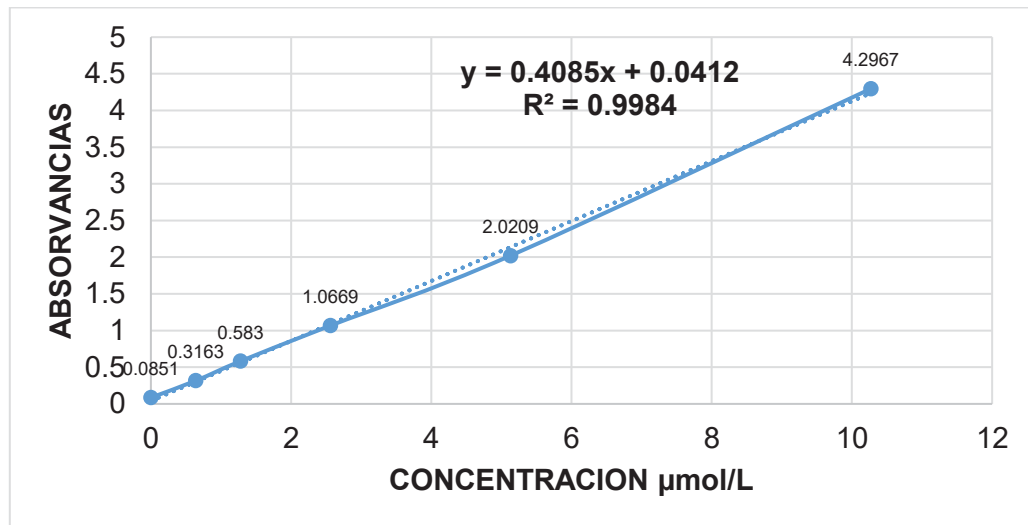


Figura 19. Curva de calibración de TEP absorbancias v/s concentración Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la figura 19 se observa la gráfica de la curva de calibración del patrón TEP, de concentración v/s absorbancia, se observa una línea recta ascendente con una ecuación $y = 0.4085x + 0.0412$ y un $R = 0.9984$.

El R de la ecuación muestra un valor muy próximo al 1, lo cual muestra que tiene mucha confiabilidad. Según (Gutiérrez y Salazar 2008) R en la ecuación es una medida relativa del grado de similitud de la línea X y Y; en tanto si $R=0$ entonces el modelo no halla ninguna relación de Y a partir de X, se interpreta como una baja capacidad explicativa de la recta; si el $R=1$ es un ajuste perfecto Y depende completamente de X, se interpreta como una alta capacidad explicativa de la recta.

4.11.2. DE LA EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS

Tabla 53. Análisis de muestras en el grupo blanco absorbancias

N°	MUESTRA	ABSORBANCIA 1	ABSORBANCIA 2	ABSORBANCIA 3	PROMEDIO	µmol/L
1	G1r1	0.1321	0.1284	0.1537	0.1380	0.2371
2	G1r2	0.123	0.1253	0.1236	0.1239	0.2026
3	G1r3	0.1301	0.1296	0.1285	0.1294	0.2159
4	G1r4	0.1362	0.134	0.1412	0.1371	0.2348
5	G1r5	0.1263	0.1301	0.1297	0.1287	0.2141
6	G1r6	0.1345	0.1289	0.1285	0.1306	0.2189
Desviación estándar					0.0053	
					PROMEDIO	0.2206

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACION

En la tabla 53 se muestran las absorbancias del grupo blanco, se observa absorbancias de números cercanos con una desviación estándar de 0.0053 y un promedio de concentración de MDA de 0.2206 µmol/L.

Tabla 54. Análisis de muestras en el grupo control negativo absorbancias

N°	MUESTRA	ABSORBANCIA 1	ABSORBANCIA 2	ABSORBANCIA 3	PROMEDIO	µmol/L
1	G2r1	0.2035	0.2003	0.2022	0.202	0.3936
2	G2r2	0.1946	0.2092	0.1821	0.1953	0.3772
3	G2r3	0.2138	0.2152	0.2091	0.2127	0.4198
4	G2r4	0.2096	0.2013	0.2032	0.2047	0.4002
5	G2r5	MURIO	al 7mo día			
6	G2r6	MURIO	al 10mo día			
Desviación estándar					0.0071	
					PROMEDIO	0.3977

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la tabla 54 se muestran las absorbancias del grupo control negativo, se observa absorbancias de números cercanos con una desviación estándar de 0.0071 y un promedio de concentración de MDA de 0.3977 µmol/L.

Tabla 55. Análisis de muestras en el grupo control positivo absorbancias

N°	MUESTRA	ABSORBANCIA 1	ABSORBANCIA 2	ABSORBANCIA 3	PROMEDIO	µmol/L
1	G3r1	0.1598	0.1616	0.1496	0.157	0.2834
2	G3r2	0.1758	0.1531	0.1799	0.1696	0.3143
3	G3r3	0.1576	0.1419	0.1634	0.1543	0.2768
4	G3r4	0.1465	0.1507	0.1405	0.1459	0.2563
5	G3r5	0.1633	0.1559	0.166	0.1617	0.2950
6	G3r6	0.1691	0.1617	0.1553	0.1620	0.2957
Desviación estándar					0.00805	
					PROMEDIO	0.2869

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la tabla 55 se muestran las absorbancias del grupo control positivo, se observa absorbancias de números cercanos con una desviación estándar de 0.0080 y un promedio de concentración de MDA de 0.2869 µmol/L.

Tabla 56. Análisis de muestras en el grupo experimental absorbancias

N°	MUESTRA	ABSORBANCIA 1	ABSORBANCIA 2	ABSORBANCIA 3	PROMEDIO	µmol/L
1	G4r1	0.1396	0.1453	0.1533	0.1460	0.2567
2	G4r2	0.1603	0.1701	0.1582	0.1628	0.2978
3	G4r3	0.1371	0.1465	0.1349	0.1395	0.2406
4	G4r4	0.1276	0.1275	0.1196	0.1249	0.2048
5	G4r5	0.1985	0.2001	0.1926	0.1970	0.3815
6	G4r6	Murió	al 7mo día			
Desviación estándar					0.0276	
					PROMEDIO	0.2763

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la tabla 56 se muestran las absorbancias del grupo experimental, se observa absorbancias de números cercanos con una desviación estándar de 0.0276 y un promedio de concentración de MDA de 0.2763 µmol/L.

Tabla 57. Niveles de MDA por grupo

GRUPO	MDA $\mu\text{mol/L}$
BLANCO	0.22
CONTROL NEGATIVO	0.39
CONTROL POSITIVO	0.28
GRUPO EXPERIMENTAL	0.27

Fuente: datos experimentales obtenidos

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la tabla 57 se observa se observa la cantidad de MDA por grupo después del tratamiento, el grupo control negativo muestra niveles de MDA elevados 0.39 $\mu\text{mol/L}$ a diferencia de los demás grupos que muestran valores cercanos como el control positivo 0.28 $\mu\text{mol/L}$ y el grupo experimental 0.27 $\mu\text{mol/L}$ seguidos del grupo blanco con un nivel mucho más bajo 0.22 $\mu\text{mol/L}$.

Existe una diferencia entre grupo a grupo lo cual indica hay respuesta diferente por cada grupo de tratamiento, Cruz Vega (73) y Troncoso Luzmila (15), también reportan valores de MDA bajos para su grupo blanco y control positivo, así como también valores elevados para su grupo control negativo.

4.11.3. DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Tabla 58. Test de ANOVA para la evaluación del efecto sobre los niveles de MDA del extracto acuoso de las bayas de sauco (*Sambucus peruviana* H.B.K.) después de la incorporación a gomitas masticables.

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.076	3	.025	19.547	.000
Within Groups	.022	17	.001		
Total	.098	20			

P= <0.05

Fuente: datos experimentales obtenidos

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la tabla 58 se muestra el test de ANOVA para la evaluación del efecto sobre los niveles de MDA, con un valor de $P < 0.005$.

Siendo las hipótesis:

Ho: La formulación de gomitas con mejor actividad antioxidante in vitro y mejores parámetros de calidad **NO** posee efecto sobre los niveles de MDA.

H1: La formulación de gomitas con mejor actividad antioxidante in vitro y mejores parámetros de calidad posee efecto sobre los niveles de MDA.

Para una confiabilidad del 95% y un nivel de significancia del 5% = 0.05, una estimación del p-valor $p = 0.00$, $p < 0.05$ entonces rechazamos la hipótesis nula y nos quedamos con la hipótesis alterna. Por lo tanto, si existe efecto sobre los niveles de MDA.

Tabla 59. Test de TUKEY para comparación múltiple de grupos.

$\mu\text{mol/L}$				
Tukey HSD _{a,b}				
GRUPO	N°	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
BLANCO	6	.220583		
EXPERIMENTAL	5	.276320	.276320	
CONTROL POSITIVO	6		.286983	
CONTROL NEGATIVO	4			.397700
SIG.		.101	.964	1.000

Fuente: datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la tabla 59 se muestra el test de TUKEY para la comparación múltiple de grupos de la evaluación del efecto sobre los niveles de MDA, para un nivel de significancia $P = 0.05$, se observa que el grupo blanco y el experimental son similares mas no iguales con un nivel de significancia cercano a 0.101 agrupados el grupo N° 1; seguido del grupo N° 2 que agrupa al grupo experimental y el control positivo con un nivel de significancia de 0.964 y por

ultimo tenemos al grupo N° 3 que tiene solo al control negativo en vista que no hay similitud con ninguno de los otros grupos. Entonces existe diferencia significativa de grupo a grupo siendo el grupo del control negativo diferente a los demás grupos.

CONCLUSIONES

1. Se evaluó la actividad antioxidante del extracto acuoso y etanólico de las bayas de sauco (*Sambucus peruviana H.B.K*) antes y después de la incorporación a gomitas masticables evidenciándose que no existe diferencia significativa entre un antes y un después y se determinó el efecto sobre los niveles de MDA en membranas de hepatocitos siendo el grupo experimental el grupo con mayor similitud al grupo control positivo lo cual indica que las gomitas masticables si poseen efectos sobre los niveles de MDA.
2. Se realizaron las pruebas preliminares (solubilidad y estudio fitoquímico cualitativo) de los extractos secos, acuoso y etanólico de las bayas de sauco (*Sambucus peruviana H.B.K*). los extractos mostraron una naturaleza polar siendo solubles en solventes como agua, agua acidulada y metanol e insolubles en solventes como acetona, cloroformo y hexano. Del mismo modo en la marcha fitoquímica mostraron presencia abundante de antocianos y presencia leve de fenoles, saponinas y flavonoides.
3. Se determinó la actividad antioxidante in vitro del extracto acuoso y etanólico de las bayas de sauco (*Sambucus peruviana H.B.K*), mediante el método de secuestro de radicales libres DPPH. Siendo el extracto etanólico con mayor porcentaje de inhibición con un IC50 igual a 197.9 µg/ml y un TEAC equivalente a 21.7 mg/g; mientras que el extracto acuoso con un IC50 igual a 230.7 µg/ml y TEAC equivalente a 18.6 mg/g.
4. Se cuantificaron los metabolitos secundarios responsables de la actividad antioxidante (polifenoles totales y antocianinas). Siendo el equivalente de ácido gálico 40.89 mg/g para el extracto etanolico y 26.01 mg/g para el extracto acuoso; así como el contenido de antocianinas equivalente a 24.4 mg/g para el extracto etanólico y 21.05 mg/g para el extracto acuoso.
5. Se hizo la formulación de gomitas masticables con extractos equivalentes a 160 mg de antocianinas con presencia de polifenoles totales para ambos extractos acuoso y etanólico de saúco (*Sambucus peruviana H.B.K*); siendo equivalente a

7.37 gramos de extracto acuoso y 6.55 gramos de extracto etanólico por formulación.

6. Se determinó la actividad antioxidante IC50 in vitro de las gomitas masticables de ambos extractos, acuoso y etanólico de sauco (*Sambucus peruviana H.B.K*), siendo las gomitas con extracto etanólico las que poseen mejor actividad antioxidante con un porcentaje de inhibición de 49.39% a diferencia de la gomita con extracto acuoso que solo obtuvo 44%.
7. Se realizó el control de calidad fisicoquímico, organoléptico y microbiológico de las gomitas masticables. Siendo las gomitas masticables con extracto acuoso las de mejores características organolépticas, en cuanto a las fisicoquímicas ambas cumplían los parámetros de 78°Brix Y 3.5 de PH y en el análisis microbiológico se obtuvieron <10 UFC/G para aerobios y mesófilos y 15 UFC/G para hongos y levaduras.
8. Se determinó el efecto sobre los niveles de MDA en membranas de hepatocitos de la formulación de gomitas masticables con mejores características organolépticas, obteniéndose valores de MDA de 0.22 $\mu\text{mol/L}$ para el grupo blanco, 0.39 $\mu\text{mol/L}$ para el control negativo, 0.28 $\mu\text{mol/L}$ para el control positivo y 0.27 $\mu\text{mol/L}$ para el grupo experimental. Por la similitud de respuesta en los grupos control positivo y experimental se evidencio efecto sobre los niveles de MDA y se concluye que las gomitas masticables si logran disminuir el nivel de MDA después de una intoxicación hepática inducida por paracetamol.

SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES

A LA MAXIMA AUTORIDAD UNIVERSITARIA (CONSEJO UNIVERSITARIO).

- Implementar los laboratorios de investigación con instrumentos de medición más precisos como micro pipetas graduadas de hasta 10 ml, evitando sesgos por manipulación con el excedente de gotas tras cada medición; así mismo calibrar los equipos de medición como las balanzas de precisión para evitar errores de medida.

A LOS DOCENTES DE LA ESCUELA PROFESIONAL

- Incentivar a los estudiantes a realizar más estudios de las especies nativas de la sierra del Perú para revalorar los productos andinos, así mismo al desarrollo de productos industrializados potencialmente beneficiosos para la salud.

A LOS ESTUDIANTES DE LA ESCUELA PROFESIONAL

- Desarrollar gomitas antioxidantes modificando los ingredientes de forma que estos productos no sean potencialmente cariogénicos.
- Evaluar la actividad antioxidante en las gomitas con incorporación de *Sambucus peruviana H.B.K.* de la forma liofilizada.
- Evaluar otras formas farmacéuticas a base de *Sambucus peruviana H.B.K.* como capsulas de liofilizado para aprovechar sus beneficios como antioxidante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reyes Munguia A, Galicia Cardoso M, Carrillo I. Antioxidantes: la magia de lo natural. Revista académica de investigación [en línea] 2011. [citado: 2019 marzo 14]. (8) 1-16. Disponible en:
<https://www.eumed.net/rev/tlatemoani/08/rgc.pdf>
2. Zorrilla García A. El envejecimiento y el estrés oxidativo. Revista cubana, [en línea]. 2002 [citado el 02 de abril del 2019], 21(3) 1 -8, disponible en:
http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol21_3_02/ibi06302.pdf
3. OMS (Organización mundial de la salud). Información sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles, resumen de orientación. OMS. [internet].2014, [citado el 03 de diciembre del 2020]. Disponible en:
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/149296/WHO_NMH_NVI_15.1_spa.pdf;jsessionid=DCEAE56D7B4BC9685E29102999585C12?sequence=1
4. Elejalde G.J. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. Anales de medicina interna. 2001; 18 (6): 326-335.
5. Rosales Torpoco J., Influencia de la temperatura y velocidad de aire en la cinética de degradación de las antocianinas del sauco (*Sambucus peruviana h.b.k.*) durante el secado por convección, [Tesis], Perú - Huancayo: Universidad Nacional del centro del Perú, Facultad de ingeniería en industrias alimentarias, 2015.
6. Smith, R.; K. Tran y otros seis autores, Elderberry juice composition and health benefits, in Fruit Juices: Types, Nutritional Composition and Health Benefits, by Katherlyn Elizabeth Elder, Editors, Nova Science Publishers, Cap 1, pp:1-20 ISBN 978-1-63321-135-3 (2014).
7. Carlos morales M., medicina integrativa. [internet]. Las palmas: blog, medicina integrativa. 2017, [citado el 02 de abril del 2019], medicina integrativa, [aproximadamente 5p]. disponible en:
<https://www.carlosmoralesmartin.com/como-afecta-el-estres-oxidativo-nuestra-salud/>

8. Delgado Olivares L, Betanzos Cabrera G. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. Investigación y ciencia, Universidad Autónoma de Aguas Calientes. [internet].2010, [citado el 02 de abril del 2019], 50(10) 1 -6, disponible en: <https://www.uaa.mx/investigacion/revista/archivo/revista50/Articulo%202.pdf>
9. Drago, M., López, M., Saíenz, T. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. Rev Mexicana Ciencias Farmacéuticas. 2006; 37 (4): 58
10. Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A., Sirichakwal. P. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. J Food Composition Analysis. 2008; 21, 241-8.
11. Ayala R. H., Lutz M. Alimentos saludables y funcionales. Scielo, revista chilena de nutrición, [internet]. 2003 [citado el 05 de abril del 2019], (30) 1 -8, disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182003000100001
12. Aguirre Lopez N., Desarrollo de un colorante natural desde el fruto del Sauco negro (*Sambucus nigra*) para uso en la industria alimentaria, [Tesis], Ecuador: Facultad de ingeniería y ciencias aplicadas, 2018.
13. Ruiz Reyes S., Capacidad antioxidante in vitro de los flavonoides totales obtenidos de las hojas de *Sambucus peruviana* H.B.K. (sauco) proveniente de la ciudad de Huamachuco, Pharmaciencia, revista científica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, [internet]. 2013 [citado el 11 de abril del 2019], 1, 1 - 8, disponible en: <http://www.revistas.unitru.edu.pe/index.php/farmabioq/article/view/464/419>
14. Flores E., Extracción de Antioxidantes de las Bayas del Sauco (*Sambucus nigra* L. subsp. *peruviana*) con Ultrasonido, Microondas, Enzimas y Maceración para la obtención de Zumos Funcionales, scielo, [internet]. 2017 [citado el 11 de abril del 2019], 27(1), 1 - 12, DOI: 10.4067/S0718-07642017000100012, disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v28n1/art12.pdf>
15. Troncoso L., Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol, scielo,

- anales de la facultad de medicina, [internet]. 2007 [citado el 02 de mayo del 2019], 68(4), 1 – 11. disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v68n4/a08v68n4>
16. Verde Garcia P., transformación integral e industrialización del sauco (*Sambucus peruviana H.B.K*) para el desarrollo microregional sostenible, [Tesis], Perú - Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Ingeniería Química, 2006.
 17. Leon Silva J., Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanolico de las hojas de *Sambucus peruviana* (Saucu) sobre streptococcus mutans ATCC 25175, [Tesis], Perú - Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Estomatología, 2018.
 18. Paucar Quispe M., influencia de la adición del sauco (*Sambucus peruviana l.*) en las características fisicoquímicas y organolépticas del yogurt natural, [Tesis], Perú - Huancavelica: Universidad Nacional de Huancavelica, Facultad de ciencias Agrarias, Departamento de agroindustrias, 2014.
 19. Baracaldo Jimenez M., Bayas de sauco como ingrediente en la gastronomía, [tesis], Bogota: Universitaria Agustiniiana, Facultad de Artes, Comunicación y cultura, 2015.
 20. Coronado H. M., Vega y Leon S., Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. Scielo, revista chilena de nutrición, [internet]. 2015 [citado el 06 de abril del 2019], 42(2) 1 -7, disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v42n2/art14.pdf>
 21. Chasipanta Ronquillo, C., Evaluación de la actividad antioxidante bio-autográfica de 5 variedades de aceites esenciales amazónicos (*Ocotea quixos; Psidium guajava; Eugenia stipitata; Piper auritum; Piper imperiale*), [Tesis], Ecuador - Quito: Universidad Politecnica Salesiana sede Quito, Facultad de ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, 2016.
 22. Ocu.org., El elixir de la eterna confusión Antioxidantes, estudio, ocu salud, [internet]. 2015 [citado el 06 de abril del 2019], 400(31), 1 -4, disponible en: <https://www.ocu.org/-/media/ocu/images/paper%20publications/ocusalud/2015/400/antioxidantes/ref>

erence/antioxidantes/antioxidantes%20(cm400_febrero%202015).pdf?rev=139b4dbe-2d18-432c-a9ce-5bd1c6c0100d

23. Zamora S. D., Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud, redalyc, revista chilena de investigación, [internet]. 2007 [citado el 06 de abril del 2019], 34, 1 -23, disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46934102>
24. Quiñones M., Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular, scielo, nutrición hospitalaria, [internet]. 2012 [citado el 24 de abril del 2019], 27(1), 1 - 14, disponible en: http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v27n1/09_revision_08.pdf.
25. Barrera Mendoza C., Vitaminas antioxidantes en el asma, scielo, revista alergia México, [internet]. 2018 [citado el 24 de abril del 2019], 65(1), 1 - 17, disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/ram/v65n1/2448-9190-ram-65-01-61.pdf>
26. Vallejo Zamudio E., Una poderosa herramienta en la medicina preventiva del cáncer: los antioxidantes, medigraphic, el residente, [internet]. 2017 [citado el 24 de abril del 2019], 12(3), 1 - 8, disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/residente/rr-2017/rr173d.pdf>
27. Gonzales Jiménez F., Empleo de antioxidantes en el tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas, medigraphic.com, revista especializada en ciencias de la salud, [internet]. 2015 [citado el 06 de abril del 2019], 18(1) 1 - 6, disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2015/vre151c.pdf>
28. Rafael Sánchez E., Extracción y cuantificación de antocianinas de maíz morado (*Zea mays l.*) utilizando dos solventes a diferentes temperaturas y tiempos de extracción, [Tesis], Perú - Cajamarca: Universidad Nacional de Cajamarca Facultad de Ciencias agrarias, Escuela académico profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias; 2017.
29. Flores Aguilar E. y colaboradores, Estabilidad de Antocianinas, Fenoles totales y Capacidad Antioxidante de Bebidas de Maíz Morado (*Zea mays L.*) y Uña de Gato (*Uncaria tomentosa sp*), scielo, [internet]. 2018 [citado el 11 de abril del

- 2019], 29(2), 1 - 10, disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v29n2/0718-0764-infotec-29-02-00175.pdf>
30. Sotomayor Carrasco M., Optimización de extracción, microencapsulación y evaluación de la capacidad antioxidante de antocianinas de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) mediante secado por aspersión, [Tesis], Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras; 2017.
31. Mendoza Mendoza G., antocianinas totales y parámetros de color en líneas de maíz morado, revista fitotecnica mexicana, [internet]. 2017 [citado el 11 de abril del 2019], 40(4), 1 -10, disponible en: <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/40-4/11a.pdf>
32. Carrión Vega S., diseño del proceso de producción de nachos antioxidantes a base de antocianinas obtenida de la lixiviación del maíz, [Informe], Perú - Piura: Universidad de Piura, Facultad de ingeniería, 2018.
33. Barragán Condori M. y colaboradores, Determinación del efecto de procesos de cocción en papas nativas pigmentadas (*Solanum tuberosum* spp. andigena) sobre sus compuestos bioactivos, scielo, revista de investigación alto andina, [internet]. 2017 [citado el 11 de abril del 2019], 19(1), 1 - 6, disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/ria/v19n1/a05v19n1.pdf>
34. La crio concentración en la industria agroalimentaria, MG. SC. ING. Flor De María Vásquez [Diapositiva], Perú: USMP, 2018, 31 diapositivas. [citado el 10 de octubre del 2019], disponible en: <https://www.usmp.edu.pe/vision2018/pdf/Jueves/GENERALES/VISION%202018%20salon%20201/la%20criocon%20centracion%20en%20la%20industri%20a%20alimentaria/CRIOCONCENTRACION.pdf>
35. Gulfo R., Recuperación de solutos del hielo proveniente de un Crio concentrador de placas: cinética y concentración, [Doctorado], Barcelona: Universidad Politécnica de Catalunya, Programa de doctorado Tecnología Agroalimentaria y Biotecnología, 2014.
36. Kuskoski M., Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos, scielo, arnaldoa, [internet]. 2005 [citado el 25 de

- abril del 2019], 25(4), 1 - 7, disponible en:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612005000400016
37. Cruzado M., determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*Cynara scolymus L.*), scielo, revista de la sociedad química del Perú, [internet]. 2013 [citado el 25 de abril del 2019], 79(1), 1 - 7, disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2013000100008
38. Boom A. E., Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales de eucaliptos cultivados en Colombia, scielo, información tecnológica, [internet]. 2018 [citado el 25 de abril del 2019], 29 (6), 1 - 10, disponible en:
<https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v29n6/0718-0764-infotec-29-06-00057.pdf>
39. Jaramillo F., Valdivia A., fundamentos de estrés oxidativo celular. México: Universidad Autónoma de Aguas Calientes; 2016.
40. A. Tur. J., Papel del consumo de antioxidantes en la obesidad infantil, Rev Esp Endocrinol Pediatr, [internet]. 2018 [citado el 06 de abril del 2019], 9(3), 1 -5, disponible en: <https://www.endocrinologiapediatrica.org/revistas/P1-E27/P1-E27-S1670-A487.pdf>
41. Mañon Rossi W. Biomarcadores de estrés oxidativo, jppres, journal of pharmacy and pharmacognosy research, [internet]. 2016 [citado el 03 de mayo del 2019], 4(2), 1 - 22, disponible en:
http://jppres.com/jppres/pdf/vol4/jppres15.083_4.2.62.pdf
42. Melgarejo Pomar G., Concentración de malondialdehído en sujetos que residen a gran altitud: estudio exploratorio, redalyc, Perú MED EXP SALUD PUBLICA, [internet]. 2017 [citado el 03 de mayo del 2019], 34(4), 1 - 6, disponible en:
<http://www.redalyc.org/pdf/363/36353911015.pdf>
43. Porras Leonardo G., formulación de gomitas masticables a base de jengibre, su aceptabilidad y percepción de los efectos en pacientes oncológicos. Estudio

- realizado en el instituto de cancerología, Bernardo del valle s. –Incan-, Guatemala. 2017. [Tesis], Guatemala: Universidad Rafael Landivar, Facultad de ciencias de la salud, licenciatura de Nutrición, 2017.
44. Conospo Herrera G. J., Elaboración de gomitas de papaya endulzadas con stevia (*Stevia rebaudiana*). [Tesis], México: Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Facultad de ciencias de la Nutrición y Alimentos, licenciatura en Alimentos, 2016.
45. Trujillo Hernández E., Desarrollo de una formulación de ácido ascórbico, gomitas para uso pediátrico. [Tesis], México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de estudios superiores de Zaragoza, 2013.
46. Báez Gonzales J., Control de la actividad acuosa en dulces tipo gomita adicionadas con vitamina C y fibra de nopal (*Opuntia sp.*), investigación y desarrollo, [internet]. 2016 [citado el 27 de abril del 2019], 1(2), 1 - 7, disponible en: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/2/9/142.pdf>
47. Mejía Huamani M., efecto hepatoprotector del extracto de zanahoria (*Daucus carota L.*) sobre la intoxicación hepática inducida con paracetamol en ratas (*Rattus norvegicus*), comparado con la silimarina, Arequipa 2018., [Tesis], Perú: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Facultad de ciencias biológicas, Escuela Profesional de Ciencias de la Nutrición, 2018.
48. Megias M., Molist P., Pombal M., Tipos celulares hepatocitos, 1ª. Ed. Universidad de Vigo: Textudio; 2018.
49. Farre M., Abanades S., paracetamol, researchgate, [internet]. 2004 [citado el 27 de abril del 2019], 19(5), 1 - 11, disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Magi_Farre/publication/287337779_Paracetamol/links/5679d32e08aeaa48fa4ad9dc.pdf?origin=publication_detail
50. Vademecum Paracetamol, [internet]. Argentina: Equipo de redacción IQB, 2014 [citado el 28 de abril del 2019], disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/p006.htm>

51. Vargas Castro M., intoxicación por acetaminofén en adultos, scielo, medicina legal de costa rica, [internet]. 2016 [citado el 27 de abril del 2019], 33(1), 1 - 7, disponible en: <http://www.scielo.sa.cr/pdf/mlcr/v33n1/1409-0015-mlcr-33-0100103.pdf>
52. Vademecum silimarina, [internet]. Argentina: Equipo de redacción IQB, 2016 [citado el 28 de abril del 2019], disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/s014.htm>
53. Ley, 08 de mayo 2000, ley de protección a los animales domésticos y animales silvestres mantenidos en cautiverio, Ley N°27265/2000.
54. Villar del fresno A. farmacología general. Ed síntesis – España primera edición, Madrid España, 1999.
55. Aguado María I., Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de un extracto etanólico de *Aloisya polystachya* (Griseb.) Mold (Verbenaceae), Revista Mexicana de Ciencia Farmacéutica, Universidad de Buenos Aires - Argentina, [internet]. 2013 [citado el 27 de agosto del 2019], 44(3), 1 - 6, disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-019520130003000006&script=sci_arttext
56. Giusti M., Polit F., Characterization and Quantitation of Anthocyanins and Other Phenolics in Native Andean Potatoes, agricultural and food chemistry, 2014.
57. Alcántara Díaz N., "Efecto del liofilizado de "*Vaccinium myrtillus*" sobre los niveles de malondialdehído en membranas hepatocíticas de *rattus norvergicus var albinus*", [Tesis], Perú - Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Farmacia y Bioquímica, carrera profesional de Farmacia y Bioquímica, 2016.
58. Casiano Domínguez M., Patrones espectrales de la fenología del desarrollo vegetativo y reproductivo de árboles de huizache (*Acacia Farnesiana* (L.) Willd.), Terra latinoamericana, 2018; 6(4) 1-17

59. Sanchez Rojas A., Pisos altitudinales, gobierno regional de Cajamarca [internet]. 2010 [citado el 07 de enero del 2020], 1 - 13, disponible en: <https://zeeot.regioncajamarca.gob.pe/sites/default/files/Pisos%20Altitudinales.pdf>
60. Dávila J., Juárez F. Estudio comparativo de la ganancia de peso en ratones Balb/c alimentados con harina de viseras de pollo y el concentrado comercial [internet]. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua: UNAN León; 2016 [citado 05 de enero del 2021]. Disponible en: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/5362/1/231825.pdf>
61. Mesa García, f.; Martínez Sánchez M.; Química oncenogrado, 6ª -09 Ed; Cuba, editorial pueblo y educación, 2008.
62. Martínez j., Iriando C., fuerzas intermoleculares, [internet], 2013 [citado el 13 de enero del 2020] disponible en: <https://ocw.ehu.eus/mod/resource/view.php?id=6263>
63. Serrano, J. El espectro electromagnético absorción visible-ultravioleta [Internet]. Cartagena: Universidad Politécnica de Cartagena; sin fecha [citado 05 de enero del 2021]. Disponible en: http://https://www.upct.es/~minaees/espectro_electromagnetico.pdf
64. Del Carpio C., Serrano C. y Giusti M., Caracterización de las antocianinas de los frutos de Berberis boliviana Lechler. Sociedad química Perú [en línea] 2009. [citado: 2019 abril 12]; 75(1). Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/229411863_Characterisation_and_preliminary_bioactivity_determination_of_Berberis_boliviana_Lechler_fruit_anthocyanins.
65. Rocha C. Antocianidinas [DVD]. Versión 1. México: Calameo, 2012. Color.
66. Aguilera Ortiz M. y colaboradores, propiedades funcionales de las antocianinas, researchgate, revista biotecnía, [internet]. 2016 [citado el 11 de abril del 2019], 40(4), 1 -8, disponible en:

- https://www.researchgate.net/publication/283361581_Propiedades_funcionales_de_las_antocianinas
67. Colladeen® que aporta 160 mg de antocianidinas de uva y mirtilo, [internet]. España: Lamberts Española S.L, 2019 [citado el 11 de octubre del 2019], disponible en: <https://lambertsusa.com/producto/colladeen-maxima-potencia/>
68. Proceso de elaboración de las gomitas, [internet]. España: blogspot, 2016 [citado el 11 de octubre del 2019], disponible en: <http://luisarendon.blogspot.com/2016/05/proceso-de-elaboracion-de-las-gomitas.html?m=1>
69. Romo K., Pérez L., Golosinas gelificadas enriquecidas con residuos agroindustriales de piña y papaya: propiedades fisicoquímicas y funcionales, citado en: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume3/4/9/104.pdf>
70. Farmacopea de los Estados Unidos de América, Formulario nacional. USP 34 NF 29. 2011; 1,2.
71. Ministerio de agricultura, ganadería y pesca de Argentina, Marco legal de la elaboración de confituras. [Internet]. Argentina; sin fecha, [citado 05 de enero del 2021]. Disponible en: <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/SAIEA/imagenes/Produccion%20mermelada.pdf>
72. Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano: DIGESA, 2003 [citado el 28 de abril del 2019], disponible en: http://www.digesa.minsa.gob.pe/norma_consulta/Proy_RM615-2003.pdf
73. Santa Cruz K. L., Efecto de la administración de la harina de *Myrciaria dubia* (camu camu) sobre daño hepático inducido por paracetamol en ratones. [Tesis], Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Nutrición, 2019.
74. Rodríguez Valderrama L., Efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico del *Petroselinum sativum* (perejil) sobre la concentración de malonaldehído en *rattus*

- ratuss Var. Albinus* tratado con paracetamol. [Tesis]. Perú – Trujillo, Universidad Cesar Vallejo, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Profesional de Nutrición. 2018.
75. Boada M., Colom A. La experimentación animal, *trerepro*, pub, [internet]. 2011 [citado el 16 de octubre del 2019], 1 - 202, disponible en: https://ddd.uab.cat/pub/trerepro/2011/80084/la_experimentacion_animal.pdf
76. Servicio experimental animalario. Eutanasia (ratón, rata, hámster y cobayo). SEA animalario OMG. 2005; 4(10) 1-4.
77. Kenneth W., Kenneth D., Química general, Mexico, Mac Graw Hill, 3 ed, 1992.
78. Gutiérrez H. Salazar R., Control estadístico y de calidad sigma, Mac Graw Hill, 2 ed. 2009.
79. Gorriti A., Arroyo J., Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante de las corontas del maíz morado (*Zea mays* L.): Método de extracción, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2009, 8 (6), 509 – 518, citado de <https://www.redalyc.org/pdf/856/85617461006.pdf>.
80. Estepa V., Rodenas S., Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano, *Anal. Real Acad. Farm.* 2001, 67: citado en: <https://core.ac.uk/download/pdf/230310194.pdf>.

ANEXOS

Anexo N°1: prueba de solubilidad de los extractos acuoso y etanólico.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS

LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA - Pabellón de Control de Calidad
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERU Contacto 973868855

RESULTADOS

Cusco, 08 de Noviembre del 2019

Solicitante : UNSAAC
Tipo de Análisis : Pruebas de Solubilidad
Muestra : 2 Extractos, Etanólico al 70% y Acuoso de Bayas de Sauco (*Sambucus peruviana HBK*)
Cantidad de Muestra : Dos placas Petri conteniendo 2gr aproximadamente de cada uno

Muestra	Hexano	Cloroformo	Acetona	Metanol	Agua	Agua Acidulada
Extracto Etanólico al 70%	-	-	-	++	+++	+++
Extracto Acuoso	-	-	-	++	+++	+++

Muy Soluble = (+++), Poco Soluble = (++) , Muy Poco Soluble = (+), Insoluble = (-)

El ensayo realizado a las muestras consistió en solubilidades consolventes de Baja polaridad a Alta polaridad de acuerdo a la literatura descrita.

- Lock de Ugaz O. 1994."Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio en los productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima



M. Jorge Choquenir Pari
Analista del Laboratorio de Cromatografía y
Espectrometría - UNSAAC
CQP - 914

Anexo N°2: Ficha de recolección de datos de la actividad antioxidante

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Curva de calibración con trolox

fecha: / /

Concentración:

Absorbancia referencia:

N°	Concentración (µg/mL)	Volumen (µL)	ETOH (µL)	DPPH (µL)	Volumen total (µL)	Absorbancia			
						E1	E2	E3	PROMEDIO
1	0	0	2250	750	3				0.8827
2	1	120	2130	750	3				0.7866
3	2	240	2010	750	3				0.6773
4	3	360	1890	750	3				0.5729
5	4	480	1770	750	3				0.4752
6	5	600	1650	750	3				0.369

**E: estándar*

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Evaluación de la muestra

fecha: / /

Muestra:

Absorbancia referencia:

N°	Concentración (µg/mL)	Volumen (µL)	ETOH (µL)	DPPH (µL)	Volumen total (µL)	Absorbancia			
						M__1	M__2	M__3	PROMEDIO
1									
2									
3									
4									
5									

**M: muestra*

% INHIBICION DEL DPPH

N°	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	% INHIBICIÓN			
		M1	M2	M3	PROMEDIO
1					
2					
3					
4					
5					

**M: Muestra*

Anexo N°3: Ficha de recolección de datos de la cuantificación de polifenoles

Curva de calibración con Ácido Gálico *fecha:* / /

Concentración:

N°	Concentración (µg/mL)	Volumen (µL)	FOLIN C. µL	NA2CO3 µL	H2O µL	VOLUMEN TOTAL µL	Absorbancia			
							E1	E2	E3	PROMEDIO
1										
2										
3										
4										
5										

*E: estándar

Cuantificación de polifenoles *fecha:* / /

Concentración:

N°	Volumen (µL)	FOLIN C. µL	NA2CO3 µL	H2O µL	VOLUMEN TOTAL µL	Absorbancia			
						M1	M2	M3	PROMEDIO
1									
2									

*M: Muestra

1:.....

2:.....

Cuantificación de polifenoles *fecha:* / /

Concentración:


N°	Volumen (µL)	FOLIN C. µL	NA2CO3 µL	H2O µL	VOLUMEN TOTAL µL	Absorbancia			
						M1	M2	M3	PROMEDIO
1									
2									

*M: Muestra

1:.....

2:.....

Anexo N°4: cuantificación de polifenoles



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS
 LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA - Pabellón de Control de Calidad
 Av. De la Cultura 732 CUSCO-PERU Contacto: 973868833

RESULTADOS

Cusco, 21 de Octubre del 2019


Solicitantes : UNSAAC
 Tipo de Análisis : Determinación de compuestos Fenólicos Totales
 Metodo : Folin Ciocalteu
 Tipo de Muestras : Extractos Etanolicos al 70% de Bayas de Sauco
 Cantidad de Muestra : 2 placas Petri conteniendo aprox. 2gr de cada uno
 Almacenamiento : 4 °C.

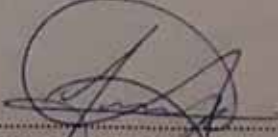
Condiciones de Análisis por Espectrofotometro
 Equipo : Espectrofotometro Genesis 20 Thermo Electron
 Longitud de Onda : 765 nm
 Celda de Lectura : Cubetas de Vidrio de 1cm
 Ecuacion de la curva patrón : $y = 0.0361 x - 0.0031$, $R^2 = 0.9996$

Muestra	1	2	3	FQ-Ac. Galico mg/g Extracto
Extracto Etanólico	40.75	40.85	41.06	40.89
Extracto Acuoso	25.73	25.84	26.47	26.01

Nota: Los resultados obtenidos fue realizado por triplicado, la cuantificación se basó utilizando un estándar Acido Galico, expresa los miligramos en equivalentes de Acido galico que están presente en 1 g de extracto etanólico al 70%. La metodología utilizada es de acuerdo a:

1. Vernon L.Singleton, Rudolf Orthofer, Rosa M. Lamuela-Raventós 1999 Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent Methods in Enzymology Volume 299, 1999, Pages 152-178
2. Pugliese A.G, Francisco A. Tomas-Barberan, Pilar Truchado, Maria I. Genovese, Flavonoids, Proanthocyanidins, Vitamin C, and Antioxidant Activity of Theobroma grandiflorum (Cupuassu) Pulp and Seeds J Agric Food Chem. 2013 Mar 20;61(11):2720-8. doi: 10.1021/jf304349u. Epub 2013 Mar 6.
3. Huang, R. T., Lu, Y. F., Inbaraj, B. S., & Chen, B. H. (2015). Determination of phenolic acids and flavonoids in Rhinacanthus nasutus (L.) kurz by high-performance-liquid-chromatography with photodiode-array detection and tandem mass spectrometry. Journal of Functional Foods, 12, 498-508. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.002>





Guim Jorge Choquenanda Pari
 Analista del Laboratorio de Cromatografía y
 Espectrometría - UNSAAC
 CCP - B14

Anexo N°5 Ficha de recolección de datos de la cuantificación de antocianinas

Cuantificación de Antocianinas *fecha:* / /

Concentración:


N°	Volumen (µL)	KCL PH 1			Volumen (µL)			KCL PH 4.5			Volumen (µL)		
		520 nm			700 nm			520 nm			700 nm		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1													
2													

*E: estándar

1:.....

2:.....

Anexo N°6: Cuantificación de antocianinas



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS
 LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA - Pabellón de Control de Calidad
 Av. De la Cultura 732 CUSCO-PERU Contacto: 973848853

RESULTADOS


Cusco, 29 de Octubre del 2019


Solicitante	: UNSAAC
Tipo de Análisis	: Cuantificación de Antocianinas Totales
Metodo	: pH Diferencial.
Tipo de Muestras	: Extracto Etanólico al 70% y Acuoso de Bayas de Sauco
Cantidad de Muestra	: 2 placas Petri conteniendo aprox. 2gr de cada una
Almacenamiento	: 4 °C
Condiciones de Análisis por Espectrofotometro	: Espectrofotometro Genesis 20 Thermo Electron
Equipo	: Espectrofotometro Genesis 20 Thermo Electron
Longitud de Onda	: 520 y 700 nm
Celda de Lectura	: Cubetas de Vidrio de 1cm.
pH-Metro	: HANNA EDGE® HI2020

Muestra	Repeticiones			Promedio
	1	2	3	EQ-Cya-3G mg 100gr
Extracto Etanólico	2364.06	2397.12	2380.59	2380.59
Extracto Acuoso	2149.15	2066.49	2066.49	2094.04

Nota: Los resultados obtenidos en la Cuantificación de Antocianinas Totales fue realizado por Triplicado. El metodo se basa en la transformación estructural de las antocianinas que ocurre con un cambio en el pH a pH 1.0 y 4.5, a 520 y 700 nm, expresa la cantidad de antocianinas en miligramos como equivalentes de Cianidina-3-glucósido presentes en 100 gramos de muestra húmeda.

- Association of Analytical Communities INTERNATIONAL Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines. pH Differential Method AOAC Official Method 2005.02.





Quim. Jorge Choquentina Pari
 Analista del Laboratorio de Cromatografía y
 Espectrometría - UNSAAC
 COP - 914

ANEXO N°7: Protocolo de control de calidad de gomitas masticables

PROTOCOLO DE ANALISIS DE GOMITAS

Fecha de elaboración: noviembre 2019	Versión: 01	Página: 1/1
--------------------------------------	-------------	-------------

I. DATOS GENERALES

LOTE		FECHA DE INGRESO	
FECHA DE PRODUCCIÓN		FECHA DE ANÁLISIS	
OBSERVACIONES			

II. ENSAYOS ORGANOLEPTICOS

PARAMETRO	ESPECIFICACIONES	CONFORME/ NO CONFORME
Olor	Dulce y frutal, similar al sauco	
Color	Morado intenso similar a las bayas maduras de sauco.	
sabor	Agridulce, frutal, similar al sauco.	
Textura o consistencia	Suave y elástico, no pegajoso.	

*Adaptado de la NTP.

III. ENSAYOS FISICOQUIMICOS

PARAMETRO	ESPECIFICACIONES	CONFORME/ NO CONFORME
Grados brix	78 – 80 brix	
Peso	6 gr. (2 / 10 pueden diferir +/- 0.3 gr.)	
Materia extraña	Sin presencia de partículas extrañas	
PH	3.3 – 3.5	

*USP NF- 34, NTP.

IV. ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

PARAMETRO	ESPECIFICACIONES	CONFORME/ NO CONFORME
Aerobios mesofilos	< 10 ³ ufc/g	
moho	<3 x 10 ² ufc/g.	

* RM615-2003.

CONFORME

NO CONFORME

.....
Jefe de control de calidad

Elaborado por: Bach. Catherin Lizvet
Sancho H.

Revisado por: QF. Karina Vera
Ferchau

Aprobado por: QF. Karina Vera
Ferchau

ENSAYOS ORGANOLEPTICOS

PARAMETRO	ESPECIFICACIONES	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ETANOLICO
Olor	Dulce y frutal, similar al sauco	Conforme	se percibe etanol y fermento
Color	Morado intenso similar a las bayas maduras de sauco.	Conforme	conforme
sabor	Agridulce, frutal, similar al sauco.	Conforme	frutal y amargo
Textura o consistencia	Suave y elástico, no pegajoso.	Conforme	conforme

ENSAYOS FISICOQUIMICOS

PARAMETRO	ESPECIFICACIONES	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ETANOLICO
Grados brix	78 – 80 brix	CONFORME	CONFORME
Peso	6 gr. (2 / 10 pueden diferir +/- 5% del promedio.)	CONFORME	CONFORME
Materia extraña	Sin presencia de partículas extrañas	CONFORME	CONFORME
PH	3.3 – 3.5	CONFORME	CONFORME


ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

PARAMETRO	ESPECIFICACIONES	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ETANOLICO
Aerobios mesofilos	$< 10^3$ ufc/g	CONFORME	CONFORME
moho	$< 3 \times 10^2$ ufc/g.	CONFORME	CONFORME

PESOS DE LAS GOMITAS		
N°	EXTRACTO ACUOSO (gr)	EXTRACTO ETANOLICO (gr)
1	6.01	6.02
2	6.06	5.98
3	5.86	6.05
4	6.1	6.03
5	6.03	6.21
6	6.09	6.03
7	6.2	6
8	6.08	6.2
9	6.09	6.3
10	6.21	6.07
PROM	6.073	6.089
5%	0.30365	0.30445
rango	5.70 - 6.30	5.70 - 6.30

ANEXO N°8: Análisis microbiológicos de gomitas masticables

Laboratorio Louis Pasteur S.R.Ltda.
Urb. Velasco Astete D-18-B
Wanchaq - Cusco
Telefax: 084-234727
Celular: 975 713500 - 974787151
laboratoriolouispasteur@yahoo.es
www.lablouispasteur.pe


LABORATORIO LOUIS PASTEUR

INFORME DE ENSAYO
LLP-4552-2019
SO-1563-2019

Pág 1 de 1

INFORMACIÓN DEL CLIENTE
Solicitante: UNSAAC
Dirección Legal: Av. La Cultura N°733 - Cusco

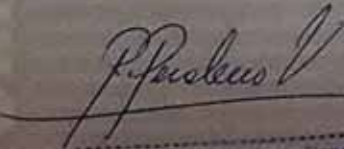

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA
Nombre del Producto: Gomitas masticables de sauco
Fecha de Ingreso de Muestra: 2019/12/05
Fecha de Ensayo: 2019/12/05

INFORMACIÓN DE LA MUESTRA Y REPORTE DE RESULTADOS
Toma de muestra realizada por: Srta. Catherin Lizvet Sandro Huanca
Fecha de Toma de Muestra: 2019/12/05
Procedencia de la Muestra: Laboratorio institucional de UNSAAC
Cantidad y Descripción de la Muestra: 01 frasco de polietileno sellado de 100g
Fecha de Emisión de Informe de Ensayo: 2019/12/10

RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

Ensayo(s)	Unidad	Resultado(s)
Numeración de aerobios mesófilos recuento en placa estimado	ufc/g	15
Numeración de Mohos recuento en placa estimado	ufc/g	<10
Numeración de Levaduras Recuento en placa estimado	ufc/g	<10

Métodos de Referencia:
Numeración de Aerobios mesófilos ACAC 990.12.21st Ed. Chapter 17 Subchapter 2- 17.2.07. (2019)
Numeración de Mohos y Levaduras ACAC 992.09.23rd Ed. Chapter 17 Subchapter 2- 17.2.09. (2019)



Dr. Luis Pacheco Venero
CSP, N° 15

ANEXO N°9: ficha de recolección de datos para la cuantificación de MDA

CURVA DE CALIBRACION DEL TEP

N°	CONCENTRACION (µg/mL)	VOLUMEN TEP (µL)	BHT (µL)	FECL3 6H2O (µL)	BUFER (µL)	TBA (µL)	5°C	90- 100 °C	BAÑO DE HIELO	BUTIL – PIRIDINA (µL)	H2O (µL)	VOLUMEN TOTAL (µL)
1	0	0	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	800	6500
2	0.64	50	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	750	6500
3	1.28	100	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	700	6500
4	2.56	200	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	600	6500
5	5.13	400	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	400	6500
6	10.27	800	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	0	6500

EVALUACION DE LAS MUESTRAS

N°	VOLUMEN DE SUERO (µL)	BHT (µL)	FECL3 6H2O (µL)	BUFER (µL)	TBA (µL)	5°C	90-100 °C	BAÑO DE HIELO	BUTIL – PIRIDINA (µL)	H2O (µL)	VOLUMEN TOTAL (µL)
1	100	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	700	6500
2	100	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	700	6500
N	100	100	100	1500	1500	60 MIN	60 MIN	5 MIN	2500	700	6500

**ANEXO N°10: Certificado sanitario de los animales de experimentación
(ratones)**



**UNIVERSIDAD ANDINA DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
LABORATORIOS DE CIENCIAS BÁSICAS**



"Año de la Lucha contra la Corrupción y la Impunidad"

CERTIFICADO

Cusco, 22 de noviembre del 2019

Mediante la presente se certifica que los 25 ratones de la cepa balb/c (21 machos y 4 hembras), con un rango de peso aproximado de 25 a 30 gramos, adquiridas el 22 de noviembre de 2019 por la Bach. Catherin Lizvet Sancho Huanca, están en perfecto estado sanitario y fisiológico, para ser utilizada en cualquier protocolo Biomédico.

Atentamente;

MVZ Christian Roberto Pitot Alvarez
Responsable del Bioterio Automatizado
C.M.V.P. 5895

ANEXO N°11: Certificado de incineración de los animales de experimentación

Crematorio de mascotas "Fiel Amigo"



CERTIFICADO DE CREMACIÓN

NUMERO...80.....

El crematorio de mascotas "Fiel Amigo"; Certifica mediante este documento que las cenizas del (a) DOROTOS..... cuyo nombre en vida fue X X.....
Fueron depositados en una urna sellada, en la ciudad del Cusco, departamento del Cusco, País Perú, el día 11..... del mes 12..... del año 2017.

Asumiendo la responsabilidad de la cremación el(la) Sr.(a) Catherin Lizet Sandoval Huanca.....


CREMATORIO DE MASCOTAS "Fiel Amigo"
ing° Rubén Pinto Cardenas
GERENTE

GERENTE GENERAL
CREMATORIO DE MASCOTAS FIEL AMIGO

Crematorio de mascotas "Fiel Amigo"

Crematorio de mascotas "Fiel Amigo"

Crematorio de mascotas "Fiel Amigo"

ANEXO N°12: Registro de aspectos de bioética en el uso de animales de experimentación, durante los días de estudio

PARAMETRO	OBSERVACIÓN DE PÁRAMETROS QUE PODRIAN AFECTAR AL NORMAL DESENVOLVIMIENTO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION																							
	GRUPO 1						GRUPO 2						GRUPO 3						GRUPO 4					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
ESTADO ANIMICO	1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	7	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	10	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	13	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	14	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	
INGESTA DE AGUA	17	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X		
	1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
	4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
	7	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
	10	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
	13	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		

INGESTA DE ALIMENTO

14	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
17	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
10	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
13	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
14	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
17	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
10	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
13	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
14	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
17	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X

PRESENCIA DE MICCIONES

EVACUACIONES

1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
10	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
13	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
14	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
17	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X

Fuente: Elaboración propia

ANEXO N°13: Galería fotográfica

Fotografía N° 1



Extracto etanólico rota evaporando en el rota evaporador IKA HB 10

Fotografía N° 2



muestras de extracto acuoso y etanólico seco

Fotografía N°3



Actividad antioxidante in vitro con DPPH

Fotografía N°4



Elaboración de las gomitas masticables.

Fotografía N°5



Actividad antioxidante de las gomitas masticables

Fotografía N° 6



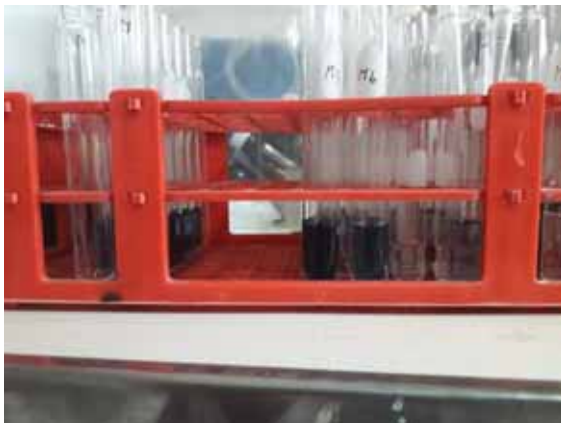
determinación de MDA en tejido hepático

Fotografía N° 7



Crio concentración del extracto acuoso de saúco

Fotografía N° 8



Determinación de polifenoles totales por el método de Folin Cicocalteau.

Fotografía N° 9



Preparación del buffer para la determinación de MDA.

Fotografía N° 10



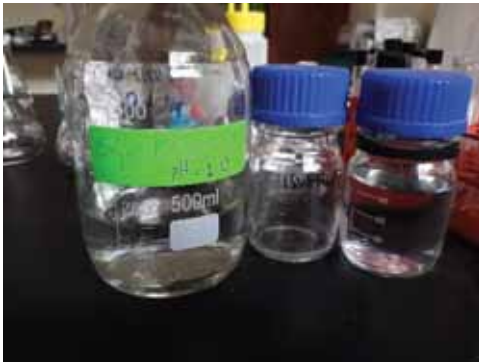
Determinación de la actividad antioxidante in vitro de ambas gomitas (etanólica y acuosa)

Fotografía N° 11



Reactivos para la determinación de MDA

Fotografía N° 12



Reactivos para la cuantificación de antocianinas

Fotografía N° 13



Ratones albinos de la raza *Mus musculus – balb/c C57*

Fotografía N° 14



Dosificación de los tratamientos (patrón silimarina- gomitas masticables)

Fotografía N° 15



Preparación de la solución de gomitas para el tratamiento a los ratones

Fotografía N° 16



Dosificación de pentobarbital para los ratones.

Fotografía N° 17



Preparación de los ratones antes de extraer el tejido hepático.

Fotografía N° 18



Proceso de extracción del tejido hepático.

Fotografía N° 19



Recepción del tejido hepático en baño de hielo y solución salina.

Fotografía N° 20



Homogenizado del tejido hepático en baño de hielo y solución salina.

Fotografía N° 21



Ebullición de las muestras para determinación de MDA.

Fotografía N° 22



Baño de hielo de las muestras para determinación de MDA.