

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

ESTUDIO DEL EXTRACTO ACUOSO DEL MESOCARPIO DE *Cucurbita ficifolia* B. (CALABAZA) Y SU EFECTO ANTIOXIDANTE EN LA LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA POR PARACETAMOL EN HÍGADO DE RATAS HOLTZMAN

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico y
Bioquímico

Tesistas

Bachiller: Vásquez Vásquez, Santiago Sebastián

Bachiller: Leon Quispe, Sara Noemí

Asesora

Dra. Britt Alvarado Chávez.

Lima – Perú

2019

DEDICATORIA

A Dios, por darme la vida, porque es él quien ilumina mis pasos, me brinda su protección todos los días y las fuerzas necesarias para seguir avanzando con mis objetivos trazados y así cumplir mis metas.

A mis padres, Donato y Justa, por el apoyo incondicional que me brindaron en el transcurso de toda mi carrera profesional y por ser mis mayores motivos para ser mejor cada día.

A mis hermanos, por todo el apoyo que recibí de cada uno de ustedes.

Sara Noemí

A Dios y a mis padres que siempre lucharon y me apoyaron incondicionalmente.

A mis hermanos, esposa e hijos y familiares que siempre estuvieron ahí en los momentos más difíciles, a pesar del dolor y sufrimiento por la pérdida de mi madre; sin embargo, tengo esa luz de su espíritu que guía mi camino por el resto de mi vida.

Santiago Sebastián

AGRADECIMIENTO

A mi Alma Mater, la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, formadora de grandes ideas y valores, por habernos aceptado ser parte de ella y por darnos la oportunidad para desarrollar nuestras capacidades y habilidades, adquirir nuevos conocimientos, y formarnos profesionalmente.

A nuestra asesora de tesis, Dra. Britt Alvarado Chávez, por su valiosa orientación, paciencia y compromiso para elaborar y hacer posible la culminación de la presente investigación.

A nuestros amigos y colegas, por brindarnos su amistad, y por acompañarnos durante toda la carrera profesional, muchas gracias. Dios les bendiga para siempre.

Sara Noemí y Santiago Sebastián

ABREVIATURAS

- ACP: Fosfatasa ácida
- ALP: Fosfatasa alcalina
- ALT: Alanina aminotransferasa
- AST: Aspartato transaminasa
- CE50: Concentración efectiva 50%
- DAA: Días después de la antesis
- DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- FDA: Administración de alimentos y medicamentos
- GOT: Glutamato-oxalacetato transaminasa
- GPT: Glutamato piruvato transaminasa
- GSH: Glutación reducido
- HDL: Lipoproteínas de alta densidad
- HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia
- LDL: Lipoproteínas de baja densidad
- LPO: Peroxidación lipídica
- RMN: Resonancia magnética nuclear
- SOD: Superóxido dismutasa
- TBARS: Ácido tiobarbitúrico

ÍNDICE

Acta de sustentación	
Dedicatoria	
Agradecimiento	
Abreviaturas	
Índice de figuras	
Índice de tablas	
Resumen	
Abstract	
Introducción.....	1
CAPÍTULO I :PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
1.1 Descripción de la realidad problemática	2
1.2 Problemas	3
1.2.1 Problema general.....	3
1.2.2 Problemas específicos.....	4
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivos específicos	4
1.4 Justificación.....	5
1.5 Limitaciones metodológicas	6
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	7
2.1 Estado del arte.....	7
2.1.1 Antecedentes nacionales.....	7
2.1.2 Antecedentes extranjeros	9
2.2 Bases teóricas.....	14
2.2.1 <i>Cucurbita ficifolia</i> B.....	14

2.2.1.1 Clasificación taxonómica	14
2.2.1.2 Morfología.....	14
2.2.1.3 Distribución geográfica	16
2.2.1.4 Composición nutricional.....	17
2.2.1.5 Nombres comunes.....	17
2.2.1.6 Usos de <i>Cucurbita ficifolia</i> B. en la medicina tradicional.....	18
2.2.2 Estrés oxidativo.....	18
2.2.2.1 Radicales libres (RL).....	19
2.2.2.2 Sistema Antioxidante Celular	23
2.2.3 Hígado.....	25
2.2.3.1 Anatomía hepática	25
2.2.3.2 Fisiología hepática.....	26
2.2.3.3 Funciones metabólicas del hígado.....	27
2.2.4 Hepatotoxicidad inducida por fármacos	28
2.2.4.1 Metabolismo hepático de las drogas.....	28
2.2.4.2 Clasificación de Hepatotoxicidad	30
2.2.4.3 Compuestos Hepatotóxicos	31
2.2.5 Paracetamol	33
2.2.5.1 Contraindicaciones del paracetamol	33
2.2.5.2 Efectos secundarios	33
2.2.5.3 Trastornos histopatológicos por paracetamol	33
2.2.6 Silimarina	34
2.2.6.1 Propiedades	34
2.2.6.2 Usos	34
2.3 Hipótesis	35
2.3.1 Hipótesis general	35
2.3.2 Hipótesis específicas	35
2.4 Definición de términos básicos	36

CAPÍTULO III : METODOLOGÍA	38
3.1 Tipo y Diseño de investigación.....	38
3.2 Población y muestra.....	38
3.3 Instrumento de recolección de datos	39
3.4 Procesamiento de datos	40
3.5 Equipo, materiales y reactivos	40
3.6 Procedimiento experimental	42
CAPÍTULO IV : RESULTADOS	55
4.1 Presentación	55
4.1.1 Resultados de la prueba de solubilidad	55
4.1.2 Resultados del screening fitoquímico	56
4.1.3 Resultados de la prueba cromatografica en capa fina	58
4.1.4 Resultados del ensayo farmacológico	58
4.1.4.1 Condiciones ambientales:	58
4.1.4.2 Determinación de la toxicidad aguda oral- Método de clases (DL ₅₀):	58
4.1.4.3 Determinación de la peroxidación lipídica (Tbars):	59
4.2 Contrastación de hipótesis.....	60
4.3 Discusión	62
CAPÍTULO V : CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	64
5.1 Conclusiones	64
5.2 Recomendaciones	65
REFERENCIAS.....	66
ANEXOS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1:	Morfología de <i>Cucurbita ficifolia</i> B.	15
Figura N° 2:	Distribución geográfica de <i>Cucurbita ficifolia</i> B.	16
Figura N° 3:	Resumen de la interrelación entre las principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno con los sistemas de defensa antioxidante.	19
Figura N°4:	Vista anterior y posterior de la anatomía hepática.	26
Figura N°5:	Esquema de la fisiología hepática.	27
Figura N° 6:	Diagrama del metabolismo hepática de fase I y II.	30
Figura N° 7:	Diagrama de flujo global del procedimiento experimental de <i>Cucurbita ficifolia</i> B. (calabaza)	53
Figura N° 8:	Porcentaje del efecto antioxidante en la Lipoperoxidación del extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B.inducida al daño hepático por paracetamol en ratas Holtzman.	61
Figura N°9:	Extracción Acuosa del mesocarpio de la Calabaza.	78
Figura N°10:	Marcha Fitoquímica del mesocarpio de la Calabaza.	79
Figura N°11:	Prueba de Cromatografía en Capa Fina alcaloides y flavonoides.	80
Figura N°12:	Cromatografía en Capa Fina y la observación de las manchas.	81
Figura N°13:	Intoxicación hepática con Paracetamol y la administración de los tratamientos.	81
Figura N°14:	Determinación de TBARS en homogenizado de hígado de ratas.	82
Figura N°15	Cuantificación de antioxidante de la calabaza en espectrofotometría	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1:	Composición nutricional de la calabaza.	17
Tabla N° 2:	Nombres comunes de <i>Cucurbita ficifolia</i> B.	17
Tabla N° 3:	Especies reactivas de oxígeno, cloro y nitrógeno.	20
Tabla N° 4:	Principales factores externos que incrementan la producción de ERO.	23
Tabla N° 5:	Fármacos que producen hepatotoxicidad.	32
Tabla N° 6:	Operacionalización de variables e indicadores.	35
Tabla N° 7:	Screening fitoquímico de la <i>Cucurbita ficifolia</i> B. (calabaza)	47
Tabla N° 8:	Tratamientos de experimentación con <i>Cucurbita ficifolia</i> B.	50
Tabla N° 9:	Distribución de los animales de experimentación.	51
Tabla N°10:	Prueba de solubilidad del extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B.	55
Tabla N°11:	Identificación de los metabolitos primarios del extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B.	56

Tabla N°12:	Identificación de los metabolitos secundarios del extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia B.</i>	57
Tabla N°13:	Resultados de la Toxicidad aguda oral.	58
Tabla N°14:	Concentración de malonaldehido en la Lipoperoxidación inducida con paracetamol a las concentraciones de 250 mg/kg, 500 mg/kg y 1000 mg/kg del extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia B.</i> en homogenizado hepático de rata Holtzman.	59
Tabla N°15:	Valores promedio de malonaldehido (MDA) producido por la Lipoperoxidación en el hígado de ratas Holtzman según grupo de trabajo.	59
Tabla N°16:	Resultados obtenidos del análisis de varianza (ANOVA).	60
Tabla N° 17:	Resultados de la prueba de Tukey	61

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar si el extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza), posee efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman. El tamizaje fitoquímico se realizó por el método de Olga y se evidenció la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, taninos y flavonoides. El efecto antioxidante realizada *in vivo* a partir del extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia*** B., mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico, midiendo la cantidad de malonaldehído (MDA) formado, con el propósito de determinar la peroxidación lipídica en un homogenizado de tejido hepático de ratas Holtzman. Se trabajó con diferentes concentraciones; grupo I sin tratamiento; grupo II con paracetamol sin tratamiento, grupo III con silimarina en dosis de 40 mg/kg; en los siguientes se realizó el tratamiento con el extracto acuoso estudiado de ***Cucurbita ficifolia*** B.; grupo IV a dosis de 250 mg/kg; grupo V a dosis de 500 mg/kg; grupo VI a dosis de 1000 mg/kg. El acceso al agua y alimento fue ad libitum. Al realizar la prueba estadística ANOVA se evidenció una diferencia altamente significativa ($P < 0.05$) y en la prueba de Tukey se observó un efecto antioxidante en la dosis de 500 mg/kg y 1000 mg/kg, pero se dio un porcentaje mayor de efectividad en la dosis de 1000 mg/kg (82.70 por ciento) de efecto antioxidante en la lipoperoxidación del extracto de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza). Se concluyó que el estudio ha demostrado que ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza), posee efecto antioxidante e indirectamente también, efecto hepatoprotector *in vivo* utilizando el extracto acuoso del mesocarpio.

Palabras clave: ***Cucurbita ficifolia*** B., efecto antioxidante, peroxidación lipídica, paracetamol.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine if the aqueous extract of the mesocarp of ***Cucurbita ficifolia*** B. (pumpkin), has an antioxidant effect in the lipoperoxidation induced by paracetamol in the liver of Holtzman rats. The phytochemical screening was performed by Olga's method, and the presence of secondary metabolites such as alkaloids, tannins and flavonoids was evidenced. The antioxidant effect carried out in vivo from the aqueous extract of the mesocarp of ***Cucurbita ficifolia*** B., by means of the thiobarbituric acid reaction, measuring the amount of malonal malignant aldehyde (MDA) formed, with the purpose of determining the lipid peroxidation in a homogenate of liver tissue of Holtzman rats. We worked with different concentrations; group I without treatment; group II with paracetamol without treatment, group III with silymarin at a dose of 40 mg/kg; in the following the treatment was carried out with the studied aqueous extract of ***Cucurbita ficifolia*** B.; group IV at a dose of 250 mg/kg; group V at a dose of 500 mg/kg; Group VI at a dose of 1000 mg/kg. Access to water and food was ad libitum. When performing the ANOVA statistical test a highly significant difference was evidenced ($P < 0.05$) and in the Tukey test an antioxidant effect was observed in the dose of 500 mg/kg and 1000 mg/kg but a higher percentage of effectiveness was found in the dose of 1000 mg/kg (82.70 percent) of antioxidant effect in the lipoperoxidation of the extract of ***Cucurbita ficifolia*** B. (pumpkin). It was concluded that the study has shown that ***Cucurbita ficifolia*** B. (pumpkin), has an antioxidant effect and indirectly also, a hepatoprotective effect in vivo using the aqueous extract of the mesocarp.

Key words: ***Cucurbita ficifolia*** B., antioxidant effect, lipid peroxidation, paracetamol

INTRODUCCIÓN

En nuestro cuerpo, el principal órgano en donde sucede la mayor cantidad de reacciones de metabolización, es el hígado, convirtiéndolo en el principal órgano diana, donde se manifiestan las reacciones adversas medicamentosas (RAMs). La hepatotoxicidad es un daño a nivel hepático, que se produce debido a la disfunción de este órgano, como causa ante la exposición frecuente a fármacos u agentes no infecciosos. Las reacciones adversas que más preocupan son las que desencadenan condiciones incapacitantes, generar secuelas permanentes o que pueden terminar en la hospitalización del paciente. Aunque el número de fármacos relacionados con la hepatotoxicidad, son considerables, este se considera un RAMs poco frecuente. La incidencia en los principales principios activos varía entre 1 en 10 000 o 1 en 100 000 pacientes. Debido a estos resultados, se considera que la hepatotoxicidad, no sea detectada durante los análisis clínicos previos, realizados para la posterior salida al mercado del medicamento. Resulta complicado establecer la verdadera incidencia del problema debido al sub registro de los casos, dificultad en el diagnóstico, entre otras causas. Generalmente cuando se produce hepatotoxicidad, no existe un tratamiento o antídoto para revertirlo, ante la manifestación de este RAM, es recomendable suspender totalmente el tratamiento. El uso de N-acetilcisteína después de una sobredosis de paracetamol y de carnitina por vía intravenosa, para el daño mitocondrial inducido por valproato sódico, son algunas excepciones utilizadas como antídotos para prevenir toxicidad hepática. Según la FDA, la intoxicación por acetaminofén es la primera causa de insuficiencia hepática aguda en pacientes sin antecedentes de enfermedad hepática previa ⁽¹⁾. La hepatotoxicidad es una de las causas más frecuentes provocada por ingesta de fármacos, por este motivo en este trabajo se realiza un estudio con el extracto acuoso de ***Cucurbita ficifolia*** B, ya que es importante realizar este tipo de estudios, en torno al aprovechamiento de los metabolitos secundarios de dichas especies, y así ayudar a combatir a nuestro organismo el daño hepático producido por xenobióticos.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

En las últimas décadas, los antioxidantes van logrando importancia cada vez más, por el rol que juegan en la salud y en la prevención de enfermedades. Son conocidos por ayudar a nuestro cuerpo a combatir los radicales libres ⁽²⁾, ya que estos se han implicado en numerosos procesos patológicos como la enfermedad hepática, la cardiovascular y el cáncer ⁽³⁾. Lo cierto es que todos los seres vivos que consumen oxígeno, no solo para respirar, sino también para generar energía, producen la liberación de radicales libres ⁽⁴⁾. Un radical libre es aquel compuesto químico que tiene en su estructura uno o más electrones no apareados y que son altamente reactivos ⁽⁵⁾.

Sin embargo; nuestro organismo produce radicales libres en concentraciones moderadas para luchar contra bacterias y virus; empero, cuando estas concentraciones se elevan, pueden ocasionar dañar la mayoría de nuestras células y son notablemente peligrosas ⁽²⁾.

En nuestro organismo, los radicales libres son sintetizados como parte del metabolismo energético; su síntesis aumenta frente a diversas lesiones; por ejemplo, infecciones, ejercicios físicos extremos, alimentación desbalanceada, intoxicación por alimentos y contaminantes ambientales entre otros. El incremento de radicales libres por encima de las cantidades de sustancias antioxidantes, conlleva al estrés oxidativo, produciendo daño a nivel celular ⁽⁶⁾.

La incapacidad que tiene nuestro cuerpo para neutralizar los radicales libres, a los cuales nos exponemos de manera frecuente, nos obliga a recurrir a nutrientes que tengan como principal propiedad la neutralización de estos.

Los daños producidos por los radicales libres son controlados por nuestro organismo, a través de una amplia variedad de sustancias antioxidantes propias o endógenas (tales como enzimas antioxidantes, ceruloplasmina, albumina, glutatión, transferina, haptoglobulina, hemo pexina, ácido úrico, bilirrubina), y también de origen exógeno, como lo es la vitamina C y E, carotenoides, selenio y en el grupo de compuestos fenólicos, se encuentran los fenoles no carboxílicos, flavonoides y ácidos fenólicos, los cuales encontramos en nuestra dieta diaria ⁽⁷⁾.

El daño celular, producto de un exceso de radicales libres de oxígeno (Estrés oxidativo), se explica como una consecuencia, debido al desequilibrio en la membrana plasmática a través de la oxidación de los residuos de ácidos grasos de la doble capa fosfolipídica, esto se denomina Peroxidación lipídica ⁽⁶⁾.

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto antioxidante del fruto de ***Cucurbita ficifolia*** B., frente al sistema generador de radicales libres y validar el efecto de desintoxicación hepática inducida por paracetamol que es consumido por muchos pobladores para menguar sus dolencias.

1.2 Problemas

1.2.1 Problema general:

¿El extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) poseerá efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman?

1.2.2 Problemas específicos:

1. ¿El extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) presentará algunas clases de metabolitos secundarios?
2. ¿Cuál será la concentración óptima del extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) que posee efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman?
3. ¿Poseerá efecto antioxidante el extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman comparado con el fármaco silimarina?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general:

Determinar si el extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) posee efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman.

1.3.2 Objetivos específicos:

1. Identificar las clases de metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza).

2. Determinar la concentración óptima del extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) con efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman.
3. Comparar el efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman del extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) con el efecto del fármaco silimarina.

1.4 Justificación

La Química, denomina a los radicales libres como especies químicas, con carga o sin ella, que poseen en su estructura atómica un electrón impar (despareado) en el orbital externo, brindándole una configuración espacial inestable. Tienen una estructura birradicálica, además de ser muy reactivos, tienen una vida media corta, permitiéndole actuar cerca del sitio en que se forman y son difíciles de dosificar.

A nivel molecular, son pequeñas moléculas ubicuitarias y difusibles que se producen a través de diversos mecanismos bioquímicos, como la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, que producen lesiones a nivel celular (oxidativo), al momento de interactuar con las principales biomoléculas del organismo viviente. Además, con lo expuesto previamente, los radicales libres del oxígeno, cumplen funciones fisiológicas en el organismo, por ejemplo, estimulan la síntesis de colágeno y prostaglandinas, actúan durante la fagocitosis, activan enzimas de la membrana celular, modifican la biomembrana, reducen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, además de favorecer el quimiotaxismo.

Especies reactivas al oxígeno (EROS), es el término que abarca a los radicales libres y otras especies no radicálicas, que participan en reacciones que elevan a los agentes prooxidantes. Las principales especies reactivas del oxígeno o también llamadas, sustancias prooxidantes son: Radical hidroxilo (HO)[•]; Anión superóxido (O₂^{•-}); Peróxido

de hidrógeno (H_2O_2); Oxígeno singlete; Peróxido (ROO); Semiquinona; Óxido nítrico (NO) y Ozono (O_3).

La intoxicación hepática se produce por una prescripción común y automedicación de paracetamol.

La población a nivel mundial, asegura que el paracetamol es seguro, pero lo cierto es que, como cualquier otro fármaco, provoca graves daños a nivel hepático además de insuficiencia hepática aguda, si se consume en altas dosis. En los Estados Unidos es responsable de 2.600 hospitalizaciones, más de 56.000 visitas a urgencias y 450 muertes anualmente.

Solo en los Estados Unidos, la hepatotoxicidad, producida por medicamentos, es considerada como la primera causa de insuficiencia hepática aguda, esto se confirma con estadísticas publicadas por la FDA, las cuales aseguran que principalmente, el acetaminofén, es el principal responsable. ⁽⁸⁾

Debido al consumo masivo del paracetamol (Panadol) o en conjunto con otros medicamentos como por ejemplo: tramadol con paracetamol (zaldiar, trilat); diclofenaco con paracetamol (dolocordralan, doloquimagesico cr); naproxeno con paracetamol (dologesidol, febrax) y todos los antigripales en general. Los mismos que actúan como analgésico y antipirético y que causan daño hepático.

Por lo tanto, esta investigación comprueba el efecto antioxidante del fruto de ***Cucurbita ficifolia*** B., en ratas Holtzman con intoxicación hepática inducidas con paracetamol, el fármaco antes mencionado es muy consumido por la población desde muy temprana edad, por prescripción médica indiscriminada para diversas dolencias y afecciones en la salud. El fruto de la calabaza serviría como un antioxidante para prevenir las intoxicaciones hepáticas por ingestión del paracetamol.

1.5 Limitaciones metodológicas

Las limitaciones del presente estudio de investigación fue la dificultad de contar con un bioterio para mantener a nuestra población de ratas en óptimas condiciones, y así proporcionando la seguridad en los resultados.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Estado del arte

2.1.1 Antecedentes nacionales:

Caballero JA (2014) ⁽⁹⁾: evaluar el “efecto hepatoprotector de la almendra de semillas de *Cucurbita maxima* (zapallo macre) en ratas”. Se utilizaron en el estudio 48 ratas Holtzman machos adultos de 2 meses de edad, con peso de 225 ± 24.7 g. Además de las almendras de semillas de *Cucurbita maxima* (zapallo macre), las cuales se trituraron y suspendieron en agua destilada. Se distribuyeron de forma aleatoria seis grupos (n=8), los cuales se trataron, durante diez días, vía peroral: grupos I y II: suero fisiológico 10mL/kg; grupo III: silimarina 100mg/kg; grupo IV: 50mg/kg; grupo V: 300mg/kg y grupo VI: 800mg/kg de suspensión de almendra de semilla de *Cucurbita maxima*. Después de seis días de tratamiento, a los grupos II y IV, se les administró paracetamol a 400mg/kg vía peroral, hasta completar los días de tratamiento. Se determinó aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), proteínas totales, albúmina sérica, bilirrubina directa, indirecta y total; y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), en suero sanguíneo y este último también se evaluó en el homogenizado de hígado. Así como un estudio histopatológico para identificar necrosis Resultados: Se evidenció efecto hepatoprotector, a través de los indicadores enzimáticos (ALT y AST), albúmina, proteínas totales y TBAR. Resultados: Se evidenció efecto hepatoprotector, a través de los indicadores enzimáticos (ALT y AST), albúmina, proteínas totales y TBARS.

Histológicamente se observaron señales de necrosis, solo con la administración de paracetamol y con el grupo tratado con la suspensión de semillas se evidencio una restauración del daño hepático inducido por paracetamol.

Córdova M (2013) ⁽¹⁰⁾ : “determinación de parámetros adecuados para la elaboración de papilla a partir de la *Cucurbita ficifolia*”. En este trabajo se planteó como objetivos determinar los parámetros adecuados para la correcta elaboración de una papilla a partir de la zambumba; a través de un diagrama de flujo, la temperatura y tiempo adecuados para su obtención; además de los parámetros bromatológicos y microbiológicos, así como determinar su vida de anaquel. Se hizo uso de frutos frescos y maduros de zambumba provenientes de la ciudad de Ayabaca, luego de seleccionarlos, se lavaron, eliminando las impurezas y disminuyendo la posible carga microbiana, luego se pulpeó y concentró a distintas temperaturas y tiempos para deshidratarlo, de ahí se formuló la papilla, para inmediatamente refinarla y homogeneizarla, después fue tamizada y pasteurizada a 95 °C por 15 mm; en seguida se envasaron y sellaron los frascos a dicha temperatura y enfrió a temperatura ambiente, posteriormente para evaluar el producto se almacenó a condiciones ambientales. Luego se procedió a realizar los ensayos bromatológicos y microbiológicos correspondientes, así como las pruebas organolépticas. La secuencia de operaciones para la preparación de la papilla es concentrar la pulpa por espacio de 60 minutos a 80 °C, comprobándose que hasta los 90 días después de preparada, la papilla de zambumba físico-química y microbiológicamente es inocua al consumo.

Castillo E. et al (2010) ⁽¹¹⁾ : “estudio fitoquímico de *Plukenetia volubilis* L. y su efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por 3+Fe /ascorbato en hígado de *Rattus rattus* var. Albinus”. El presente estudio se realizó con el objetivo de reconocer los metabolitos secundarios presentes en *Plukenetia volubilis* L., y analizar su efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por 3+Fe /ascorbato en homogenizado de hígado de *Rattus rattus* var. Albinus. En el tamizaje fitoquímico se usó técnica de Olga Lock, para determinar cualitativamente los metabolitos secundarios. El efecto antioxidante se realizó *in vitro*, utilizando el extracto etanólico de *Plukenetia volubilis* L. a través de la reacción del ácido tiobarbitúrico, midiendo el malonaldialdehído (MDA)

formado, con el fin de determinar la peroxidación lipídica en un homogenizado de hígado de *Rattus rattus* var. Albinus. La prueba estadística “t” de datos apareados evidencio una diferencia muy significativa ($p < 0,001$) tanto para la dosis mínima (70 mg/mL) como para la dosis máxima (140 mg/mL), pero cuando fueron analizados ambos grupos en tratamiento no se encontró diferencia significativa ($p > 0,05$). Se evidencio la presencia de flavonoides, alcaloides, esteroides y taninos en el extracto etanólico de *Plukenetia volubilis* L., ejerciendo este un efecto antioxidante *in vitro*.

2.1.2 Antecedentes extranjeros:

Saket et al. (2018) ⁽¹²⁾: “efecto modulador de la inclusión en la dieta de las frutas *Aegle marmelos* contra el cisplatino - inducido Hepatotoxicidad en ratas Wistar”. En esta investigación fueron los animales divididos en cinco grupos diferentes; El grupo I recibió solo dietas basales, el grupo II se alimentó con dietas basales con *Aegle marmelos* en una concentración del 4 por ciento, mientras que el grupo III se alimentó con dietas basales coadministradas con cisplatino. A los grupos IV y V se les administraron dietas que contenían *Aegle marmelos* al 2 por ciento y 4 por ciento respectivamente, durante 27 días antes de la administración de Cisplatino. El cisplatino administrado a las ratas durante 3 días conduce a una reducción en las actividades de las enzimas antioxidantes como la peroxidación lipídica (LPO) y los sistemas antioxidantes endógenos como el glutatión (GSH), la catalasa y el superóxido dismutasa reducida (SOD) en el homogeneizado de hígado. Producir el deterioro de las funciones hepáticas. Resultados La administración de la parte de fruta de *Aegle marmelos* a ratas Wistar mostró una disminución significativa en la concentración elevada de peroxidación de lípidos, superóxido dismutasa, glutatión y concentración de catalasa, además, disminuyó el nivel sérico de alanina aminotransferasa (ALT), asinato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (ALP), fosfatasa ácida (ACP) y bilirrubina. Se concluyó que la actividad hepatoprotectora de *Aegle marmelos* se debió a su efecto antioxidante, como lo demuestra el aumento de la actividad de las enzimas

antioxidantes con función hepática mejorada y cambios significativos en los parámetros fisiológicos.

García J. (2017)⁽¹³⁾ : “caracterización química de *Cucurbita ficifolia* Bouché y su efecto hipoglucémico mediado por almacenamiento del glucógeno hepático”. Se fraccionó el extracto acuoso de *C. ficifolia* mediante cromatografía en columna abierta, en capa fina y por HPLC para purificar sus principales metabolitos secundarios y posteriormente se caracterizaron químicamente por RMN y CG-MS. El estudio farmacológico consistió en un estudio agudo en ratones de la cepa CD-1 sanos y diabéticos, una vez que se determinó que el extracto tenía actividad hipoglucemiante se realizó un estudio subcrónico usando ratones de la cepa CD-1 tanto sanos como diabéticos, inducidos con aloxana, a los cuales se les administró por 30 días el extracto acuoso y activo de *C. ficifolia*. El contenido de glucógeno hepático se cuantificó por un método espectrométrico, se realizó un análisis histológico del hígado usando una tinción de PAS y de H-E para hígado y páncreas; GOT y GPT se cuantificaron por un método espectrofotométrico; las enzimas glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa y el transportador de glucosa GLUT-2 se cuantificaron por Western blot; la expresión del RNAm de Glut-2 y el receptor de glucagón se determinaron por RT-PCR en tiempo real, mientras que los niveles de insulina sérica se cuantificaron por el método de ELISA. Por lo tanto, el extracto estudiado representa una terapia alternativa para los pacientes con DM con complicaciones hepáticas, ya que corrige la hiperglucemia y posee efectos protectores para el hígado y páncreas, así como propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias.

Barbosa L. (2015)⁽¹⁴⁾ : “compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en calabazas-gila (*Cucurbita ficifolia* Bouché)”. Esta investigación tuvo como objetivo la prospección y la cuantificación de compuestos bioactivos presentes en la calabaza-gila (cáscara, pulpa y semillas), comparándolos en sus diferentes estadios de maduración. Se cuantificaron los compuestos bioactivos, fenólicos totales, carotenoides totales y azúcares solubles totales, y la capacidad antioxidante in vitro mediante el uso método de captura de radicales DPPH. Se observó un alto contenido de compuestos fenólicos en la pulpa y cáscara del fruto a los 80 DAA (días después de la antesis), de 40,7 y 39,5 mg 100 g⁻¹, respectivamente. A las semillas, los fenólicos se encontraron más

concentrados a los 40 DAA (33,9 mg 100 g⁻¹). La pulpa y la cáscara de la calabaza madura presentó una mejor capacidad antioxidante (47,9 y 32,8 por ciento, respectivamente) y los valores de menor concentración eficiente CE50 (5,18 y 9,98 µg mL⁻¹, respectivamente). Las semillas presentaron mayor capacidad antioxidante a los 40 DAA (CE50: 8,2µg/mL⁻¹ y % CA: 38,1 por ciento). Se observó una baja cantidad de carotenoides en el fruto; Sin embargo, hubo un aumento del contenido de carotenoides totales en la corteza, la pulpa y las semillas a los 80 DAA, 0,0275; 0,0111 y 0,0075 mg 100 g⁻¹, respectivamente. El contenido de azúcares solubles totales fue mayor en pulpa madura (106,6 mg 100 g⁻¹); la cáscara y las semillas maduras presentaron cantidades de 95,1 y 95,4 mg 100 g⁻¹, respectivamente. La calabaza-gila presentó altas cantidades de compuestos fenólicos y una óptima capacidad antioxidante, indispensables en una dieta sana.

Fedekar F & Abdel-Daim (2013) ⁽¹⁵⁾ : “actividad hepatoprotectora y antioxidante de *Dunaliella salina* en toxicidad aguda inducida por paracetamol en ratas”. El alga verde, *Dunaliella salina*, se investigó por su actividad hepatoprotectora y antioxidante contra el daño hepático inducido por paracetamol en ratas. Las ratas Wistar albinas macho que recibieron una sobredosis de paracetamol mostraron daño hepático y estrés oxidativo, como lo indica un aumento significativo ($P < 0.05$) en los niveles séricos de aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, fosfatasa alcalina, bilirrubina total y directa, maldehidrato de aluminio, colesterol y óxido nítrico. Al mismo tiempo, hubo una disminución de las actividades de la superóxido dismutasa sérica y la capacidad antioxidante total en comparación con el grupo de control. El tratamiento con *D. salina*, extracto de metanol a dosis de 500 y 1000 mg / kg de peso corporal o silimarina podría disminuir significativamente ($P < 0.05$) las enzimas marcadoras de daño hepático, bilirrubina total y directa, malondialdehído, colesterol y niveles de óxido nítrico y aumentar las actividades. de la superóxido dismutasa y la capacidad antioxidante total en suero en comparación con el grupo intoxicado con paracetamol. La histopatología del hígado también mostró que *D. salina* redujo la necrosis centrilobular, la congestión y la infiltración de células inflamatorias provocada por una sobredosis de paracetamol. Estos resultados sugieren que *D. salina* muestra un potente efecto hepatoprotector en el daño hepático inducido por paracetamol en

ratas, lo que puede deberse tanto al aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes como a la inhibición de la peroxidación lipídica.

Salinas N. et al (2012) ⁽¹⁶⁾ : “efecto antioxidante de extracto de *Cucurbita ficifolia* Bouché relacionado con niveles de polifenoles”. Su objetivo fue evaluar el efecto antioxidante del extracto de *Cucurbita ficifolia*, en suero, hígado y riñón de ratones diabéticos. Se utilizó ratones machos de la cepa CD-1, induciéndoles diabetes con estreptozotocina 153.7 g/kg por vía intraperitoneal. Se formaron tres grupos: control sano, control diabético y diabético tratado con extracto *Cucurbita ficifolia* (0.2g/kg). Luego de 25 días de tratamientos, se evaluaron parámetros bioquímicos como; glucosa (ayuno y sin ayuno), triglicéridos, colesterol, creatinina, transaminasas hepáticas (GOT, GPT), así como los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidación de proteínas totales, polifenoles totales, y los polifenoles a través de HPLC. La administración de *Cucurbita ficifolia* a los ratones diabéticos produjo una disminución de la glucemia, no significativa, así como una reducción en la oxidación de proteínas séricas, también como una disminución en el consumo de alimento, líquidos y en la actividad GPT. En la valoración de los niveles de GSH reducido en hígado diabético presentó una mayor concentración 4.3 ng/ml vs 3.7 ng/ml de diabéticos administrados. Con respecto al contenido total de polifenoles del extracto, fue de 28 mg/L, la muestra contenía: epicatequina, ácido gálico, catequina, ácido vinílico y mircentina. Además, se realizó un estudio histopatológico que evidenció la protección de *Cucurbita ficifolia*, en los riñones e hígados de ratones diabéticos. Los resultados confirmaron los efectos hipoglucemiante y antioxidante del extracto de *Cucurbita ficifolia*.

Ventura L. (2012) ⁽¹⁷⁾ : “evaluación Fitoquímica e Hipoglucemiante de *Cucurbita ficifolia* y *Teucrium chamaedrys*”. Se realizó el tamizaje fitoquímico, para conocer los metabolitos secundarios, a través de pruebas colorimétricas, posterior a ello cuantificaron fenoles y flavonoides, además se midió la capacidad antioxidante usando el radical ABTS. Para medir el efecto hipoglucemiante se utilizó ratones con una masa corporal de entre 25 y 30 g. Con ellos se formaron cinco grupos de trabajo (n=5): control normoglucémico, control diabético, tratamiento con extracto hexánico de *Teucrium chamaedrys*, extracto cetónico de *Cucurbita ficifolia* y con tratamiento con

Glibenclamida, previamente a los últimos cuatro grupos se les indujo diabetes mediante la aplicación de estreptozotocina vía intraperitoneal. Se midieron sus niveles de glucosa antes de iniciar el tratamiento (día cero) y a los 30 días del mismo a través del glucómetro “Accu-Check Performa”. Posterior a esto, se determinaron los niveles de triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL y proteínas totales en suero usando reactivos de diagnóstico clínico. El tamizaje fitoquímico realizado a *Teucrium chamaedrys* dio positivo a taninos, flavonoides, cumarinas, quinonas y azúcares reductores, su contenido total de fenoles fue de 4.509mg de ácido cafeico/g de muestra seca y de flavonoides fue de 0.9 mg de rutina /g de muestra seca, mientras que *Cucurbita ficifolia* presenta metabolitos como alcaloides, sesquiterpenlactonas, glicósidos cardiacos, y compuestos fenólicos (taninos, flavonoides cumarinas y quinonas). Su contenido de fenoles totales es de 4.071mg de ácido cafeico/g de muestra y de flavonoides es de 2.097 mg de rutina/g de muestra. Se observó que ambas especies presentan efecto hipoglucemiante en ratones normoglucémicos y diabéticos a corto plazo. Ningún extracto mostró una disminución de glicemia significativa ($p < 0.05$) a largo plazo, debido a las bajas dosis administradas de los extractos, sin embargo son capaces de modificar parámetros lipídicos propios de la diabetes mellitus, ya que *Cucurbita ficifolia* disminuyó los niveles de triglicéridos y *T. chamaedrys* aumento los niveles de HDL significativamente.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 *Cucurbita ficifolia* B.

2.2.1.1 Clasificación taxonómica

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: DILLENIIDAE

ORDEN: VIOLALES

FAMILIA: CUCURBITACEAE

GÉNERO: *Cucurbita*

ESPECIE: *Cucurbita ficifolia* Bouché

NOMBRE COMÚN: Calabaza

Fuente: SIOVM, 2007 ⁽¹⁸⁾.

2.2.1.2 Morfología

La *Cucurbita ficifolia* B. (calabaza) es una planta trepadora o rastrera robusta, monoica y probablemente anual ya que son persistente durante un cierto período, dando la impresión de ser una especie perenne efímera, sin raíces de reserva hinchadas de varios metros ⁽¹⁹⁾. Tiene resistencia contra las bajas temperaturas, pero no a heladas severas ⁽²⁰⁾.

Su morfología es la siguiente:

Tallo. Son herbáceos, de contextura delgada a muy gruesa y aspecto leñoso, generalmente ramificados, angulosos, sulcados, ocasionalmente rollizos ⁽²⁰⁾, se encuentran cubierto de tricomas cortos y finos, y con algunos tricomas largos y algo rígidos ⁽²¹⁾.

Flores. Son pentámeras, axilares y solitarias. Las flores masculinas son largas y pediceladas, tienen un cáliz campanulado que es de 5 a 10 mm de largo y casi tan

ancho, sépalos lineales de 5 a 15 x 1 a 2 mm y una corola campanulada tubular que es bastante más ancha hacia la base, 6 a 12 cm de largo y amarillo a naranja pálido. Ellos tienen tres estambres. Las flores femeninas tienen pedúnculos robustos, de tres a cinco cm de largo, un ovario ovoide a elíptico, multilocular: sépalos que ocasionalmente son foliáceos y una corola que es algo más grande que la de las flores masculinas. Son de un estilo engrosado y tienen tres estigmas lobulados ⁽²⁰⁾.

Hojas. Son alternas, ovaladas a casi circulares, de hasta 25 cm de largo y de ancho, con base acorazonada; el margen ondulado-dentado, cubiertas de tricomas erguidos, sin manchas blancas, divididas en cinco lóbulos redondeados, puntiagudos, y dividido a su vez, en tres lóbulos; los pecíolos tienen 26 cm de largo, cubiertos de tricomas rizados; zarcillos robustos, divididos en tres a cuatro ramas ⁽²¹⁾.

Fruto. Es globoso, ovado, elíptico, a veces ligeramente comprimido, que miden aproximadamente hasta 35 cm de largo y 20 cm de ancho; tienen cáscara dura, con tres modelos de coloración: blanco-amarillento, verde oscuro, claro o con franjas blancas longitudinales hacia el ápice o con pequeñas manchas blancas y verdes; mesocarpo (pulpa) blanco, granuloso-fibroso, dulce, con placentas largas y delgadas; pedúnculo 5 - 8 cm largo, rígido, anguloso – sulcado ⁽²²⁾.



Figura N°1: Morfología de *Cucurbita ficifolia* B.

Fuente: Delgado, *et al.* Caracterización de frutas y semillas de algunas cucurbitáceas en el norte de Perú. Rev Fitotec Mex. 2014; 37(1):7-20.

2.2.1.3 Distribución geográfica

La ubicación precisa de la especie *Cucurbita ficifolia* B. es aún incierta. En el Perú se cultiva principalmente en los departamentos de Apurímac, Arequipa y Junín ⁽²²⁾.

Algunos autores proponen un posible punto de origen a centroamérica o el sur de México, debido a la prueba lingüística cuyo origen es mexicano, debido a que los nombres empleados tienen un origen náhuatl, dialecto de la región. No obstante se han encontrado evidencias arqueológicas en los Andes, favoreciendo a un posible origen sudamericano, pero esta hipótesis no ha podido ser corroborada por medio de estudios sistemáticos ⁽²⁰⁾⁽²³⁾.

El cultivo de esta planta se distribuye desde el norte de México hasta Chile y Argentina. Su expansión en Europa (Portugal y Francia, por ejemplo) y Asia (India) comenzó al parecer entre los siglos XVI y XVII, cuando sus frutos llegaron desde Sudamérica y la India. A partir de ahí su cultivo se expandió a diversos países europeos y orientales. (Francia, Alemania, Filipinas y Japón) ⁽²⁰⁾⁽²³⁾.



Figura N°2: Distribución geográfica de *Cucurbita ficifolia* B.

Fuente: Rodríguez L. 1999.

2.2.1.4 Composición nutricional

Tabla N°1: Composición nutricional de la calabaza.

Nutriente	Unidad	Valor por 100g
Agua	g	91,60
Energía	kcal	26,00
Energía	kJ	109,00
Proteína	g	1,00
Lípido	g	0,10
Minerales	g	0,80
Carbohidrato	g	6,50
Fibras	g	0,50
Azucares	g	2,76
Minerales		
Minerales	Unidad	Valor por 100 g
Calcio, Ca	mg	21,00
Hierro, Fe	mg	0,80
Magnesio, Mg	mg	12,00
Fosforo, P	mg	44,00
Potasio, K	mg	340,00
Sodio, Na	mg	1,00
Zinc, Zn	mg	0,32
Cobre, Cu	mg	0,13
Manganeso, Mn	mg	0,13

Fuente: USDA ,2014.

2.2.1.5 Nombres comunes

Entre los nombres comunes designados para *Cucurbita ficifolia* B. a nivel de América, están ⁽²⁵⁾:

Tabla N°2: Nombres comunes de *Cucurbita ficifolia* B.

Perú	Calabaza, Calabaza blanca.
Guatemala	Ayote-chilacayote, Chilacayote, Cidracoyote.
Bolivia	Blanca, Lacayota, Lacayute, Lacayo.
México	Chilaca, Chilacayota, Kán, Chilacayote.
Costa Rica	Chiverre.
Ecuador	Tambo, Zambo.
Venezuela	Zapallo o Zapayo.
Colombia	Auyama, Victoria, Vitoriera.

Fuente: CONABIO ⁽²⁵⁾.

2.2.1.6 Usos de *Cucurbita ficifolia* B. (calabaza) en la medicina tradicional

Con respecto a sus cualidades medicinales, se recomienda la decocción de la pulpa como refrigerante y contra los dolores de las entrañas, así como, contra las constipaciones. Nutricionalmente, es un alimento que tiene una regular cantidad de glúcidos o carbohidratos. Las vitaminas y minerales son bajas; y las semillas tienen un apreciable valor proteico ⁽²⁶⁾.

Este fruto también es conocido por sus propiedades hipoglicémicas que puede ayudar en el control de la diabetes mellitus. El jugo del fruto disminuye significativamente los niveles de glucosa sanguínea, según un estudio realizado en animales de laboratorio⁽²⁷⁾.

2.2.2 Estrés oxidativo

Nuestro cuerpo mantiene un equilibrio óxido-reducción constante, manteniendo este balance entre la producción de pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes. El desequilibrio de este conduce al estado conocido como estrés oxidativo, el cual tiene como principal característica el aumento en los niveles de radicales libres y especies reactivas, que causan daño a la célula, al no poder ser controladas por las defensas antioxidantes. Esto se manifiesta de manera frecuente en enfermedades degenerativas de tipo infecciosa, inmunológica e inflamatoria, etc. El desequilibrio de este balance, conlleva a diferentes grados de magnitud.

El estrés oxidativo produce daño reversible, como irreversible dependiendo de diversos factores como lo son el tiempo de duración, eficacia de las defensas antioxidantes, edad, estado de nutrición y factores genéticos que codifican sistemas antioxidantes ⁽²⁸⁾.

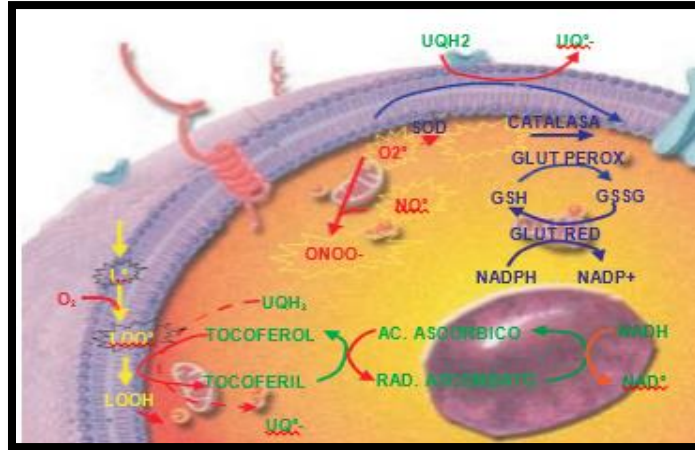


Figura N° 3: Resumen de la interrelación entre las principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno con los sistemas de defensa antioxidante.

Fuente: Dorado C; *et al.* 2003.

2.2.2.1 Radicales libres (RL)

Son moléculas que poseen en su estructura atómica un electrón desapareado (impar) en el orbital externo, teniendo como consecuencia alta inestabilidad generada por su configuración espacial, y es extraordinariamente reactivo y de vida efímera ⁽²⁹⁾.

El término especies reactivas se refiere a dos tipos de moléculas: los radicales libres y los no radicales. Ambos conjuntos de moléculas se forman como producto del metabolismo celular y son representados dentro de los sistemas biológicos por las especies reactivas de oxígeno (ROS) y por las especies reactivas de nitrógeno (RNS), originados en procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Cabe mencionar que existen especies reactivas procedentes de otros elementos químicos como lo son el bromo y cloro, aunque ROS y RNS son los dos únicos grandes grupos implicados dentro de la biología redox ⁽³⁰⁾.

Especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (ERNs o RNS)

Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno son moléculas muy reactivas, que se dividen en dos grupos: las de tipo radical libre y no radical. Los radicales libres son aquellas especies que tienen la capacidad de supervivencia, contienen uno o más electrones desapareados, capaces de neutralizarse entre sí y que, al reaccionar con

O₂, forman radicales tipo peroxilo. En el grupo de radicales libres encontramos: el superóxido (O₂⁻), considerado como el más abundante, resultado de la oxidación de moléculas orgánicas y de múltiples procesos metabólicos; el radical hidroxilo (OH), considerado como el más tóxico entre los radicales y proveniente de la reacción entre el radical superóxido con el peróxido de hidrógeno ⁽³¹⁾.

Las ERNs se originan principalmente en reacciones metabólicas, producidas en el citosol y como producto de la acción de diversas enzimas localizadas en las membranas celulares endoteliales de los vasos sanguíneo ⁽³²⁾. Tenemos el óxido nítrico (NO), que tiene un efecto tóxico, que se produce al combinarse con el radical superóxido y formar peroxinitrito (ONOO) que, por tratarse de una molécula no radical libre, es estable y causa, a largo plazo, un efecto tóxico.

Las moléculas de tipo no radical, además del peroxinitrito, también encontramos al peróxido de hidrógeno, considerado como el oxidante más estable de todos y reacciona a distancia de su lugar de producción. Por otra parte, es requerido para la perduración de la célula ⁽³¹⁾.

Tabla N°3: Especies reactivas de oxígeno, cloro y nitrógeno.

Radicales libres	No Radicales
Especies reactivas de oxígeno	Especies reactivas de oxígeno
<ul style="list-style-type: none"> •Superóxido: O₂⁻ •Hidroxilo: OH[•] •Hidroperoxilo: HO₂[•] •Carbonato: CO₃⁻ •Peroxilo: RO₂[•] •Alcoxi: RO[•] •Radical de dióxido de carbono: CO₂[•] •Oxígeno de orbital único 	<ul style="list-style-type: none"> •H₂O₂ •Ácido hipobromoso: HOBr^a •Ácido hipocloroso: HOCl^b •Ozono: O₃ •Oxígeno de orbital único: O₂⁻¹ •Peróxidos orgánicos: ROOH •Peroxinitrito: ONOO^{-d} •Peroxinitrato: O₂NOO^{-d} •Ácido peroxinitroso: ONOOH^d •Peroxomonocarbonato: HOOCO₂⁻²
Especies reactivas de cloro	Especies reactivas de cloro
<ul style="list-style-type: none"> •Átomo clorinado: Cl[•] 	<ul style="list-style-type: none"> •Ácido hipocloroso: HOCl^b •Nitrilo clorado: NO₂Cl^e •Dióxido clorinado: ClO₂ •Cloraminas
Especies reactivas de nitrógeno	Especies reactivas de nitrógeno
<ul style="list-style-type: none"> •Óxido nítrico •Dióxido de nitrógeno •Radical nitrato 	<ul style="list-style-type: none"> •Ácido nitroso •Cation nitrosilo •Anión nitroxi •Tetróxido dinitrogenado •Trióxido dinitrogenado •Peroxiacetil nitrato

Fuente: Haliwell B, 2006.

Fuentes de radicales libres

Fuentes endógenas

Mitocondria. La mitocondria es la principal fuente de radicales libres, debido que al producirse el metabolismo oxidativo produce como consecuencia, la reducción tetraelectrónica del oxígeno con un consumo del 95 al 98 por ciento de este elemento. El restante 2-5 por ciento de oxígeno tiene una tendencia de recibir un electrón por vez, reducción monoeléctrica, formando durante estas reacciones una serie de intermediarios tóxicos: especies reactivas de oxígeno. Cada mitocondria puede producir alrededor de 10-7M RL/día. No obstante, alteraciones dentro de la cadena de transporte de electrones pueden aumentar estos niveles en la mitocondria. Algunos autores, entre ellos Nicholls y Ferguson, sugieren que en el interior de esta organela, exactamente en los complejos I y III de la cadena respiratoria, es donde se forma el radical $O_2^{\cdot-}$. En medio de este proceso de transferencia de electrones la coenzima Q se oxida formando la ubisemiquinona, la cual es un radical intermediario que produce radicales superóxido, cuando entra en contacto con el oxígeno.

No obstante, la mitocondria tiene también la capacidad de producir otras especies reactivas como consecuencia de una reacción en cadena; en la cual se tiene como producto al óxido nítrico (NO^{\cdot}), mediante la acción de la enzima, óxido nítrico sintasa (NOS) calcio dependiente, que se ubica en la membrana mitocondrial. Este radical libre tiene un papel fisiológico, a través de la modulación de la velocidad del flujo de electrones en condiciones fisiológicas como la hipoxia.

Asimismo, se puede combinar con $O_2^{\cdot-}$ y dar origen al peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), el cual reacciona con las hemoproteínas, que inactivan a los complejos I y III de la cadena respiratoria, disminuyendo su capacidad de transportar electrones. Debido a esto, se acumulan los electrones en la cadena respiratoria produciendo, que en ciertos componentes mitocondriales, aumenten la producción de $O_2^{\cdot-}$, al igual que de $ONOO^{\cdot-}$ y de H_2O_2 , conduciendo a la oxidación de proteínas y liberación de Citocromo C al citoplasma, iniciando la apoptosis celular ⁽³³⁾.

Peroxisomas. Son organelas presentes en el citoplasma, son ricas en oxidasas y generan H_2O_2 , el cual es depurado por enzimas específicas (como catalasas) y finalmente transformado en agua ⁽²⁹⁾.

Citocromo P-450. Localizado en el retículo endoplasmático, sitio de importancia para la respectiva producción de radicales libres. Su principal papel es catalizar las reacciones que generan $O_2^{\cdot-}$, a través de mecanismos dependientes de NADPH. Este sistema contiene citocromos con los requisitos necesarios para generar radicales libres, debido a que cuentan con la presencia de iones de metal de transición, oxígeno y además se realiza la transferencia de electrones ⁽³³⁾.

Las enzimas presentes en este complejo participan en el metabolismo oxidativo de sustancias y sustratos exógenos, en especial de los compuestos liposolubles, entre los que se encuentran medicamentos, productos químicos y subproductos industriales.

Evitan efectos tóxicos de diversas drogas como; el benceno, paraquat, alcohol etílico, insecticidas clorados, fármacos antimaláricos, antifúngicos y antitumorales. No obstante, algunos compuestos que sufren esta detoxificación por reacciones que se catalizan en el citocromo P-450 se convierten en intermediarios reactivos que inician la peroxidación lipídica, ocasionando lesiones en el ADN y en la membrana microsomal⁽³³⁾.

Fagocitosis. En este proceso se producen EROs benignos, debido a que son la respuesta primaria de defensa ante agentes infecciosos. Al activarse en las células que realizan fagocitosis (leucocitos polimorfonucleares) mediante; los mediadores proinflamatorios, o de la presencia de antígenos bacterianos, víricos o parasitarios, se da una “explosión” oxidativa produciendo un gran número de radicales $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} y NO^{\cdot} para producir lisis en células infectadas ⁽³³⁾.

Fuentes exógenas

Otras fuentes que permiten la síntesis de radicales libres son: exponerse ante rayos X, contaminantes del aire, tabaco, ozono y productos químicos industriales, así como fármacos, que estimulan el aumento en la producción de ERO ⁽³³⁾.

Tabla N°4: Principales factores externos que incrementan la producción de ERO.

Contaminantes	Fibras de asbestos Polvo de minerales Ozono Monóxido de carbono Óxido nítrico y Dióxido de nitrógeno Sílice Solventes Toxinas Hipocloritos Dióxido de sulfuro Bifenilos policlorados Paraquat y Diquat
Drogas	Acetaminoceno Ciprofloxacino Antidepresivos tricíclicos Nitrofurantoinas Antidiabéticos Bleomicina Doxorubicina
Iones metálicos	Hierro Cobre Cadmio Níquel Cromo Mercurio
Radiaciones	Ultravioleta Rayos X Gamma
Dieta	Ácidos grasos poliinsaturados Glucosa
Otros	Tabaco Ejercicio intenso

Fuente: Ugartondo V, 2009.

2.2.2.2 Sistema antioxidante celular

Los organismos aerobios poseen sistemas de defensa antioxidante, para contrarrestar el daño producido por los radicales libres, este sistema se encuentra constituido por elementos tanto enzimáticos, considerado, la primera línea de defensa celular primaria

frente al daño oxidativo, las cuales eliminan el O_2^- y el H_2O_2 , como elementos no enzimáticos ⁽³⁴⁾.

- **Antioxidante Enzimático**

El sistema de defensa antioxidante enzimático, está conformado por:

Superóxido Dismutasa (SOD). Cataliza la dismutación del radical O_2^- a H_2O_2 , el cual es menos reactivo y puede ser degradado por glutatión peroxidasa o catalasa.

Catalasa. Hemoproteína, localizada en los peroxisomas y en las mitocondrias, su función es acelerar la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, como productos.

Glutatión peroxidasa (GPx). Selenoproteína, que junto a un agente reductor, como GSH, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol, respectivamente ⁽³³⁾.

- **Antioxidante no enzimático**

Es la línea secundaria de defensa conformada por moléculas de tipo no enzimáticas, son un grupo de moléculas tanto hidrófobas como hidrofílicas, su papel es atrapar radicales libres y generar moléculas menos dañinas para la célula, agregándole un electrón al RL con el fin de estabilizarlo. En este sistema encontramos:

Vitamina C. Se encuentra intra y extracelularmente, bajo la forma de ascorbato, tiene acción directa sobre los radicales hidroxilo, superóxido y algunos hidroperóxidos lipídicos, además actúan sobre el tocoferoxilo y lo transforman a vitamina E. Sin embargo, en presencia de altas concentraciones de iones de cobre y hierro, el ascorbato puede llegar a ser un potente prooxidante.

Glutatión. Es un tripéptido que presenta una distribución tisular variable y se considera como compuesto tiólico de bajo peso molecular, se encuentra en alta proporción en las células de los mamíferos. Tiene acción directa sobre el radical hidroxilo, superóxido y peróxido de hidrogeno.

Flavonoides polifenólicos. En este grupo encontramos una gran variedad de compuestos fenólicos (quercetinas, catequinas y cianidinas) que actúan como quelantes de metales y capturan *in vitro* a ERO y ERN. Son de tipo liposolubles e hidrosolubles y ambos se ubican tanto extra como intracelularmente. En este grupo tenemos a la vitamina A, la vitamina E, la ubiquinona (coenzima Q), el ácido lipoico, la albúmina, el fibrinógeno, la glucosa y bilirrubina ⁽³³⁾.

Las ERO, han sido relacionadas con diferentes patologías como por ejemplo: Cardíacas: trombosis, hipertrofia; neurológicas: parkinson y demencia; articulares: artritis reumatoide; tracto gastrointestinales: pancreatitis y hepatotoxicidad; oculares: cataratas y retinopatía; multiorgánicas: inflamación, intoxicaciones, envejecimiento, isquemia, cáncer; vasos: aterosclerosis; eritrocitos: anemia de fanconi y malaria; respiratorias: asma; piel: soriasis y quemaduras. Las alteraciones celulares de estas patologías incluyen diversos mecanismos como el reclutamiento de macrófagos, lesiones mitocondriales, interferencia con defensas antioxidantes, aumento del Ca⁺⁺ intracelular y conversión de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa, lo cual conlleva hacia alguno de los siguientes estados:

- Adaptación: debido al aumento de la actividad de los sistemas de defensa antioxidante, que protege a la célula frente a futuras lesiones.
- Lesión histológica: por daño en macromoléculas como carbohidratos, lípidos y proteínas.
- Muerte celular: por necrosis o apoptosis ⁽³³⁾.

2.2.3 Hígado

2.2.3.1 Anatomía hepática

El hígado es el órgano de mayor volumen que se encuentra en nuestro organismo, localizado en plano inferior al diafragma y ocupa gran parte del hipocondrio derecho y una porción epigastrio, en la cavidad abdominopélvica ⁽³⁵⁾. Tiene un peso de 1500 g y representa el 2.5 por ciento del peso total de un adulto. Tiene un color pardo rojizo con

forma de cuña, bastante redondeado, se encuentra revestido por una cápsula de tejido conjuntivo fibroso (cápsula de Glisson)⁽³⁶⁾.

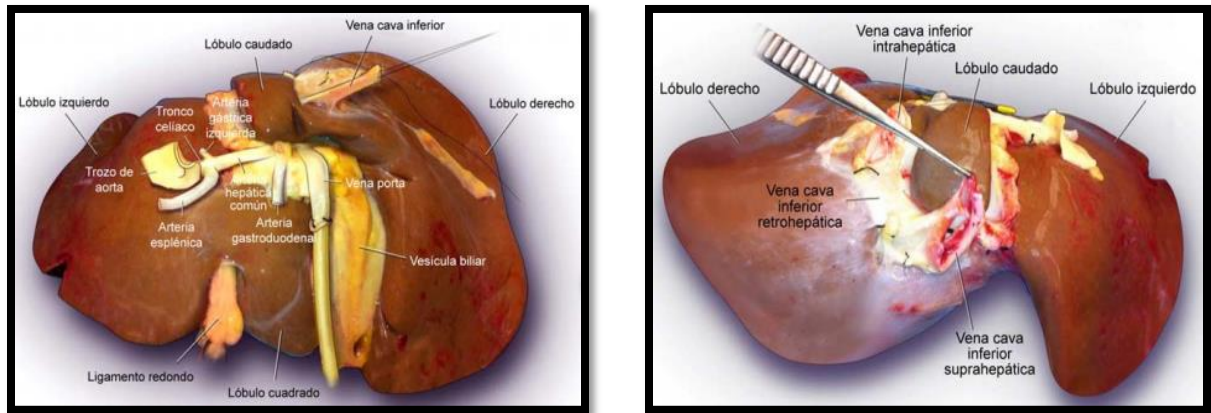


Figura N°4: Vista anterior y posterior de la anatomía hepática.

Fuente: Lena S, 2013.

2.2.3.2 Fisiología hepática

El hígado tiene diversas funciones como; almacenamiento y metabolismo de sustancias que recibe a través del sistema circulatorio y portal⁽³⁷⁾. Algunas de las sustancias que almacena y biotransforma son la glucosa, en forma de glucógeno, aminoácidos, grasas y vitamina A y B₁₂⁽³⁸⁾. Este órgano se encuentra expuesto a los daños producidos por tóxicos, debido a que los dos sistemas circulatorios llevan sustancias tóxicas o que se vuelven tóxicas con las transformaciones que tienen lugar en el, esto se le conoce como bioactivación. Algunas de las reacciones que sufren los tóxicos en el hígado las transforman en sustancias menos tóxicas o inocuas y con mayor facilidad de ser excretadas, esto se conoce como detoxificación. Para realizar de manera correcta sus funciones, el hígado posee una amplia variedad de enzimas con funciones oxidativas y reductivas, por ejemplo, el sistema del citocromo de la proteína 450 (P-450), flavin-monooxigenasas, peroxidasas, hidroxilasas, esterasas y amidasas. Otras enzimas presentes son las glucuroniltransferasas, las

sulfotransferasas, metilasas, acetiltransferasas, tioltransferasas. Estas son de mucha importancia en el metabolismo de tóxicos. El hígado produce y regula la concentración de ciertas sustancias de la sangre. Algunas de estas sustancias son las albúminas, el fibrinógeno y la mayoría de las globulinas y proteínas de la coagulación. Cuando existe un desequilibrio de estas sustancias, el individuo está susceptible a problemas de coagulación. También posee una función exócrina, que consiste en la producción de bilis, la cual facilita la excreción de diversos metabolitos por el intestino ⁽³⁹⁾.

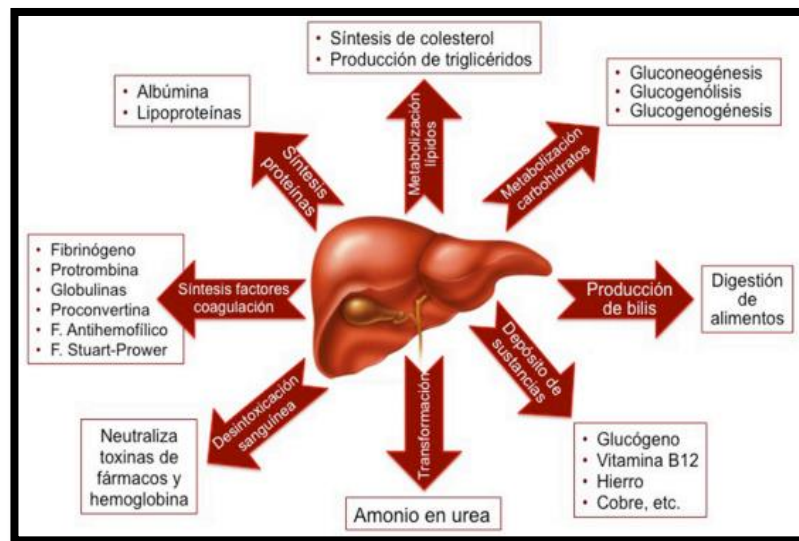


Figura N° 5: Esquema de la fisiología hepática.

Fuente: Manterola *et al*, 2017.

2.2.3.3 Funciones metabólicas del hígado

- Metabolismo de carbohidratos

Los carbohidratos son una fuente vital de energía, del cual el hígado cumple determinadas funciones en su metabolismo:

Conversión de la galactosa y la fructuosa en glucosa: Este proceso sucede en el hígado, al inicio de su absorción. La fructocinasa convierte la fructosa en fructosa 1-fosfato, esta luego se divide en DHAP y gliceraldehído. En los músculos y en el tejido adiposo la fructosa es fosforilada por la hexocinasa para formar el intermediario

glucolítico fructosa-6-fosfato. La galactosa se transforma en galactosa-1-fosfato, que luego reacciona con UDP-glucosa formando UDP-galactosa. Esta última se transforma en su epímero, UDP-glucosa, el sustrato para la síntesis de glucógeno ⁽⁴⁰⁾.

Gluconeogenia. Resultado de la transformación de los carbohidratos a partir de aminoácidos y glicerol, tiene como finalidad prevenir el descenso exagerado de las concentraciones sanguíneas de glucosa durante el ayuno. Cada aminoácido se convierte en glucosa por un proceso químico, como la alanina se convierte directamente en ácido pirúvico por desaminación; el ácido pirúvico se transforma en glucosa o almacenándose como glucógeno ⁽⁴⁰⁾.

- **Metabolismo de proteínas**

Los hepatocitos retiran al grupo amino de los aminoácidos (desaminación), con el fin de utilizarse en la producción de ATP o convertirse en glúcidos o lípidos. Luego, el amoníaco (NH₃) participa en el ciclo de la urea, excretándose a través de la orina. Además, los hepatocitos sintetizan proteínas plasmáticas ⁽³⁵⁾.

- **Metabolismo de lípidos**

Los hepatocitos almacenan triglicéridos; desdoblan los ácidos grasos para generar ATP; sintetizan lipoproteínas; que transportan ácidos grasos, triglicéridos y colesterol hacia las células y desde éstas; sintetizan colesterol, y lo usan en la producción de sales biliares ⁽³⁵⁾.

2.2.4 Hepatotoxicidad inducida por fármacos

2.2.4.1 Metabolismo hepático de las drogas

Las drogas tienen naturaleza lipofílica, y es por esto que son biotransformadas en compuestos con mayor polaridad para su correcta eliminación renal o biliar. Esto sucede en el hígado, generalmente por dos fases ⁽⁴¹⁾ :

Fase I: se producen reacciones catalizadas por enzimas de la familia del citocromo p-450, esta fase se genera de manera frecuente en metabolitos reactivos capaces de inducir lipoperoxidación o de unirse covalentemente a macromoléculas o al ADN, provocando lisis en las células.

En general, estas reacciones son de oxidación, reducción e hidrólisis. El sistema del citocromo P-450 tiene una gran importancia en la fase I en cuanto a versatilidad catalítica y cantidad de sustancias endógenas que activa e inactiva ⁽⁴¹⁾.

Reacciones de hidrólisis. carboxilesterasas, Acetilcolinesterasa, Butirilcolinesterasa, Paraoxonasa o arildialquilfosfatasa, Peptidasas, Epóxido hidrolasa.

Reacciones de reducción. azo y nitro reducción, Carbonilo reducción, Deshalogenación reductora.

Reacciones de oxidación. alcohol deshidrogenasa, Aldehído deshidrogenasa, Xantina deshidrogenasa-xantino oxidasa, Monoamino oxidasa, Flavino monooxigenasa, Citocromo P- 450 o Hidroxilación de carbono aromático y alifático o Epoxidación o N-oxidación o S-oxidación o Desalquilación (O-, S-, N-) o Desaminación oxidativa o Desulfuración oxidativa o Declorinación o Deshidrogenación.

Fase II: reacciones catalizadas en el citosol que comprenden las reacciones de glucuronidación, sulfatación, metilación, acetilación, la conjugación con glutatión y aminoácidos como glicina, taurina. Estas reacciones aumentan la hidrosolubilidad del fármaco con excepción de la metilación y la acetilación que aumentan la liposolubilidad y reducen la actividad farmacológica y tóxica, en algunas ocasiones, la sulfatación activa hidrocarburos y aminas aromáticas policíclicas produciendo metabolitos carcinógenos ⁽⁴¹⁾.

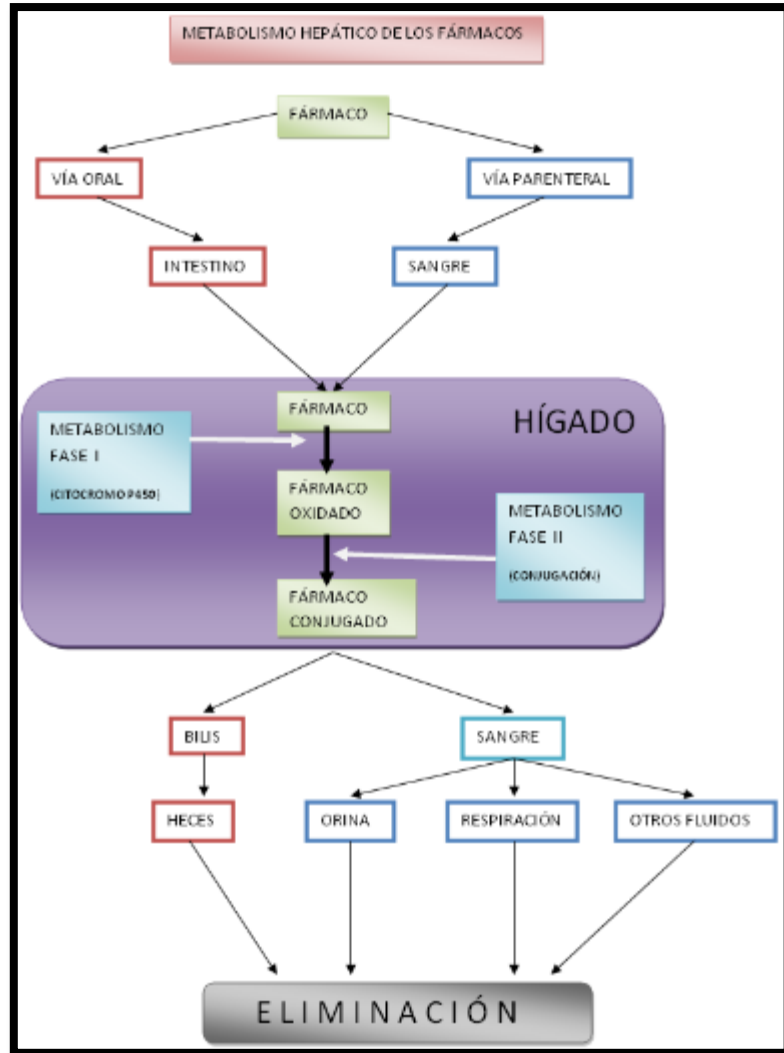


Figura N° 6: Diagrama del metabolismo hepática de fase I y II.

Fuente: Tejada F, 2010.

2.2.4.2 Clasificación de hepatotoxicidad

Toxicidad directa

Los tóxicos directos, también conocidos como intrínsecos, causan lesión a nivel hepático, como también a individuos que ingieren dosis considerables luego de un periodo de latencia. El medicamento más frecuente causante de intoxicación hepática es el paracetamol ⁽⁴²⁾.

Idiosincrasia

Conocida también como indirecta, produce daño impredecible, el cual ocurre independientemente del quien reciba la droga o el medicamento se piensa que esto ocurre en una variedad genética de la isoenzima del citocromo p-450, esto demostraría la ausencia del metabolismo de un precursor determinado o la producción excesiva de metabolitos tóxicos con capacidad de lesionar los hepatocitos, así como la excreción biliar o las estructuras vasculares hepáticas, lo que traería como consecuencia la presencia de los cuadros clínicos.

Entre los factores están, la edad, sexo, enfermedades preexistentes y consumo de alcohol los cuales dependerán para generar anticuerpo ⁽⁴²⁾.

2.2.4.3 Compuestos hepatotóxicos

Existen ciertas sustancias químicas, drogas, por ejemplo, que actúan como inductores enzimáticos, como los, barbitúricos, hidrocarburos policíclicos, esteroides, etanol (crónico), insecticidas clorados, herbicidas y algunas plantas. Entre los medicamentos con capacidad de inhibir enzimas en humanos tenemos a la isoniacida, eritromicina, ketoconazol, el cobalto, omeprazol, metronidazol, las sulfonamidas, alcohol etílico (agudo), etc.

Además de sustancias químicas, los factores ambientales y nutricionales alteran el metabolismo. La dieta también afecta el metabolismo y la toxicidad de xenobióticos. Las dietas bajas en proteínas reducen tanto la actividad y la cantidad de citocromo P450 ⁽⁴¹⁾.

Un déficit de vitaminas, en conjunto con el consumo de alcohol y de productos formados por la pirolisis de la carne asada, pueden inducir isoformas de citocromo P450 asociadas al metabolismo de algunos carcinógenos. El consumo constante de etanol y otras sustancias que pueden inducir a la isoforma CYP2E1 aumenta la

toxicidad de drogas metabolizadas por esa isoforma, como ocurre con el acetaminofén y el tetracloruro de carbono.

El consumidor crónico de etanol, tiene mayor posibilidad a sufrir lesiones por paracetamol con dosis tan bajas como 2,5 g a 3 g. Por el contrario, el consumo agudo de alcohol etílico en interacción con dicha droga, disminuye la toxicidad a través de la inhibición competitiva de la enzima ⁽⁴³⁾.

Entre los medicamentos que causan hepatotoxicidad, se encuentran:

Tabla N°5: Fármacos que producen hepatotoxicidad.

Morfología de la injuria hepática según el xenobiótico implicado		
Necrosis hepatocelular	Esteatosis	Esteatosis
Paracetamol*	Microvesicular	Macrovesicular
Allopurinol	Aflatoxina	Amiodarona
Arsénico	Fialuridina	Etanol
Carbamazepina	Aceite de margosa	Perhexilina
Tetracloruro de carbono*	Nucleósidos (antirretrov)	Vitamina A
Anatoxinas *	Tetraciclina	Neoplasias
Dantrolene	Acido valproico	Andrógenos
Halotano	Granulomatosis	Anticonceptivos orales
Hidralazina	Allopurinol	Cloruro de vinilo
Sales de hierro	Aspirina	Enf. venoclusiva
Isoniazida	Cabamazepina	Ciclofosfamida
Metotrexate *	Diltiazem	Alcaloid. pirrolizidínicos
Metil dopa	Halotano	Azatioprina
Nitrofurantóina	Hidralazina	Colestasis
Fenitoína	Isoniazida	Allopurinol
Fósforo amarillo *	Metil dopa	AMX / CL
Procainamida	Nitrofurantóina	Andrógenos
Propiltiuracilo	Penicilinas	Clorpromazina
Quinina	Fenitoína	Clorpropamida
Tetraciclina	Procainamida	Eritromicina
Sulfonamidas	Quinidina	Hidralazinas
Troglitazona	Sulfonamidas	Nitrofurantóina
Cocaína	Sulfonilureas	Anticonceptivos orales
Indometacina		Rifampicina
Anfetaminas		Tetraciclina
		Trimetoprina / sulfamet
		Anfetaminas

* Toxinas intrínsecas

Fuente: Zimmerman HJ, 1978.

2.2.6 Paracetamol

2.2.6.1 Contraindicaciones del paracetamol

Hipersensibilidad, insuficiencia hepatocelular grave y hepatitis vírica ⁽⁴⁴⁾.

2.2.6.2 Efectos secundarios

A nivel hepático aumenta las transaminasas, fosfatasa alcalina y la bilirrubina. En altas concentraciones manifiesta hepatotoxicidad, de preferencia en pacientes alcohólicos o muy débiles.

Hipersensibilidad: exantema, fiebre, rash maculopapular, dermatitis alérgica y dermatitis. También se ha descrito angioedema y reacciones anafilácticas.

Hematológicos: trombocitopenia, leucopenia en tratamientos prolongados a dosis altas.

En casos graves se describe agranulocitosis y anemia aplásica y ocasiones muy raras se presenta malestar, erupción cutánea, hipotensión, piuria estéril e hipoglucemia ⁽⁴⁵⁾.

2.2.6.3 Trastornos histopatológicos por paracetamol

La ingestión de una dosis única de 10-15 g de paracetamol (o 150 mg/kg) causa una intoxicación aguda caracterizada por la aparición tardía (24-48 h) de náuseas, vómitos, dolor abdominal e ictericia. Transcurridas 12 h ya pueden detectarse aumentos de transaminasas y alteraciones del tiempo de protrombina en intoxicaciones graves. Existe relación directa entre las concentraciones plasmáticas del fármaco y la posible aparición de toxicidad hepática. La intoxicación puede evolucionar en los días siguientes a un cuadro de insuficiencia hepática con acidosis metabólica y coma, y puede manifestarse insuficiencia renal aguda (necrosis tubular aguda), pancreatitis y metahemoglobinemia. Sólo un 10% de las intoxicaciones no tratadas puede presentar una necrosis grave, y alrededor del 1% puede desarrollar un fallo hepático fulminante que puede ser mortal. En pacientes hepatópatas y alcohólicos, la dosis necesaria para

inducir hepatotoxicidad puede ser notablemente inferior, de entre 4 y 8 g. Un 60% de los pacientes desarrollan hepatotoxicidad si tienen niveles plasmáticos superiores a 200 mg/L a las 4 h o a 30 mg/L a las 15 h tras la ingestión (o por encima de la línea que une los 2 puntos en un tiempo intermedio). La afectación aumenta hasta un 90% en los que tienen concentraciones superiores a esas horas de 300 mg/L y 45 mg/L, respectivamente ⁽⁴⁵⁾.

2.2.7 Silimarina

2.2.7.1 Propiedades

La silimarina es un flavonoglicano, el cual se extrae del fruto y semillas de *Silybum marianum* (Cardo Mariano); es una mezcla compuesta de tres diferentes sustancias: silibinina, silidianina y silicristina. En un estudio con animales de experimentación los que se les realizó hepatectomía parcial del 70 por ciento, el grupo pre tratado con silimarina evidenció un aumento en la síntesis de ADN, ARN, proteínas y colesterol, comparado con el grupo no pre tratado, evidenciando regeneración hepática ⁽⁴⁶⁾.

2.2.7.2 Usos

Se ha usado durante miles de años para tratar los problemas del hígado. Tiene reconocimiento por sus propiedades antihepatotóxica, antiinflamatoria, antioxidante, antitumoral y hepatoprotectoras. Además de promover el crecimiento de nuevas células del hígado, por lo que se recomienda en el tratamiento de hepatitis, cirrosis y durante el consumo de sustancias químicas que pueden causar daño en el hígado como efecto colateral. La silimarina, en su estructura química comprende a cuatro flavolignanós: silibina, isosilibina, silicristina y silidianina, siendo prácticamente el 50% de la mezcla silibina, el cual posee mayor actividad farmacéutica ⁽⁴⁶⁾.

2.3 Hipótesis

2.3.1 Hipótesis general:

El extracto acuoso del mesocarpio *Cucurbita ficifolia* B. (calabaza) posee efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman.

2.3.2 Hipótesis específicas:

1. El extracto acuoso del mesocarpio *Cucurbita ficifolia* B. (calabaza) presenta varias clases de metabolitos secundarios.
2. Existe una concentración óptima del extracto acuoso del mesocarpio *Cucurbita ficifolia* B. (calabaza) con efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman.
3. El extracto acuoso del mesocarpio *Cucurbita ficifolia* B. (calabaza) posee efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman en relación al fármaco silimarina.

VARIABLES

Tabla N°6: Operacionalización de variables e indicadores.

Variables	Indicador	Dimensión
V. I Extracto acuoso del mesocarpio <i>Cucurbita ficifolia</i> B.	Concentración a evaluar: 250 mg/kg, 500mg/kg, 1000mg/kg; Paracetamol 200mg/kg; Silimarina 40 mg/kg.	Fitoquímico
V. D Efecto antioxidante.	Determinación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBars) o radicales libres.	Farmacológico
V. IN Peso de las ratas.	Gramos de peso de las ratas.	Observacional

Fuente: Elaboración propia.

2.4 Definición de términos básicos

Anatomía. Es una rama de las ciencias biológicas que estudia la forma y estructura de los organismos vivos ⁽⁴⁷⁾.

Antioxidante. Sustancias que se encuentra en menores proporciones, en comparación a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retardando o previniendo la oxidación de dicho sustrato ⁽⁴⁸⁾.

Enzimas. Son macromoléculas de naturaleza proteica cuya función en los seres vivos es catalizar reacciones químicas, de manera que éstas ocurran en un tiempo adecuado para sustentar la vida ⁽⁴⁹⁾.

Extracto acuoso. Preparación principalmente en agua de las sustancias provenientes de una planta o un animal que contiene los metabolitos biológicamente activos sin residuo celular⁽⁵⁰⁾.

Fisiología. Es el funcionamiento normal del cuerpo o también la función de un sistema o acontecimiento fisiológico ⁽⁵¹⁾.

Fruto. Producto del desarrollo del ovario de una flor después de la fecundación, en que quedan contenidas las semillas, y en cuya formación cooperan con frecuencia tanto el cáliz como el receptáculo floral y otros órganos ⁽⁵²⁾.

Hígado. Órgano de mayor volumen que se encuentra ubicado en la parte superior del abdomen. Tiene como función desintoxicar la sangre y ayudar en la digestión secretando bilis ⁽⁵³⁾.

Intoxicación. Respuesta posterior luego del consumo de una droga psicoactiva, causando alteraciones en el nivel psicológico y también ante respuestas psicofisiológicas ⁽⁵⁴⁾.

Lipoperoxidación. Reacción autocatalítica donde las especies reactivas del oxígeno o radicales libres secuestran átomos de hidrógeno de las moléculas de ácidos grasos poliinsaturados ⁽⁵⁵⁾.

Mesocarpio. Capa media de las tres que forman el pericarpio de los frutos ⁽⁵⁶⁾.

Metabolismo. Son procesos químicos que facilitan la subsistencia celular ⁽⁵⁷⁾.

Prooxidante. Sustancia que puede producir subproductos del oxígeno del metabolismo que pueden dañar las células ⁽⁵⁸⁾.

Radicales libres. Molécula química cuya estructura posee uno o más electrones desapareados, por lo que son muy reactivos y son clave para formar otros radicales libres en cadena ⁽⁵⁹⁾.

Tbars. La metodología del Tbars consiste en la reacción del malondialdehído (producto formado durante la oxidación lipídica) con el ácido tío barbitúrico, dando como resultado un compuesto coloreado el que es evaluado espectrofotométricamente⁽⁶⁰⁾.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Tipo y Diseño de investigación

El estudio pertenece al tipo de carácter aplicativo puesto que está dirigido a solucionar un problema de salud pública.

El estudio pertenece al nivel de investigación explicativa, porque presenta variables de causa y efecto.

El diseño de la investigación utilizada es el experimental mixto, porque existe la manipulación de la variable independiente, vinculando en su procedimiento.

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población vegetal

La población vegetal que se utilizó en la investigación estuvo constituida por un fruto de la especie vegetal ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) de 5 kilos, colectadas en la Provincia de Huánuco en el mes de julio del 2018.

3.2.2 Muestra vegetal

La muestra vegetal fue 750 g del mesocarpio ***Cucurbita ficifolia*** B. para el extracto acuoso.

3.2.3 Población animal

Se usó ratas albinas machos cepa Holtzman de 8 -10 semanas de edad con un peso promedio de 220 - 240 g.

3.2.4 Muestra animal

Se utilizaron 39 ratas albinas macho cepa Holtzman (siguiendo las pautas de la guía OECD Test 423 ⁽⁶¹⁾ y el artículo del diseño experimental y consideraciones sobre el tamaño de muestra por CNB - CBMSO ⁽⁶²⁾), provenientes de las instalaciones del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. El proceso de cuarentena para la aclimatación a las condiciones ambientales y conductuales fue de cinco días.

3.3 Instrumento de recolección de datos

El instrumento de recolección que se empleó en este estudio fueron las siguientes fichas de observación ad-hoc, elaborada para los fines específicos de la investigación:

Ficha de observación AD-HOC de prueba de solubilidad del estudio del extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) y su efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en hígado de ratas Holtzman.

Ficha de observación AD-HOC de marcha fitoquímica del estudio del extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) y su efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en hígado de ratas Holtzman.

Ficha de observación AD-HOC de recolección de datos para determinar el efecto antioxidante en la lipoperoxidación del extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) y su efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en hígado de ratas Holtzman.

3.4 Procesamiento de datos

Para el análisis estadístico se empleó el análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA) para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa para la variable evaluada intergrupos e intragrupos se realiza análisis post hoc mediante el test de tukey. El nivel de significancia fijado fue $p < 0.05$

3.5 Equipos, materiales y reactivos

- Equipos:

- Balanza Gramera.
- Balanza Analítica Pioneer PA224 "OHAUS".
- Estufa.
- Plancha de calentamiento.
- Luz UV 254 y 366 nm.
- Centrífuga.
- Espectrofotómetro UV-VIS.

- Materiales:

- Material estéril de Laboratorio.
- Papel Kraft.
- Mortero y pilón.
- Matraz Erlenmeyer
- Embudo de vidrio.
- Papel filtro.
- Tubos de ensayo Pyrex®.
- Pipetas.
- Fiolas de 50 mL
- Peras de Bromo de 250 mL
- Material quirúrgico.

- Jaulas de Polietileno.

- **Reactivos y Solventes:**

- Rvo de Mayer.
- Rvo de Wagner.
- Rvo de Dragendorff.
- Rvo de ácido Fosfowolframio.
- Rvo de Sonneschein.
- Rvo de Reineckato.
- Rvo de Shinoda.
- Rvo de Cloruro Férrico.
- Rvo de gelatina al 1%.
- Hidróxido de sodio al 5%.
- Rvo de Ninhidrina.
- Rvo de Lugol.
- Rvo de Fehling A.
- Rvo de Fehling B.
- Etanol de 96°.
- Metanol marca Merck.
- Etanol marca Merck.
- Cloroformo marca Merck.
- Agua destilada.
- Isopropanol
- Reactivo de Tricloruro de Aluminio al 2%
- Acetato de sodio 1 M
- Reactivo Metanol: Agua (25:75)
- Reactivo BAW (Butanol: Agua: AAG) (4:3:1)
- Ácido sulfúrico 2 N

- Hidróxido de sodio al 10%
- Ácido tricloroacético al 20%
- Ácido tiobarbitúrico
- Ácido clorhídrico 0.1 N
- Malonaldehído
- Estándar de Quercetina.
- Estándar de Cafeína.

3.6 Procedimiento experimental

El fruto de la calabaza fue recolectado en la provincia de Huánuco ubicada a los 1800 m.s.n.m. en el mes de julio del 2018. Posteriormente se confirmó su identidad en el Herbario del Museo de Historia Natural de la UNMSM. (Constancia N° 263-USM-2018) (Anexo 2). Se asumió el siguiente proceso:

Para la parte experimental del presente trabajo se desarrolló en dos etapas, una de las cuales es la parte fitoquímica, aquí se hizo la extracción acuosa del fruto de calabaza (para la realización del screening fitoquímico y cromatografía en capa fina), también se obtuvo el extracto seco de la muestra para la prueba de solubilidad, una vez terminado esta parte se procedió a evaluar la Toxicidad Aguda Oral en ratas, para analizar si el extracto acuoso de la calabaza causa mortalidad o signos adversos en los animales de experimentación y segundo se procedió a la elaboración de la dosificación para las dosis en las ratas, dando lugar a la parte farmacológica con el uso de seis grupos de 5 animales por cada tratamiento y poder probar el efecto antioxidante de la calabaza.

3.6.1 Obtención del extracto acuoso del fruto de *Cucurbita ficifolia* B.

Se llevó a cabo el desarrollo de la parte experimental en el laboratorio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, donde se procedió el lavado del fruto para eliminar las impurezas como tierra adheridos a la superficie, previamente fue pelado de manera manual con cuchillo de acero inoxidable; con la finalidad de separar la cáscara y las

semillas. Posteriormente se colocó un peso promedio de 250 g del mesocarpio de la calabaza y se vertió 1000 mL de agua destilada para luego ser llevado a una plancha de calentamiento a una temperatura de 40°C, y mediante una extracción de reflujo (24 horas) acondicionado con un refrigerante para así poder extraer sus metabolitos sin alterarlos.

Una vez culminada la extracción acuosa por reflujo, se filtró la muestra en un embudo Buchner acoplada a una bomba al vacío para generar presión al momento de la extracción. Aquí se obtiene el extracto acuoso.

3.6.2 Extracto Seco del fruto de la Calabaza

Para esto una pequeña parte del extracto acuoso (filtrado) lo vertemos a una cápsula de porcelana para luego ser llevado a la estufa a una temperatura de 40° C, por un tiempo de 24 horas, al transcurrir el tiempo es sacada de la estufa y recolectada en un recipiente hermético, el cual lo proteja de la luz y así evitar la oxidación. Finalmente se guarda a temperatura de 2 a 8 °C hasta su utilización.

3.6.3 Prueba de solubilidad

Para esta prueba se usó del extracto seco de la Calabaza y colocamos una mínima cantidad de nuestra muestra en seis (06) tubos de ensayo; luego se añadió de 3 a 5 mL de los solventes con distinta polaridad como (Alcohol de 96°, Etanol, Agua, Cloroformo, Metanol e Isopropanol); esta prueba nos permite identificar en que solventes es más soluble la muestra a tratar.

3.6.4 Screening Fitoquímico

Para la realización de esta prueba se han elaborado un conjunto de técnicas para la detección preliminar de los diversos fitoconstituyentes químicos presentes en la planta, basándose en la extracción con los respectivos solventes adecuados, debido a que

este estudio es de coloración y precipitación. En esta evaluación se realizaron pruebas para la detección de metabolitos primarios y secundarios, usando los siguientes reactivos.

Metabolitos primarios

Determinación para glúcidos

Reactivo de Fehling A y B: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* B y luego se añadió 3 gotas del reactivo Fehling A y B, llevándolo luego a baño maría; la aparición de un precipitado anaranjado ladrillo confirma la presencia de glúcidos en nuestra muestra.

Determinación para almidón

Reactivo de Lugol: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* B y se añadió 3 gotas del reactivo de lugol; la presencia de una coloración oscura confirma la presencia de almidón en nuestra muestra.

Determinación para aminoácidos

Reactivo de Ninhidrina: En un tubo de ensayo se agregó 1mL de extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* B. y se añadió de 3 a 5 gotas del reactivo e inmediatamente es llevada a calentar, la presencia de una coloración rosada medio lila es positiva para aminoácidos.

Metabolitos secundarios

Determinación para alcaloides

Se utilizó reactivos generales (Reactivos de precipitación y Reactivos de coloración) porque tienen importancia en los métodos de búsqueda, aislamiento, purificación e incluso identificación, estos reactivos se agrupan en dos grandes grupos como son:

- **Reactivos de precipitación**

Reactivo de Wagner: (yodo-yoduro de potasio), en un tubo de ensayo se agregó 1 mL de extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* B, luego se agregó de 3 a 5 gotas del reactivo de Wagner, la presencia de coloración marrón es el resultado confirmatorio.

Reactivo de Mayer: (Yoduro de mercurio y potasio), en un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* B, y luego 3 a 5 gotas del reactivo, un resultado positivo es el cambio de coloración de blanca a crema.

Reactivo de Dragendorff: (Yoduro de bismuto y potasio), en un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* B, y luego 3 a 5 gotas del reactivo, el resultado positivo es el cambio coloración rojo o naranja.

Reactivos formados por poliácidos minerales complejos:

Reactivo de Scheibler: (Ácido fosfoWolfrámico), en un tubo de ensayo se agregó 1 mL de extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* B, luego 3 a 5 gotas del reactivo; el resultado positivo es el cambio de coloración blanca.

Reactivo de Sonneschein: (Ácido fosfomolibdico), en un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* B, y se agregó 3 a 5 gotas del reactivo, el resultado positivo es el cambio de coloración naranja.

Otros reactivos de precipitación:

Reactivo de Reineckato: $(\text{NH}_4[\text{Cr}(\text{NH}_3)_2(\text{SCN})_4]2\text{H}_2\text{O})$, forma un precipitado floculante de color rosa, agregándole de 3 a 5 gotas a la muestra del extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* B.

- **Reactivos de coloración**

Según la Doctora Olga Lock se considera que hay presencia de alcaloides si se obtienen cuatro resultados positivos de los ya citados.

Determinación para flavonoides

Reactivo de Shinoda: En un tubo de ensayo se agregó 1mL de extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* B, más una limadura de magnesio y con un gotero se añade 3 gotas de HCl concentrado; si hay presencia de coloraciones amarillas a rojas (flavonas y flavonoles), si la coloración es rojo a magenta (flavanonoles), si son coloraciones rojo, violeta o azul (flavanonas), si son amarillos (isoflavonas), si esta no presenta coloración pueden ser isoflavanonas, chalconas y auronas.

Determinación para compuestos fenólicos

Reactivo de Cloruro Férrico: En un tubo de ensayo se agregó 1mL de extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* B y luego unas gotas de cloruro férrico; la presencia de una coloración negra azulada indica que el tanino es perteneciente a los derivados del ácido pirogálico, pero si la coloración es verde nos indica que deriva de la catequina.

Reactivo de Gelatina al 1% (Gelatina + cloruro de sodio), se colocó 1ml de extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* B, más 5 gotas del reactivo de gelatina junto con 3 gotas de cloruro de sodio al 10 % (NaCl 10 %), el resultado positivo es la presencia de un precipitado blanco denso (coloide).

Reactivo de Hidróxido de sodio al 5% (Reacción de Borntranger)

En un tubo de ensayo se agregó 1mL de extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* B. y se añadió de 3 a 5 gotas del reactivo, la presencia de una coloración rojiza confirma así la presencia de antraquinonas y naftoquinonas.

Tabla N°7: Screening fitoquímica de la *Cucurbita ficifolia* B. (calabaza)

Metabolito	Reactivo de Reacción	Reacción Positiva
GLUCIDOS	Fehling A y Fehling B	Precipitado anaranjado ladrillo
ALMIDÓN	Lugol	Coloración oscura
CETONAS	2,4 DNPH	Formación de anillo rojizo
AMINOACIDO	Ninhidrina	Formación de color oscuro
ALCALOIDES	Mayer	Precipitado blanco
	Wagner	Precipitado marrón
	Dragendorff	Precipitado rojo o naranja
	Scheibler	Precipitado blanco
	Sonneschein	Precipitado naranja
	Reineckato	Coloración rosa
COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl ₃	Coloración verde
TANINOS	Gelatina 1%	Precipitado denso blanco
FLAVONOIDES	Shinoda	Flavanoles: Rojo a magenta
NAFTAQUINONAS, ANTRAQUINONAS Y ANTRANONAS	Bortranger (NaOH 5%)	Coloración roja

Fuente: Elaboración propia.

3.6.5 Prueba cromatográfica en capa fina

- Cromatografía en capa fina (alcaloides)

En la prueba de cromatografía se utilizó una placa cromatográfica, marca Merck (TLC Silica gel F₂₅₄), como fase estacionaria; nuestra fase móvil fue Metanol (por ser un buen solvente de sustancias polares): Agua en proporción de (25:75) respectivamente, y por último se hizo uso una jeringa en unidades de 5 µl para la inoculación de la muestra.

Para la comparación se usó un estándar de Cafeína de 10 mg/mL y se inyectó 5 µl de dicha muestra estándar, caso similar ocurrió con la muestra acuosa de la Calabaza.

Una vez contenida la placa cromatográfica las dos inyecciones fueron sumergidas en la fase móvil, donde se procederá a la separación de los metabolitos por absorción y polaridad, una vez culminada la elución del activo se saca la placa cromatográfica y se coloca en una plancha de calentamiento hasta evaporar por completo solvente, luego se lleva a la luz UV a 254 nm para evidenciar el desplazamiento de las manchas.

Para la identificación de alcaloides, se rocía sobre la placa, ácido sulfúrico al 2 por ciento y luego el reactivo de Dragendorff, como revelador, el resultado positivo es la presencia de manchas color naranja.

-Cromatografía en capa fina (Flavonoides)

En la prueba de cromatografía en capa fina para la detección de flavonoides se usó una placa cromatográfica, marca Merck (TLC Silica gel F₂₅₄), como fase estacionaria, y como fase móvil se utilizó (Butanol – Agua - Ácido acético glacial), como explican Aurelio y Ángeles (2012) que la fase móvil está constituida por un disolvente en el que los componentes de la mezcla deben ser al menos parcialmente solubles, en proporción de (20:15:5) respectivamente, esta mezcla se colocó en una pera de bromo con capacidad de 250 mL y se agito, formándose dos fases, en donde la fase móvil es la menos densa.

Para la comparación se usó un estándar de Quercetina (antioxidante flavonoide) en concentración de 10 mg/ mL el cual se inyectó 5 µl a la placa cromatográfica, el mismo procedimiento se utilizó con la muestra de la pulpa de la calabaza.

Al terminar la corrida, la muestra se seca en una plancha de calentamiento, hasta evaporar todo el solvente, luego se evidencia las manchas en la luz UV a 254 nm, y se usa como revelador el tricloruro de aluminio, la cual pone en evidencia los flavonoides con la presencia de manchas color amarillo.

3.6.6 Determinación de la toxicidad aguda oral - Método de Clases (DL₅₀)

Se determinó la Toxicidad Aguda por vía oral en ratas, según Guía OECD – Test 423 (Método de clases) ⁽⁶¹⁾ y la determinación de la actividad hepatoprotectora por vía oral del extracto acuoso de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) mediante la técnica citada en el Manual del Cytel y la citación: Madkour, F & Abdel-Daim, M ⁽¹⁵⁾.

Fueron usadas ratas albinas machos (cepa Holtzman) de 8 - 10 semanas de edad con un peso promedio de 220 - 240 g; provenientes de las instalaciones del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. El proceso de cuarentena para la aclimatación a las condiciones ambientales y conductuales fue de cinco días, después de lo cual el extracto acuoso se administró por vía oral mediante una sonda nasogástrica a dos grupos de tres ratas cada uno (un grupo con una repetición) y un grupo control (agua destilada).

La prueba incluyó un tratamiento del extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia*** B. con una repetición con la dosis de 2000 mg/Kg de peso corporal. El volumen de administración de la muestra diluida en agua destilada fue de 1 ml, al grupo control se le administró agua destilada. La mortalidad fue observada diariamente hasta los 14 días.

Luego de la administración de la dosis, se hizo un seguimiento a los animales para observar si hay mortalidad y si existen conductas anormales (como alteración en la actividad motriz, postración, depresión, irritabilidad) o presencia de signos de toxicidad (como salivación, convulsión, disnea, diarrea, entre otros).

Se realiza registros de peso corporal a los animales de experimentación, para evaluar si hay alteración de aumento o pérdida.

Los tratamientos y sus respectivos valores de concentración ensayados son detallados en la siguiente tabla:

Tabla N° 8: Tratamientos de experimentación con ***Cucurbita ficifolia* B.**

Dosis (mg/Kg rata)	N° de animales Machos	Peso promedio por grupos (g)
2000	3	225,20
2000 (repetición)	3	227,15
Control	3	230.86

Fuente: Elaboración propia

Previo al inicio de la prueba, todos los animales seleccionados para el estudio fueron restringidos en su alimentación 24 horas antes del ensayo. Los animales fueron mantenidos en jaulas de polietileno con tapas de acero inoxidable que aloja el agua y alimento y distribuidos al azar.

3.6.7 Inducción hepática con paracetamol

Se les administró a todas las ratas del grupo control positivo, control inducido sin tratamiento, control negativo y a los tres grupos de tratamiento la dosis de 200 mg/kg peso corporal por tres días consecutivos para generar el daño hepático severo.

3.6.8 Administración de los tratamientos

La administración del extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia* B.** fue por vía oral y se realizó mediante el uso de una sonda nasogástrica. Con los animales ya intoxicados hepáticamente, se empezó con la administración de los tratamientos por 21 días. Se administró diariamente un volumen de 1 mL del extracto diluido en agua destilada en sus diferentes concentraciones a todos los animales de los seis grupos. El acceso al agua y alimento fue *ad libitum*. El estudio duro 21 días. Al final del ensayo los animales fueron pesados y sacrificados por dislocación cervical para proceder a la extracción de los hígados.

Se utilizaron 30 ratas machos, las cuales se formaron 6 grupos de 5 ratas albinas cada uno como se indica:

Tabla N° 9: Distribución de los animales de experimentación.

Grupo	Tratamientos	N° de Animales	Dosis
1	Control negativo	5	-----
2	Inducido con paracetamol sin tratamiento.	5	-----
3	Inducido con paracetamol y silimarina (Control positivo).	5	40 mg/kg
4	Inducido con paracetamol y extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B.	5	250 mg/kg
5	Inducido con paracetamol y extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B.	5	500 mg/kg
6	Inducido con paracetamol y extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B.	5	1000 mg/kg

Fuente: Elaboración propia.

3.6.9 Peroxidación lipídica

Determinación de TBARS homogenizado en el hígado de ratas, inducidas con paracetamol y tratadas con extracto acuoso del mesocarpio *Cucurbita ficifolia* B.

Se realizó el proceso de liperoxidación de ácidos grasos homogenizado en el hígado, como órgano dañado; según la técnica de Buege y Aust (1978), que se basa en la medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico con formación del complejo tiobarbitúrico - Malonaldehído (MDA).

Al finalizar el ensayo *in vivo*, se procedió a la eutanasia de los animales por dislocación cervical. Posteriormente se realizó la necropsia para la respectiva extracción de los hígados de todos los animales ensayados.

Estos fueron homogenizados en frío (0°C) y perfundidos en NaCl al 0.9 por ciento y se recolectaron los sobrenadantes. Se determinó usando como muestra 0,3 mL de sobrenadante que se colocó en un tubo con tapa rosca, luego se le adicionó 0,6 mL de ácido tricloroacético al 20 por ciento, mezclando bien. Después, los tubos tapados fueron colocados en baño maría por 10 minutos. Al transcurrir este tiempo, se dejó enfriar y se añadió 1mL del ácido tiobarbitúrico al 0.7 por ciento, junto con 2 mL de HCl 0.1 N, se mezclaron bien y se trasladó a baño maría hirviendo por 30 minutos. Se añadió 5 mL de butanol, mezclando el contenido. Luego se dejaron enfriar los tubos y se centrifugaron a 4000 RPM por 15 minutos, por último los sobrenadantes fueron separados con el uso de una pipeta Pasteur, para luego proceder a realizar su respectiva lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 536 nm.

Esto se realizó para cada muestra, además de añadirse 3 tubos control:

Testigo 1, testigo 2, testigo 3, a los cuales se les añadió Malonaldehido (MDA) de la siguiente forma:

T1: 5ul de MDA: T2: 10 ul de MDA: T3: 20 ul de MDA, para hacer la curva de calibración. Luego se le añade 1 mL de ácido tiobarbitúrico al 0.7 % con 2 mL de HCl 0.1 N y se llevó a baño maría hirviendo por 30 minutos. Luego se siguió el mismo procedimiento con las muestras.

La fracción butanólica, que da un color rosado, en la parte superior fue la que se colocó en la cubeta para su lectura.

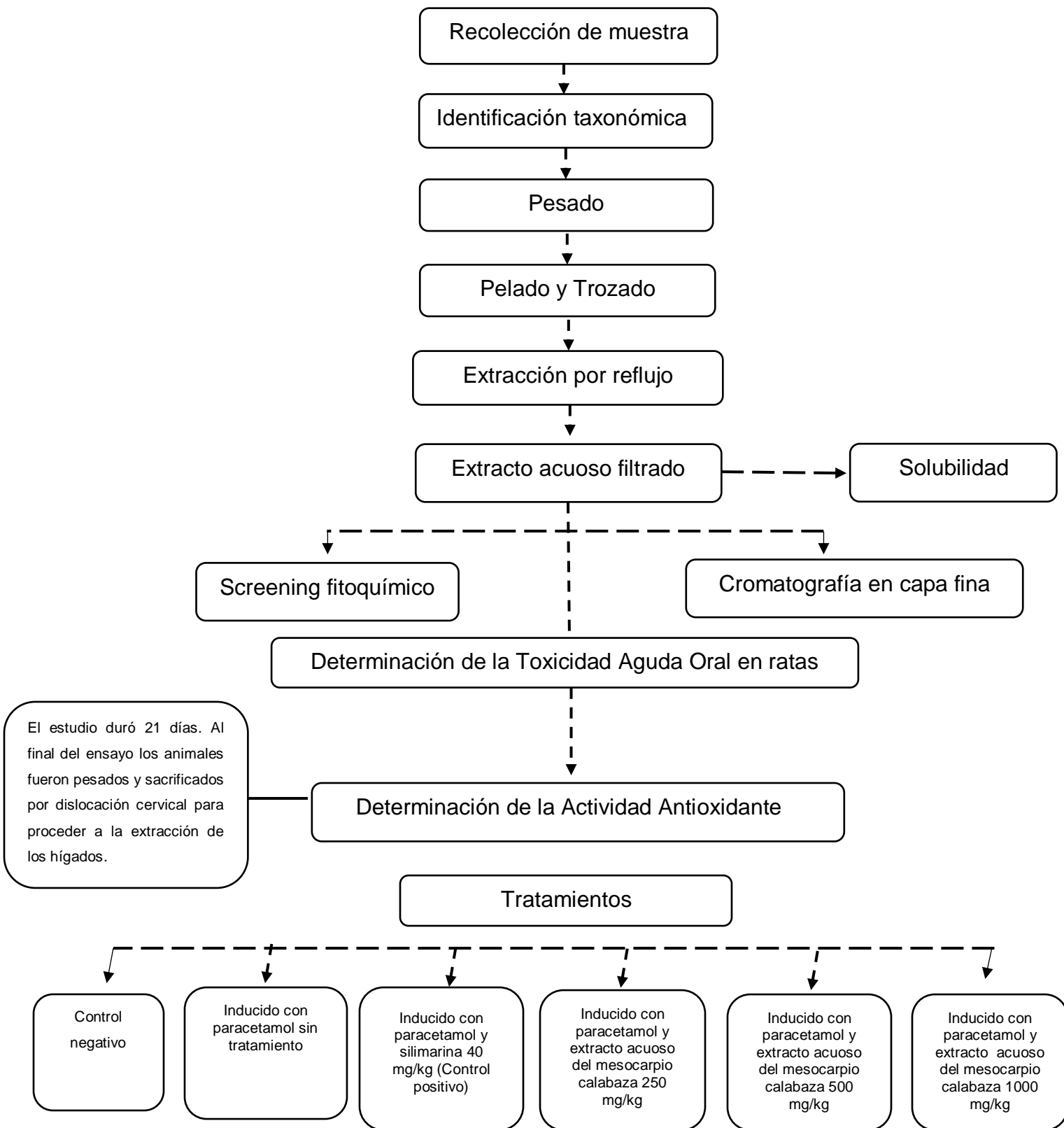


Figura N° 7 Diagrama de flujo global del procedimiento experimental de *Cucurbita ficifolia* B. (calabaza).

Fuente: Elaboración propia.

Condiciones de ensayo

Las condiciones de temperatura, humedad y fotoperiodo en el tiempo de experimentación se registraron en los siguientes rangos: temperatura = $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; humedad = $< 70\%$; 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El consumo de agua y alimento fue ad libitum.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Presentación

4.1.1 Resultados de la prueba de solubilidad

Tabla N° 10: Prueba de solubilidad del extracto acuoso del mesocarpio de *Cucurbita ficifolia B.*

PRUEBA DE SOLUBILIDAD

Solventes	Extracto seco del mesocarpio de la Calabaza	Resultado de Solubilidad
Metanol	Extracto seco en tubos de ensayo	S°
Etanol		INS°
Alcohol 96 °C		S°
Cloroformo		INS°
Agua		S°
Isopropanol		INS°

Leyenda: Soluble (S°); Insoluble (INS°).

Fuente: Elaboración propia.

Según los ensayos de solubilidad del extracto seco, este es soluble en metanol, alcohol y agua.

4.1.2 Resultados del screening fitoquímico

Tabla N°11: Identificación de los metabolitos primarios del extracto acuoso del mesocarpio de *Cucurbita ficifolia* B.

IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRIMARIOS

Metabolitos Primarios	Reactivo de identificación	Interpretación	Resultado
Glúcidos	Fehling A y B	Precipitado anaranjado ladrillo	(+++)
Almidón	Lugol	Coloración oscura	(-)
Cetonas	2,4 DNPH	Coloración rojizo	(+)
Aminoácidos	Ninhidrina	Color rosado	(++)

Leyenda: Nula (-); poco (+); regular (++); bastante (+++)

Fuente: Elaboración propia.

Entre los metabolitos primarios que se identificaron, el más abundante que se presentó fue el de glúcidos (+++), seguido de la presencia regular de aminoácidos (++) y la presencia de almidón fue nula (-).

Tabla N°12: Identificación de los metabolitos secundarios del extracto acuoso del mesocarpio de *Cucurbita ficifolia B.*

IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Metabolitos secundarios	Reactivo de identificación	Interpretación	Resultado
Alcaloides	Mayer	Precipitado blanco	(+)
	Wagner	Precipitado marrón	(++)
	Dragendorff	Precipitado rojo o naranja	(+++)
	Scheibler	Precipitado o Color blanco	(-)
	Sonneschein	Precipitado naranja	(-)
	Reineckato	Color rosa	(+)
Compuestos fenólicos y Flavonoides	Shinoda	Color rojo	(+)
	Cloruro férrico	Color negro	(+++)
	Gelatina al 1%	Precipitado blanco	(++)
	Reacción de Bortranger	Color rojo	(+)

Leyenda: Nula (-); poco (+); regular (++); bastante (+++)

Fuente: Elaboración propia.

En la identificación de alcaloides se obtuvo mayor presencia con el reactivo identificador dragendorff (+++) y en identificación de compuestos fenólicos se obtuvo mayor presencia con el reactivo de cloruro férrico (+++).

4.1.3 Resultados de la prueba cromatográfica en capa fina

Para la identificación de alcaloides se evidenció que al comparar con el estándar de referencia cafeína las manchas anaranjadas en ambas siembras resultando positivo (Figura 12).

Para la identificación de flavonoides se evidenció que al comparar con el estándar de referencia quercetina las manchas amarillas en ambas siembras resultando positivo (Figura 12).

4.1.4 Resultados del ensayo farmacológico.

4.1.4.1 Condiciones ambientales:

Durante la prueba, los parámetros ambientales registrados en el área de desarrollo fueron los siguientes:

- Temperatura (°C): 21,1°C
- Humedad (%): 67%
- Luz, Oscuridad: 12 L: 12°
-

4.1.4.2 Determinación de la toxicidad aguda oral- Método de Clases (DL₅₀):

El extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* B., (calabaza) y el control no produjeron mortalidad en la dosis administrada con una repetición durante los 14 días de evaluación de este estudio. La DL₅₀ por vía oral del extracto acuoso es mayor a 5000 mg de producto/Kg de peso corporal (> 5,0 g/ Kg).

Tabla N°13: Resultados de la Toxicidad aguda oral.

Dosis (mg/Kg rata)	Mortalidad Machos Muertos/Total
2000	0/3
2000 (repetición)	0/3
Control	0/3

Fuente: Elaboración propia.

4.1.4.3 Determinación de la peroxidación lipídica (Tbars):

De acuerdo con los resultados obtenidos, la muestra analizada del extracto acuoso del mesocarpio de *Cucurbita ficifolia* B., (Calabaza) presenta actividad antioxidante y hepatoprotectora en el modelo estudiado, a las dosis de 1000 mg/Kg. Este resultado es significativo en comparación con el control y las dosis ensayadas. Los niveles de malonaldehído (MDA) como marcador de estrés oxidativo, y del daño generado con la inducción con paracetamol disminuyeron con los tratamientos aplicados y con el control positivo en comparación con los inducidos sin tratamiento alguno, a un nivel de significancia de $p < 0.05$

Tabla N°14: Concentración de malonaldehído en la Lipoperoxidación inducida con paracetamol a las concentraciones de 250 mg/kg, 500 mg/kg y 1000 mg/kg del extracto acuoso del mesocarpio de *Cucurbita ficifolia* B. en homogenizado hepático de rata Holtzman.

Valores de TBars (MDA uM/mL)						
Número de especímenes	Control negativo	Sin Tratamiento	Silimarina	250 mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
1	74.541	335.717	76.427	210.011	161.832	81.982
2	74.581	335.566	76.978	210.315	161.988	82.829
3	74.731	335.235	76.668	210.613	161.916	83.964
4	74.412	334.933	76.762	210.478	161.762	82.464
5	74.195	335.807	76.027	210.574	161.666	82.250

Fuente: Elaboración propia.

Tabla N°15: Valores promedio de malonaldehído (MDA) producido por la Lipoperoxidación en el hígado de ratas Holtzman según grupo de trabajo.

	Control negativo	Sin Tratamiento	Silimarina	250 mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
Promedio	74.49	335.45	76.57	210.40	161.83	82.70
Desviación	0.20134	0.3624	0.3636	0.24522	0.12639	0.7727

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla se observa los resultados de las dosis administradas a los grupos de ratas, obteniendo buena efectividad en el grupo que recibió la concentración de 1000 mg/kg y aproximación de resultado al grupo que recibió silimarina como control positivo.

4.2 Contrastación de hipótesis

- Análisis de varianza

Tabla N° 16: Resultados obtenidos del análisis de varianza (ANOVA).

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F_{exp}</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	267582.9354	5	53516.58707	328560.02	3.4271E-57	2.62065415
Dentro de los grupos	3.909173392	24	0.162882225			
Total	267586.8445	29				

Fuente: Elaboración propia.

Prueba de hipótesis

H_0 = Todos los grupos presentan igual efecto antioxidante ($P > 0.05$)

H_a = Todos o al menos uno de los grupos presentan diferente efecto antioxidante ($P < 0.05$)

Como el nivel de significancia usado es de 0.05 y p hallado es menor a ese valor y $F_{exp} > F_{crítico}$, rechazamos la hipótesis nula y aceptamos la alterna, por lo tanto estadísticamente existe diferente efecto antioxidante en toda las concentraciones ensayadas.

- **Análisis múltiple posterior: Prueba de Tukey.**

Tabla N° 17: Resultados de la prueba de Tukey.

Diferencia honestamente significativa	HSD	0.75
Multiplicador (Valor Q alfa de Tukey)	Mul.	4.17
Cuadrado de error medio (suma de cuadrados y grados de libertad dentro los grupos)	Mse	0.16
Tamaño de cada uno de los grupos (número de elementos en cada grupo - cuenta)	n	5

	Sin Tratamiento	Silimarina	250 mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
Sin Tratamiento		258.88	125.05	173.62	252.754

Fuente: Elaboración propia.

Se halla la Diferencia Honestamente Significativa (HSD) utilizando la prueba de Tukey, $HSD = 0.75$, los valores mayores a este dato son los grupos que hacen la diferencia significativa (como valor absoluto), por lo tanto, los grupos comparados con el control negativo presentan efecto antioxidante y hepatoprotectora.

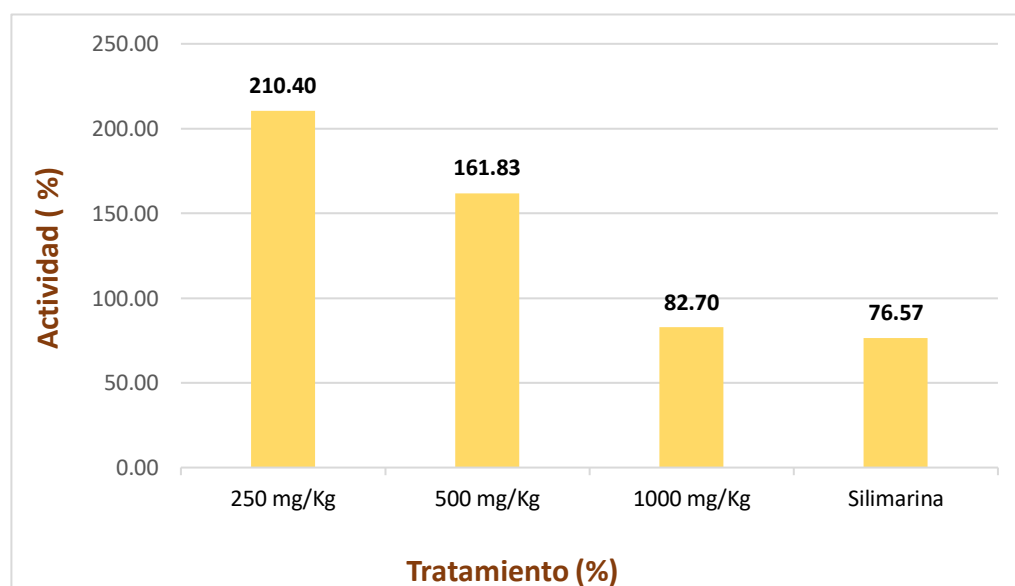


Figura N°8: Porcentaje del efecto antioxidante en la Lipoperoxidación del extracto acuoso del mesocarpio de *Cucurbita ficifolia* B., inducida al daño hepático por paracetamol en ratas Holtzman.

Fuente: Elaboración propia.

4.2 Discusión

En el estudio se realizó un screening fitoquímico del extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza), según Olga Lock, a través de reacciones de coloración y precipitación, donde se observó la presencia en mayor cantidad de alcaloides, glúcidos, compuestos fenólicos como taninos condensados; y en menor cantidad flavonoides, aminoácidos (tablas N°12 y N°13), donde nuestros resultados son similares a lo publicado por Barbosa ⁽¹⁴⁾ y Ventura ⁽¹⁷⁾, quienes evidenciaron un alto contenido de antioxidantes en el mesocarpio ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) hallando así la presencia de metabolitos como alcaloides, sesquiterpenlactonas, compuestos fenólicos (taninos, flavonoides cumarinas y quinonas) y al comparar los compuestos bioactivos hallados en nuestro estudio con la de ellos, se evidencia que no presentan las mismas cantidades ya pueda ser por un factor ambiental o sea la procedencia del fruto, puede influenciar en gran manera.

Por otro lado, en el estudio de toxicidad aguda oral, la administración del extracto acuoso del mesocarpio ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) en la dosis de 2000 mg/kg de peso corporal en las ratas, no produjo mortalidad, y tampoco se presentaron signos de toxicidad, sin cambios en la conducta de los animales durante los 14 días de observación. Esto apoya trabajos anteriores en donde los extractos no causan mortalidad ni daño; por ejemplo, el autor Córdova M ⁽¹⁰⁾ elaboró papilla a partir de la ***Cucurbita ficifolia*** B.

Los polifenoles y flavonoides están presentes en frutas, verduras, extractos vegetales y constituyen una excelente fuente de antioxidantes que pueden contribuir a restablecer el equilibrio prooxidante/antioxidante en una situación de estrés oxidativo⁽⁶³⁾⁽⁶⁴⁾.

Es necesario mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante en los organismos aerobios, porque están expuestos a la generación endógena de EROs o radicales libres, tales como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical oxidrilo (OH^{\cdot}), el óxido nítrico (NO), peróxidos (ROO^{\cdot}), los cuales dañan las diversas

estructuras celulares ⁽⁶⁵⁾. En esta situación es muy importante la acción de sustancias endógenas y exógenas que neutralizan dichos efectos nocivos de las EROs.

El hígado es el encargado de los procesos de detoxificación en fase I y fase II. En una intoxicación con paracetamol, su catabolismo principal por la fase II cambia a la fase I produciendo el radical NAPQI, que ocasiona daños en la arquitectura celular; al agotar la reserva de GSH (glutatión) y por la propagación de las EROS que no llegan a ser neutralizadas por los mecanismos antioxidantes, se establece una situación de estrés oxidativo y daño hepatocelular ⁽⁶⁶⁾⁽⁶⁷⁾.

En su mecanismo de detoxificación, el paracetamol puede sobrepasar las barreras antioxidantes y formar especies reactivas que tienen como su principal blanco los lípidos de las membranas celulares. Una manera de evaluar este daño es mediante la prueba de lipoperoxidacion ⁽⁶⁸⁾.

La formación de MDA-TBARS fue significativo entre el control positivo (silimarina) y el grupo de dosis 1000 mg/kg. En la tabla N°15 se observó los valores promedio de los tratamientos expresados en concentración de malonaldehído a la dosis de 250 mg/kg fue 210.40 ug/mL, mientras en la dosis de 500 mg/kg fue 161.83 ug/mL y por último en la dosis de 1000 mg/kg fue un valor promedio de 82.70 ug/mL, respectivamente, encontrándose diferencia altamente significativa ($P < 0.05$) en los grupos de tratamiento cuando fue comparado con el grupo control.

La administración del extracto acuoso del mesocarpio ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) en ratas holtzman, como el p-valor es menor que 0.05 existe evidencia estadística que afirma que existe efecto antioxidante al 95% de confianza.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1. En el extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) se identificó las siguientes clases de metabolitos secundarios: alcaloides, taninos y flavonoides.
2. Se determinó que la concentración de extracto acuoso del mesocarpio de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) a la dosis 1000 mg/kg tiene buena efectividad antioxidante en la lipoperoxidación lipídica de las ratas Holtzman inducidas por intoxicación por paracetamol.
3. El resultado obtenido entre el control positivo con tratamiento de silimarina fue 76.57 por ciento y el grupo con tratamiento del extracto acuoso de ***Cucurbita ficifolia*** B. a concentración de 1000 mg/kg fue 82.70 por ciento. Determinándose así resultados muy cercanos de efectividad antioxidante.

5.2 Recomendaciones

1. Realizar la elucidación estructural para conocer específicamente qué estructura química de las clases de metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) ayudan a la actividad antioxidante.
2. Desarrollar el estudio de la actividad antioxidante ***Cucurbita ficifolia*** B. (calabaza) con otros modelos experimentales con la finalidad de enriquecer aún más los conocimientos de su actividad antioxidante.

REFERENCIAS

1. Navarro VJ, Senior JR. Drug-Related Hepatotoxicity. *N Engl J Med.* 2006;354(7):731–9. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra052270>
2. Velázquez paniagua M, Prieto gomez B. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias* 75. 2004;36–43.
3. Favari L, et al. Efectos hepatoprotector y antioxidante de *Taraxacum officinale* en el daño hepático agudo inducido por el tetracloruro de carbono en la rata. *Rev Mex Ciencias Farm.* 2013;44(4):53–61. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952013000400007
4. Troncoso L, Guija E. Efecto hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol. *An la Fac Med.* 2007;68(4):333–43.
5. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 119(6):598–620.
6. Pereira MC, Steffens RS, Jablonski A, Hertz PF, De O. Rios A, Vizzotto M, et al. Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the Myrtaceae family. *J Agric Food Chem.* 2012;60(12):3061–7.
7. Paredes Salido F, Roca Fernández JJ. Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *Offarm.* 2002;21(07):96–100. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-influencia-los-radicales-libres-el-13034834>

8. Caja Costarricense de Seguro Social, et al. Hepatotoxicidad por medicamentos. Hosp San Juan Dios. 2015;5(8):1–7. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revcliescmed/ucr-2016/ucr162n.pdf>
9. Caballero J. Efecto hepatoprotector de la almendra de semillas de Cucurbita maxima (zapallo macre) en ratas [Internet]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/cybertesis/3946/Caballero_cj.pdf
10. Cordoba M. Determinacion de parametros adecuados para la elaboracion de una papilla a partir de zambumba (Cucurbita ficifolia) [Internet]. Universidad Nacional de Piura; 2013. Disponible en: <http://repositorio.unp.edu.pe/handle/UNP/369>
11. Castillo E, Castillo S, Reyes C. Estudio fitoquímico de Plukenetia volubilis L . y su efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por Fe+3/ascorbato en hígado de Rattus rattus var. albinus. UV-Scientia . 2010;2(1):11–21. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6181502>
12. Saket C, Mruna S, Ram S, Siva N. Modulatory Effect of Dietary Inclusion of Aegle marmelos Fruits against Cisplatin - Induced Hepatotoxicity In Wistar Rats. Ann Hepatol. 2018;17(3):482–9. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6181502>
13. Gonzales J. Caracterizacion quimica de Cucurbita ficifolia Bouche y su efecto hipoglucemico mediado por almacenamiento del glucogeno hepatico [Internet]. Universidad Autonoma Metropolitana Unidad Iztapalpa; 2017. Disponible en: <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI19075.pdf>
14. Barbosa L. Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en calabazas-gila (Cucurbita ficifolia Bouche). Universidad de Brasilia; 2015.
15. Madkour, F & Abdel-Daim, M. Hepatoprotective and Antioxidant Activity of Dunaliella salina in Paracetamol-induced Acute Toxicity in Rats. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 2013;75(6): 642–648.

16. Salinas N, et al. Efecto antioxidante de extracto de Cucurbita ficifolia Bouche relacionado con los niveles de polifenoles. Rev Latinoamer Quim. 2012;39.
17. Ventura L. Evaluación Fitoquímica e Hipoglucemiante de *Curcubita ficifolia* y *Teucrium chamaedrys*. Insituto Politecnico Nacional; 2012.
18. Sistema de informacion de Organismos vivos y Modificados (SIOVM). Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. CONABIO“Fig leaf squash”. Disponible en:http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20833_especie.pdf.
19. Nee M. Flora de Veracruz. Instituto de Ecologia, editor. Veracruz; 1993.
20. Lira R, Montes S. La agricultura en Mesoamerica. Cucurbitas (*Cucurbita* spp). Mexico DF; 2007.
21. Stevens W, et al. Flora de Nicaragua. Missouri Botanical Garden Press, editor. Missouri; 2001.
22. Rodriguez L. Flora del valle de Tehuacan-Cuicatlan. Instituto de Biologia UNA de M, editor. Mexico; 1999.
23. Reategui K. Obtencion de carbon activado a partir de la cascara del fruto de la calabaza (*Curcubita ficifolia* Bouche). Universidad Nacional Agraria La Molina; 2017. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/2882>
24. United States Departament of Agriculture. National Nutrient Database for Standard Reference [Internet]. 2014. Disponible en: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>
25. CONABIO. *Curcubita ficifolia*. Sistema de información de organismo vivos modificados (siovm) [Internet]. Disponible en: Mexico; 2010. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20833_especie.pdf
26. Leiva S, Bazan G, Chang L. Cucurbitáceas utilizadas como alimento en el Perú Prehispánico. *Arnaldoa*. 2015;22(2):439–78.

27. Andrade-cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol*. 2005;99:325–48.
28. Martínez CD, Vargas CR, Arancibia SR. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM*. 2003;46(6):229–2235.
29. Rodríguez J, Menéndez J, Trujillo Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cuba Med Milit*. 2001;30(1):36–44.
30. Pérez P, Pérez J. Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev [Internet]*. 29(3):192–8.
31. Lozada SM, García L. Estrés oxidativo y antioxidantes: cómo mantener el equilibrio. *Rev Asoc Col Dermatol*. 2009;17:172–9.
32. Guerra M. Radicales libres y estrés oxidativo. *Lab Actual*. 2009;25(41):41–8.
33. Corrales LC, Muñoz M. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Ciencias Biomed*. 2012;10(18):213–25.
34. Sánchez-valle V, Méndez-sánchez N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev Invest Med Sur Mex*. 2013;20(3):161–8.
35. Tortora G, Grabowski S. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 9ª ed. C.V E grafico S. de, editor. México; 2002.
36. Ross M, Paulina W. *Histología Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. Panamericana M, editor. Buenos Aires; 2008.
37. Florez J. *Farmacología Humana*. México DF; 2003. 204-205 p.
38. Guyton A. *Tratado de Fisiología Médica*. 10ª ed. Mc Graw-Hill Interamericana, editor. México DF; 2001. 961-966 p.
39. Guimaro A. *Enciclopedia de las plantas que curan*. 2ª ed. Conselho, editor. São Paulo-Brasil; 1994. 184-185 p.
40. Guyton A. *Tratado de Fisiología Médica*. 12ª ed. Editorial Elsevier, editor. 2006. 819, 823 p.

41. Zimmerman H. Hepatotoxicity: The adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver. New York; 1978.
42. Leitner JM, Graninger W, Thalhammer F. Hepatotoxicity of Antibacterials : Pathomechanisms and Clinical Data. Infection [Internet]. 2010;38(1):3–4. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs15010-009-9179-z>
43. Segado S, Bandres F, Gomez F. Revision actualizacion en marcadores biologicos del etilismo. Med del Trab. 2002;73–84.
44. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S. Paracetamol : New Vistas of an Old Drug. CNS Drug Rewies. 2006;12(3):250–75.
45. Haddad Y, Vallerand D, Brault A, Haddad PS. Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Silibinin in a Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. Evidence-Based Complement Altern Med. 2011;2011:1–11.
46. Machacca F. Efecto Toxicologico del jincho jincho (*Heracium neoherrerae*), altamisa (*Ambrosia arborescens*), dientes de leon (*Taxacum officinales*), huira huira (*Pseudogmaphalium spicatum*) y mischico (*Bidens andicola*) en ratas (Wistar). Universidad Nacional del Altiplano; 2014.
47. Netter F. Atlas de Anatomia Humana. 5ª ed. Elsevier, editor. Madrid; 2011.
48. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea. 2006;(494):161–72. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/atenea/n494/art10.pdf>
49. Ayala M. Enzimas: aceleradores de reacciones químicas en las células y en la industria. Revista Digital Universitaria.2014;15(12) .Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/editorial/>
50. Muñoz M, Ramos F, Alvarado C, Castañeda B. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenolicos en recursos vegetales promisorios. Rev Soc Quim Peru. 2007;73(3):142–9.

51. Silverthorn. Fisiología Humana: Un enfoque integrado. 6ª ed. Editorial Medica Panamericana, editor. 2014.
52. Real Academia Española. (2014). Diccionario de la lengua española (22.ª ed.). Consultado en: <https://dle.rae.es/?id=IXxev3t>
53. UChicago Medicine. Biblioteca de salud del Adulto. 2018. Disponible en: <http://healthlibrary.uchospitals.edu/Spanish/DiseasesConditions/Adult/Liver/85,P03769>
54. Manterola C, Del Sol M, Ottone N, Otzen T. Anatomía Quirúrgica y Radiológica del Hígado . Fundamentos para las Resecciones Hepáticas. Int J Morphol. 2017;35(4):1525–39.
55. Ministerio de Sanidad y Consumo, Organización Mundial de la Salud. Glosario de terminos de alcohol y drogas [Internet]. Madrid; 1994. Disponible en: https://www.who.int/substance_abuse/terminology/lexicon_alcohol_drugs_spanish.pdf
56. Real Academia Española. (2014). Diccionario de la lengua española (23.ª ed.). Consultado en: <https://dle.rae.es/?id=P30La5b>
57. Guyton A. Tratado de Fisiología Médica. 13ª ed. Editorial Elsevier, editor. España; 2016. 2068 p.
58. Perez G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Rev Cuba Invest Biomed. 2003;22(1):48–57.
59. Coronado M, Vega L, Gutierrez R, Vazquez M, Radilla C. Antioxidantes : perspectiva actual para la salud humana. Rev Chil Nutr. 2015;42(7):206–12.
60. Contesse B. Evaluación de la lipoperoxidación in vitro, a través de las reacciones del 3-metil-2-benzotiazolidon hidrazona (MBTH) y del ácido tiobarbitúrico (TBARS). [Internet]. Universidad de Chile; 2010.
61. OECD. Acate Oral Toxicity. 1999, OECD Guidelines for Testing of chemicals: OECD, Paris, France.

62. Pintado B. Diseño experimental y consideraciones sobre el tamaño de muestra. Artículo Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM). 2014;(62):16-21.
63. Jain A *et al.* Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic and aqueous extracts of *Momordica dioica* Roxb . leaves. *J Ethnopharmacol.* 2008;115:61–6.
64. Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic Antioxidants. *Crit Rev Food Nutr.* 1992;32(1):67–103.
65. Yi-Hang *et al.* Regulatory effect of *Lagdera alata* extract on immune mediated liver injury. *J Medicinal Plants Res.* 2011;5(12):2494-8.
66. Kinoshita S. *et al.* Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, *Terminalia catappa* L. from Okinawa Island and its tannin corilagin. *Phytomed.* 2007;14(11):755-62.
67. Samudram P. *et al.* Hepatoprotective activity of Bi – herbal ethanolic extract on CCl_4 induced hepatic damage in rats. *Afr J Biochem Res.* 2008;2(2):61-5.
68. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.

ANEXO

ANEXO 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA

ESTUDIO DEL EXTRACTO ACUOSO DEL MESOCARPIO DE *Cucurbita ficifolia* B. (CALABAZA) Y SU EFECTO ANTIOXIDANTE EN LA LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA POR PARACETAMOL EN HÍGADO DE RATAS HOLTZMAN

PROBLEMAS	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	INDICADORES	METODOLOGÍA	INSTRUMENTOS
GENERAL	GENERAL	GENERAL	VI:	VI:	Diseño:	Ficha de
¿El extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B. (calabaza) poseerá efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman?	Determinar si el extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B. (calabaza) posee efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman.	El extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B. (calabaza) posee efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman.	Extracto acuoso del mesocarpio <i>Cucurbita ficifolia</i> B.	- Concentraciones a evaluar: 250mg/Kg 500mg/Kg 1000mg/Kg Paracetamol 200mg/Kg Silimarina 40 mg/Kg	Experimental mixta	Observación Ad Hoc
ESPECÍFICOS	ESPECÍFICOS	ESPECÍFICOS	VD:	VD:	Tipo:	
1. ¿El extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B. (calabaza) presentará algunas clases de metabolitos secundarios?	1. Identificar las clases de metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B. (calabaza).	1. El extracto acuoso del mesocarpio <i>Cucurbita ficifolia</i> B. (calabaza) presenta varias clases de metabolitos secundarios.			Aplicada	
2. ¿Cuál será la concentración óptima del extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B. (calabaza) que posee efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman?	2. Determinar la concentración óptima del extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B. (calabaza) con efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman.	2. Existe una concentración óptima del extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B. (calabaza) con efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman.	Efecto antioxidante	Determinación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBars) o radicales libres.	Nivel: Explicativo	
3. ¿Poseerá efecto antioxidante el extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B. (calabaza) en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman comparado con el fármaco silimarina?	3. Comparar el efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman del extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B. (calabaza) con el efecto del fármaco silimarina.	3. El extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B. (calabaza) posee efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en el hígado de ratas Holtzman en relación al fármaco silimarina.	V. INT.	V. INT.	Población: Ratas Holtzman y fruto de <i>Cucurbita ficifolia</i> B.	
			Peso de las ratas	Gramos de peso de las ratas	Muestra	
					Extracto acuoso del mesocarpio de <i>Cucurbita ficifolia</i> B.	
					Técnicas:	
					Estadístico de Anova y Tukey.	
					Control(+) silimarina	
					Fármaco hepatotóxico	
					Paracetamol.	

ANEXO 2: CERTIFICADO BOTÁNICO

  **UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL 

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N°263 -USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (fruto), recibida de Sara Noemí León Quispe y Sebastián Vasquez Vasquez estudiante de la Facultad de Ciencias farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega; ha sido estudiada y clasificada como *Cucurbita ficifolia* Bouché; y tiene la siguiente posición taxonómica; según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: DILLENIIDAE

ORDEN: VIOLALES

FAMILIA: CUCURBITACEAE

GENERO: *Cucurbita*

ESPECIE: *Cucurbita ficifolia* Bouché

Nombre vulgar: "Calabaza"
Determinado por Mag. Asunción A. Cano Echevarría

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 05 de julio de 2018

 
Mag. ASUNCION A. CANO ECHEVARRIA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)


ACE/ddb

Av. Arevalo 1256, Jesús María
Apto. 14-0434, Lima 14, Perú

Teléfono:
679-7000 anexo 5701, 5703, 5704

E-mail: museohistoria@unmsm.edu.pe
http://museohistoria.unmsm.edu.pe

ANEXO 3: CONSTANCIA DE PRÁCTICA

 UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Servicio de Control de Calidad

Lima, 15 de julio del 2018

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.


S.D.

Mediante la presente se pone en conocimiento lo siguiente:

La Bachiller Srta. León Quispe, Sara y el Sr. Vásquez Vásquez, Sebastián, egresados de la facultad de ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la prestigiosa Universidad Inca Garcilaso de la Vega; están haciendo su tesis de Investigación en "Estudio del extracto acuoso del mesocarpio de *Curcubita ficifolia* B. y su efecto Antioxidante en la lipoperoxidación inducida por paracetamol en hígado de ratas Holtzman" en los laboratorios de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Se expide este documento para fines pertinentes.

Atentamente,



Q.F. ERIK OLIVAR GALLEGOS
Coordinador de Aseguramiento de la Calidad

UNIVERSIDAD ACREDITADA INTERNACIONALMENTE CON MENCIÓN ESPECIAL EN
INVESTIGACIÓN

ANEXO 4. TESTIMONIOS FOTOGRÁFICOS

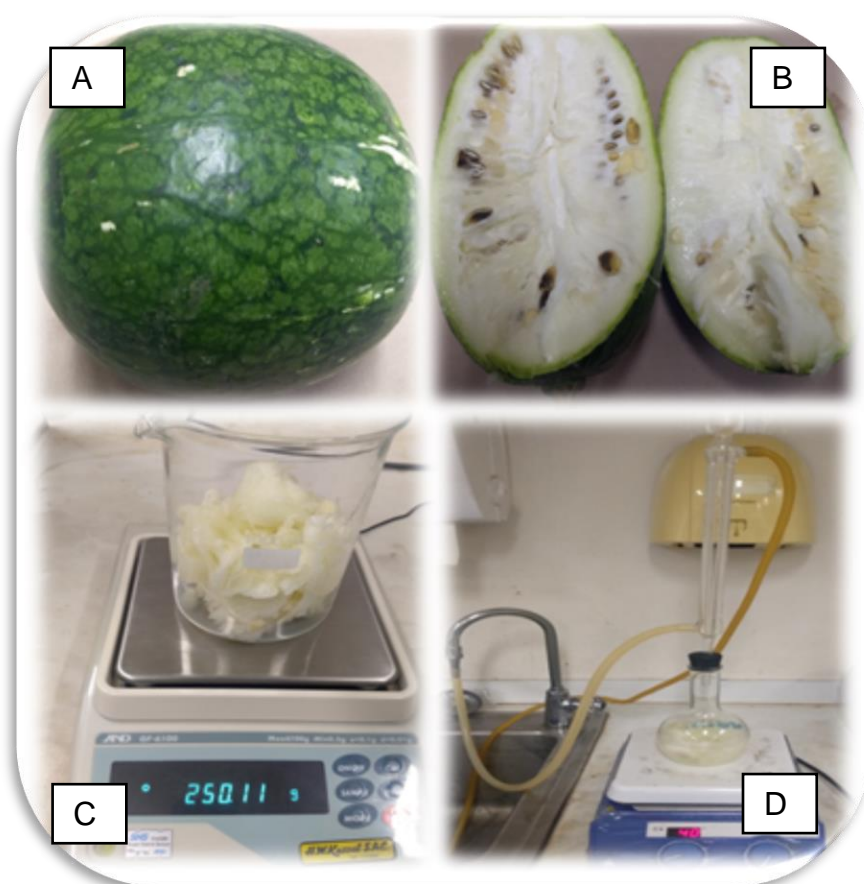


Figura N°9 Extracción Acuosa del mesocarpio de la Calabaza.

- A.- Fruto seleccionado de *Cucurbita ficifolia* B. procedió el lavado para eliminar las impurezas.
- B.- pelar de manera manual y separar la cáscara y las semillas.
- C.- Pesado del fruto de la Calabaza para posteriores cálculos.
- D.- Extracción Acuosa del mesocarpio de la Calabaza.

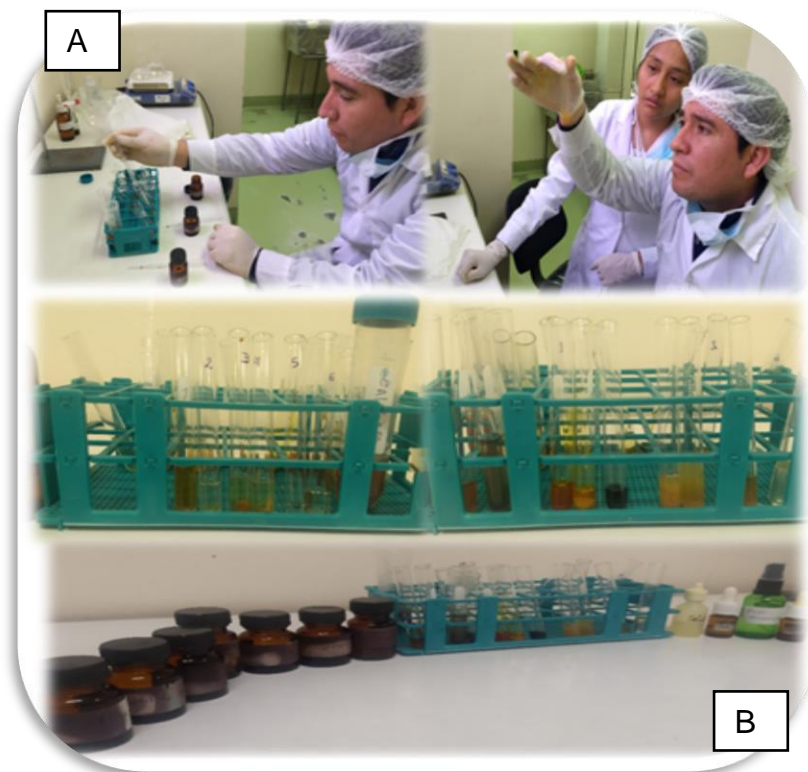


Figura N°10 Marcha Fitoquímica del mesocarpio de la Calabaza.

A.- Se procede a poner la muestra en os tubos de ensayo y acto seguido se hechan los reactivos siempre comparandolos con un blanco.

B.- Se procede a verificar los resultados obtenidos.

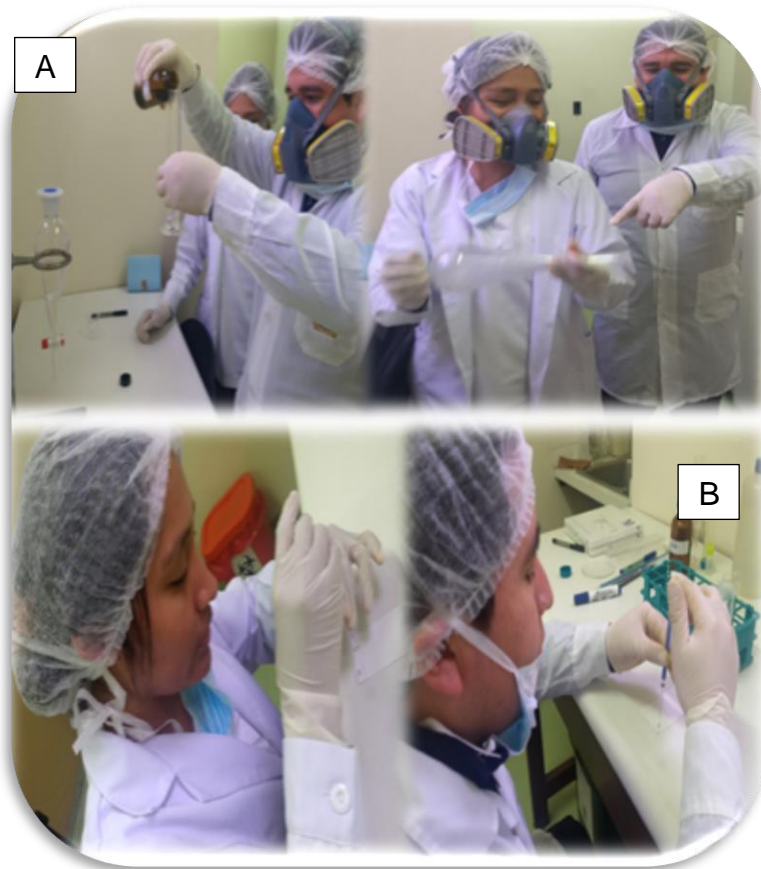


Figura N°11 Prueba de Cromatografía en Capa Fina alcaloides y flavonoides.

A.-Preparando el reactivo de BAW (butanol-ácido acético glacial-agua) para la prueba de flavonoides y para alcaloides (metanol-agua).

B.- Aplicación de los estándares de Quercetina y Cafeína con sus respectivas muestras de Calabaza.



Figura N°12 Cromatografía en Capa Fina y la observación de las manchas.



Figura N°13 Intoxicación hepática con Paracetamol y la administración de los tratamientos.



Figura N°14 Determinación de TBARS en homogenizado de hígado de ratas.

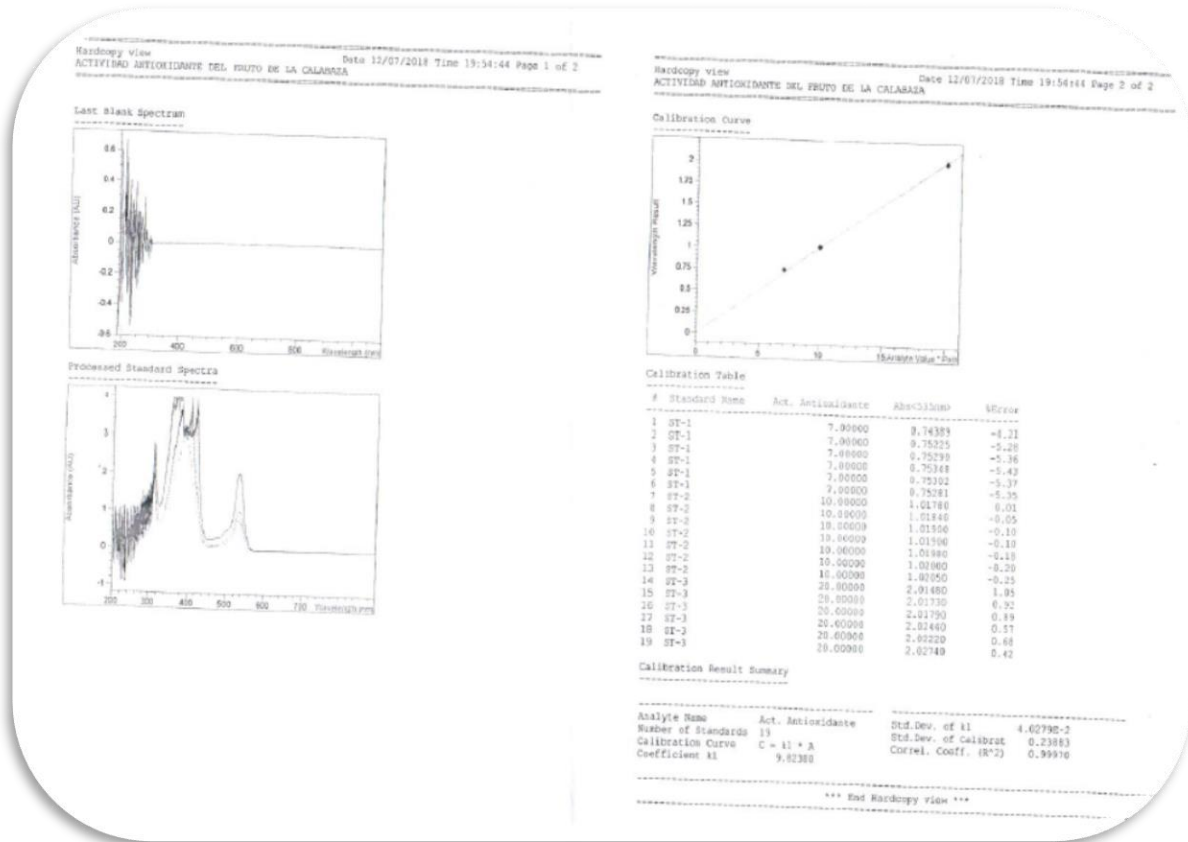


Figura N°15 Cuantificación de antioxidante de la calabaza en espectrofotometría

ANEXO 5: RECOLECCIÓN DE DATOS



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA

FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE PRUEBA DE SOLUBILIDAD

ESTUDIO DEL EXTRACTO ACUOSO DEL MESOCARPIO DE *Cucurbita ficifolia* (CALABAZA) Y SU EFECTO ANTIOXIDANTE EN LA LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA POR PARACETAMOL EN HIGADO DE RATAS HOLTZMAN

INSTRUCCIONES:

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea

PRUEBA DE SOLUBILIDAD DE LA CALABAZA		
N°	Solventes	Resultado
1.	Alcohol de 96°	
2.	Metanol	
3.	Cloroformo	
4.	Agua	
5.	Isopropanol	

Leyenda:

Soluble (S°); Insoluble (INS°)



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA

CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCION DE DATOS
HOJA DE VALIDACION POR EXPERTOS
ESTUDIO DEL EXTRACTO ACUOSO DEL MESOCARPIO DE *Cucurbita ficifolia*
(CALABAZA) Y SU EFECTO ANTIOXIDANTE EN LA LIPOPEROXIDACIÓN
INDUCIDA POR PARACETAMOL EN HIGADO DE RATAS HOLTZMAN

N° 1

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

MENOS DE

50 - 60 - 70 - 80 - 90 - 100

1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?..... () () () () () (X)
2. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?..... () () () () () (X)
3. ¿Qué porcentaje de un ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?..... () () () () (X) ()
4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?..... () () () () () (X)
5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia logica?..... () () () () () (X)
6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?..... () () () () () (X)

Promedio: 100

SUGERENCIAS:

1. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?

Ninguno

2. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?

Ninguno

3. ¿Qué ítems considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

Ninguno

Fecha:

Validado por:

Mg. Q.F. Tac, Henry Montellanos Cabrera
QUÍMICO FARMACÉUTICO
C.O.F.P. 7970
DNI: 25796867
R.N.E. 030



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA

FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE LA MARCHA FITOQUIMICA

ESTUDIO DEL EXTRACTO ACUOSO DEL MESOCARPIO DE *Cucurbita ficifolia*
(CALABAZA) Y SU EFECTO ANTIOXIDANTE EN LA LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA POR
PARACETAMOL EN HIGADO DE RATAS HOLTZMAN

INSTRUCCIONES :

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea.

MARCHA FITOQUÍMICA DE LA CALABAZA				
Nº	Metabolito	Reactivo de Reacción	Reacción Positiva	Resultado
1.	CARBOHIDRATOS	Fehling A y Fehling B	Precipitado anaranjado ladrillo	
2.	ALMIDÓN	Lugol	Coloración oscura	
3.	CETONAS	2,4 DNPH	Formación de anillo rojizo	
4.	AMINOACIDO	Ninhidrina	Formación de color oscuro	
5.	ALCALOIDES	Mayer	Precipitado blanco	
		Wagner	Precipitado marrón	
		Dragendorff	Precipitado rojo o naranja	
		Scheibler	Precipitado blanco	
		Sonneschein	Precipitado naranja	
		Reineckato	Coloración rosa	
6.	COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl ₃	Coloración verde	
7.	TANINOS	Gelatina 1%	Precipitado denso blanco	
8.	FLAVONOIDES	Shinoda	Flavanoles: Rojo a magenta	
9.	NAFTAQUINONAS, ANTRAQUINONAS Y ANTRANONAS	Bortranger (NaOH 5%)	Coloración roja	

Leyenda:

(-) : Nula

(++) : Regular

(+) : Poco

(+++): Bastante



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA

N° 2

CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCION DE DATOS
HOJA DE VALIDACION POR EXPERTOS
ESTUDIO DEL EXTRACTO ACUOSO DEL MESOCARPIO DE *Cucurbita ficifolia*
(CALABAZA) Y SU EFECTO ANTIOXIDANTE EN LA LIPOPEROXIDACIÓN
INDUCIDA POR PARACETAMOL EN HIGADO DE RATAS HOLTZMAN

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

MENOS DE

50 - 60 - 70 - 80 - 90 - 100

1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?.....() () () () () (X)
2. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?.....() () () () () (X)
3. ¿Qué porcentaje de un ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?.....() () () () (X) ()
4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?.....() () () () () (X)
5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia logica?.....() () () () () (X)
6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?.....() () () () () (X)

Promedio: 100

SUGERENCIAS:

1. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?

Ninguno

2. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?

Ninguno

3. ¿Qué ítems considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

Ninguno

Fecha:

Validado por:

[Signature]
Mg. Q.F. Taz, Henry Montellanos Cobena
QUÍMICO FARMACÉUTICO
C.O.F.P. 7870
DNI: 25796987
R.N.E. 030



N° 2

**CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCION DE DATOS
HOJA DE VALIDACION POR EXPERTOS
ESTUDIO DEL EXTRACTO ACUOSO DEL MESOCARPIO DE *Cucurbita ficifolia*
(CALABAZA) Y SU EFECTO ANTIOXIDANTE EN LA LIPOPEROXIDACIÓN
INDUCIDA POR PARACETAMOL EN HIGADO DE RATAS HOLTZMAN**

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

MENOS DE

50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100

1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se logran los objetivos propuestos?.....() () () () () (X)
2. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?.....() () () () () (X)
3. ¿Qué porcentaje de un ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?.....() () () () (X) ()
4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?.....() () () () () (X)
5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica?.....() () () () () (X)
6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?.....() () () () () (X)

Promedio : 100

SUGERENCIAS :

1. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?

Considero que los ítems propuestos son los adecuados

2. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?

Considero que los ítems propuestos son los adecuados

3. ¿Qué ítems considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

Considero que los ítems propuestos para fluorescencia deberían ser más detallado con reactivos más específicos

Fecha: 18-10-2018

Validado por:

[Firma]
José Luis Naccha Cuba
QUIMICO FARMACEUTICO
C.Q.F.P. 20362



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA

ESTUDIO DEL EXTRACTO ACUOSO DEL MESOCARPIO DE *Cucurbita ficifolia*
(CALABAZA) Y SU EFECTO ANTIOXIDANTE EN LA LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA POR
PARACETAMOL EN HIGADO DE RATAS HOLTZMAN

INTRUCCIONES:

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea

TABLA

RECOLECCIÓN DE DATOS PARA DETERMINAR EL EFECTO ANTIOXIDANTE EN LA
LIPOPEROXIDACIÓN

Metodología Aplicada a cada análisis de Hígado por grupo ensayado	Tabla: RECOLECCIÓN DE DATOS PARA DETERMINAR EL EFECTO ANTIOXIDANTE EN LA LIPOPEROXIDACIÓN				
	Mediciones en el Espectrofotómetro Uv-vis				
	Concentración 250 mg/Kg	Concentración 500 mg/Kg	Concentración 1000 mg/Kg	Control positivo (Silimarina)	Control negativo (sin tratamiento)
Promedio de las Absorbancias obtenidas					
Promedio de Concentración de la muestra					
Conversiones por el factor					



HOJA DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO

N° 3

CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCION DE DATOS
HOJA DE VALIDACION POR EXPERTOS
ESTUDIO DEL EXTRACTO ACUOSO DEL MESOCARPIO DE *Cucurbita ficifolia*
(CALABAZA) Y SU EFECTO ANTIOXIDANTE EN LA LIPOPEROXIDACIÓN
INDUCIDA POR PARACETAMOL EN HIGADO DE RATAS HOLTZMAN

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

MENOS DE

50 - 60 - 70 - 80 - 90 - 100

1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?..... () () () () () (X)
2. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?..... () () () () () (X)
3. ¿Qué porcentaje de un ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?..... () () () () (X) ()
4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?..... () () () () () (X)
5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia logica?..... () () () () () (X)
6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?..... () () () () () (X)

Promedio: 100

SUGERENCIAS:

1. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?

Ninguno

2. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?

Ninguno

3. ¿Qué ítems considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

Ninguno

Fecha:

Validado por:

Mg. Q.F. Tar, Henry Montellanos Cabrera
QUÍMICO FARMACÉUTICO
C.O.F.P. 7970
DNI: 25796967
R.N.E. 030

