

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
(Nuevos tiempos, nuevas ideas)



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

**“EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA
PULPA DEL FRUTO DE *Persea americana Miller* (palta) EN
RATAS ALBINAS CEPA HOLTZMAN, CON INTOXICACIÓN
HEPÁTICA INDUCIDA POR PARACETAMOL”**

**Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico y
Bioquímico**

TESISTAS:

Bachiller. Malpartida Trelles, Sofía Karol

Bachiller. Tataje Nieto, Jhefferson Alberto

ASESOR: Mg. José Fernando Salvador Carrillo

LIMA - PERÚ

2 0 1 9

DEDICATORIA

A mis padres, que con todo su amor y esfuerzo me dieron su apoyo y ejemplo como profesionales para culminar mis estudios satisfactoriamente.

A mi familia en general quienes siempre estuvieron a mi lado para guiarme a ser una mejor persona cada día.

A mi novio por su confianza y amor ya que juntos supimos salir adelante y apoyarnos en el ámbito profesional, a mis amigos, compañeros de estudio y a todas las personas que de alguna u otra manera contribuyeron para lograr mis objetivos.

Sofía Karol Malpartida Trelles

A mis padres, quienes son un soporte fundamental tanto en mi vida personal como profesional, por brindarme sus consejos, confianza y recursos para lograr mí meta.

A mis abuelos y familia por el apoyo recibido día a día durante toda mi etapa universitaria.

A mi novia por siempre estar a mi lado apoyándome durante todo este tiempo dado para realizar este proyecto y a todas las personas que contribuyeron a lograr mis metas.

Jhefferson Alberto Tataje Nieto

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, ya que durante el transcurso de nuestra carrera nos brindó los mejores ambientes y formación académica, a cada uno de nuestros maestros que nos transmitieron sus conocimientos y dedicación ayudándonos de esa manera a formarnos como profesionales dedicados al servicio de la salud.

A nuestros asesores por todo el apoyo durante todas las etapas de desarrollo y culminación del presente trabajo. Por la generosidad con el apoyo de orientación a través de sus conocimientos y experiencia. A todos nuestros amigos y futuros colegas que compartieron su día a día durante toda esta etapa universitaria.

A todas las personas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por su profesionalismo y facilidades dadas durante la realización de nuestra investigación.

ÍNDICE

Acta de sustentación

Dedicatoria

Agradecimiento

Índice de tablas

Índice de figuras

Índice de anexos

Resumen

Abstract

	Página
Introducción.....	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
1.1. Descripción de la realidad problemática.....	4
1.2. Problema.....	5
1.2.1. Problema general.....	5
1.2.2. Problemas específicos.....	5
1.3. Objetivos de la investigación.....	5
1.3.1. Objetivo general.....	5
1.3.2. Objetivos específicos.....	5
1.4. Justificación.....	6
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.....	10
2.2. Bases teóricas y/o legales.....	12
2.2.1. Descripción general <i>Persea americana Miller</i> "Palta"....	12
2.2.2. Paracetamol.....	15

2.2.3. Silimarina.....	20
2.3. Hipótesis.....	24
2.3.1. Hipótesis general.....	24
2.3.2. Hipótesis específicas.....	24
2.4. Definición de términos básicos.....	25
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....	27
3.1. Tipo y diseño de investigación.....	27
3.2. Población y muestra.....	28
3.3. Equipos, materiales y reactivos.....	28
3.4. Procedimiento experimental.....	29
3.4.1 Parte Fitoquímica.....	29
3.4.2 Parte Farmacológica.....	35
3.5. Procesamiento de datos.....	39
CAPÍTULO IV: RESULTADOS.....	40
4.1. Presentación.....	40
4.1.1 Contrastación de hipótesis.....	49
4.2. Discusión.....	52
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	54
5.1. Conclusiones.....	54
5.2. Recomendaciones.....	54
REFERENCIAS.....	55
ANEXOS.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 01: La Operacionalización de Variables.	25
Tabla 02: Marcha fitoquímica.	33
Tabla 03: Prueba de solubilidad	34
Tabla 04: Tratamiento de Toxicidad Aguda.	36
Tabla 05: Tratamiento del Efecto Antioxidante	37
Tabla 06: Marcha fitoquímica de <i>Persea americana Miller</i> "Palta"	40
Tabla 07: Prueba de solubilidad de <i>Persea americana Miller</i> "Palta"	41
Tabla 08: Prueba de cromatografía en capa fina de <i>Persea americana Miller</i> "Palta"	42
Tabla 09: Toxicidad Aguda Oral	42
Tabla 10: Resultado de TBars	43
Tabla 11: Resultado de Análisis de Varianza a los resultados de TBars a todas las concentraciones de <i>Persea americana Miller</i> (Palta)	44
Tabla 12: Resultado del estadístico de Tukey a todas las concentraciones de <i>Persea americana Miller</i> (Palta) y Silimarina	45
Tabla 13: Resultado de T-Student de una muestra y Wilcoxon a todas las concentraciones ensayadas	47
Tabla 14: Porcentaje de los resultados	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura N° 1: <i>Persea americana</i> Miller “Palta”	12
Figura N° 2: Molécula de Paracetamol	15
Figura N° 3 Molécula de Silimarina	20
Figura N° 4: Diseño experimental en la línea de tiempo	27
Figura N° 5: Gráfica de distribución de datos de las diferencias en Valor absoluto	46
Figura N° 6: Gráfica de los porcentajes del Efecto Antioxidante	48

ÍNDICE DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 01:	Matriz de Consistencia	58
Anexo 02	Certificado del análisis botánico de la planta	59
Anexo 03:	Fotos del Trabajo realizado	60
Anexo 04:	Fichas de Observación	67

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto antioxidante del extracto acuoso de la pulpa de *Persea americana Miller* "Palta" en ratas albinas cepa Holtzman. Para ello, se indujo daño hepático agudo producido por paracetamol en ratas albinas machos y fueron divididos en 6 grupos (n=5, cada grupo). El primer grupo fue sin inducción ni tratamiento alguno (grupo control negativo), el segundo grupo fue inducido con paracetamol sin tratamiento, el tercer grupo fue tratado con silimarina a la dosis de 20 mg/kg (grupo control positivo) y los grupos experimentales fueron tratados a 3 diferentes dosis del extracto vegetal (250, 500 y 1000 mg/kg peso corporal). El tratamiento tuvo una duración de 21 días y al final del ensayo los animales fueron pesados y sacrificados por dislocación cervical para el estudio de sus respectivos hígados. Después, se procedió a la determinación de TBARS (que se basa en la medición de sustancias reactivas al ácido Tiobarbitúrico con formación del complejo Tiobarbitúrico - Malonaldehído (MDA)). Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente y se encontró que los animales que recibieron el tratamiento con el extracto acuoso de la pulpa de la *Persea americana Miller* (palta) presentaron menos niveles de MDA, marcador de estrés oxidativo, en comparación con el grupo control ($p < 0,05$). Por lo tanto, se concluye que el extracto acuoso de la pulpa de la *Persea americana Miller* (palta) presenta efecto antioxidante en el modelo de inducción de hepatotoxicidad aguda por paracetamol.

Palabras clave:

Efecto antioxidante, *Persea americana Miller*, hepatotoxicidad.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the antioxidant effect of the aqueous extract of the pulp of *Persea americana Miller* "Palta" in albino rats Holtzman strain. For this, acute liver damage caused by paracetamol was induced in male albino rats and were divided into 6 groups (n = 5, each group). The first group was without any induction or treatment (negative control group), the second group was induced with paracetamol without any treatment, the third group was treated with silymarin at the dose of 20 mg / kg (positive control group) and the experimental groups were treated at 3 different doses of the plant extract (250, 500 and 1000 mg / kg body weight). The treatment lasted 21 days and, at the end of the trial, the animals were weighed and slaughtered by cervical dislocation for the study of their respective livers. Then, TBARS assay was determined (which is based on the measurement of thiobarbituric acid reactive substances with formation of the Thiobarbituric - Malonaldehyde (MDA) complex). The results obtained were statistically analyzed and it was found that the animals that received the treatment with the aqueous extract of the pulp of the *Persea americana Miller* (palta) had lower levels of MDA, oxidative stress marker, compared to the control group (p <0.05). Therefore, it is concluded that the aqueous extract of the pulp of the *Persea americana Miller* (palta) has an antioxidant effect in the induction model of paracetamol acute hepatotoxicity.

Keywords:

Antioxidant effect, *Persea americana Miller*, hepatotoxicity.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los últimos estudios han demostrado que las enfermedades degenerativas y/o metabólicas tienen relación directa con la formación de radicales libres y agentes pro oxidante; entre las que se encuentran: cáncer, hipertensión arterial, arteriosclerosis, artritis reumatoide, catarata senil, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, Kwashiorkor, procesos de inflamación y el envejecimiento dando la enfermedad de Alzheimer. ^(1, 2)

Es así que el organismo tiene un sistema de resguardo como es el antioxidante que impide que los radicales libres se formen, bloqueándolos e impidiendo su propagación entre ellos. Este sistema lo componen: el superóxido dismutasa, la catalasa, el glutatión reductasa y peroxidasa, proteínas, glucosa, ácido úrico, grupos sulfidrilos (-SH), entre varios. Es posible también que el hombre puede ingerir algunas sustancias con capacidad antioxidante como: vitamina E, vitamina C, flavonoides, polifenoles, β -caroteno, Dimetil sulfóxido y otros más, que pueden ser de origen natural o sintético. ⁽²⁾

Pero también se debe tener en cuenta que algunos compuestos, en la mayoría químicos, que se ingieren en la dieta diaria y algunas sustancias sumamente tóxicas como las radiaciones electromagnéticas, el humo del cigarrillo, y sobre todo hablando farmacológicamente el paracetamol pueden afectar el organismo generando radicales libres, dañando lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y proteínas generando daños seriamente en las membranas celulares. ⁽²⁾

El paracetamol es muy utilizado en numerosos estudios, encontrándose en ratas y ratones de experimentación pues tiene la propiedad de inducir lipoperoxidación y un daño irreversible en el hepatocito, en su mayoría causados por radicales libres. ⁽¹⁾

La producción de estos radicales libres, son una de las causas del daño hepático y sumándole a esto la ingesta de drogas (por automedicación), ya se está transformando en un problema para la salud, siendo este el principal causante debido a que representa aproximadamente el 10% de casos de muerte por insuficiencia hepática aguda a nivel mundial. ⁽³⁾

En este sentido, el empleo de plantas medicinales que asumimos con fines curativos se ha hecho una práctica que se ha venido empleando desde nuestros ancestros. El interés por el estudio y uso de plantas medicinales ha aumentado porque tienen un efecto protector sobre la hepatotoxicidad inducida por drogas. En su mayoría contienen: antioxidantes, flavonoides y polifenoles, los cuales disponen gran actividad antioxidante. ⁽¹⁾

El consumo de alimentos antioxidantes es un importante factor protector de la salud. Algunos estudios in vitro han demostrado que las plantas como la fresa presentan efecto antioxidante, al igual que el perejil y mucho mayor que otros alimentos, como limón, naranja, brócoli, pimiento, cebolla china, ajos, cebolla, betarraga, hojas de coca y anís.

Todo esto nos lleva a suponer que los alimentos poseen efecto antioxidante, esto es debido a su composición química, en donde suelen ser utilizados para prevenir la hepatotoxicidad generada por algunas drogas, como es el caso del paracetamol, que tiene como mecanismo patogénico la intervención de producción de radicales libres y por otro lado la alteración del sistema antioxidante a nivel hepático.

Los compuestos bioactivos provenientes de los metabolitos secundarios de las plantas le dan esta propiedad protectora ya que tienen capacidad antioxidante como son la vitamina E, β -caroteno, vitamina C y compuestos fenólicos; encontrándose de manera natural en la alimentación diaria de origen vegetal. ⁽⁴⁾

La *Persea americana* Miller "palta", es un fruto oleaginoso perteneciente a la familia de las lauráceas. Una de sus características más resaltantes es su alto contenido lipídico. Los ácidos grasos mono insaturados como es principalmente el ácido oleico, son los principales componentes lipídicos, que representan aproximadamente el 71% del total de ácidos grasos. Además, las paltas son una fuente rica de compuestos bioactivos fitoquímicos, tales como, la vitamina C, algunos carotenoides, vitamina E, esteroides, fenoles entre otros. ⁽⁵⁾

Debido a su composición química el estudio de la actividad antioxidante de las plantas medicinales, como la palta puede ser utilizada para evitar o precaver la hepatotoxicidad producida por el aumento de la ingesta de compuestos químicos y/u orgánicos proveniente de los alimentos, agua, vegetales y medicamentos como por ejemplo el paracetamol que se sabe que provoca daños funcionales y/o

estructurales al hígado produciendo hepatotoxicidad causado por su mecanismo patogénico que interviene en la producción de radicales libres y también altera el sistema antioxidante a nivel hepático. ⁽⁶⁾

Según la OMS, las medicinas tradicionales y complementarias de calidad, seguridad y eficacia científicamente comprobadas aseguran el acceso de todas las personas a la atención de salud. ⁽⁷⁾

De acuerdo a los estudios epidemiológicos, los alimentos de origen vegetal, en especial los vegetales y frutas, pueden ejercer un efecto protector contra algunas enfermedades tales como los trastornos cerebrovasculares, cardiovasculares y el cáncer. Esta propiedad se debe a la presencia de compuestos con capacidad antioxidante como la vitamina E, vitamina C, β -caroteno, y una mezcla compleja de compuestos fenólicos.

El fruto de la palta es importante y tradicional en la dieta diaria, su consumo y fácil acceso aporta nutrientes y satisface de manera eficiente las necesidades básicas de la salud. Por lo que el objetivo del presente trabajo es determinar “El efecto antioxidante de la pulpa del fruto de *Persea americana* Miller “Palta” en ratas con intoxicación hepática inducida por paracetamol”.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática

El ritmo actual de vida no saludable que llevamos actualmente, ha hecho que los desórdenes alimenticios puedan generar ciertas deficiencias o anomalías en el organismo, consumo de alimentos grasos (hamburguesas y aderezos), alimentos con un alto contenido en azúcares, alimentos procesados (embutidos), el consumo excesivo de alcohol pueden generar radicales libres dañando a los carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y en consecuencia dañando las membranas celulares. A esto también se le suma la exposición a compuestos químicos (pinturas y pegamentos), las radiaciones, el ozono, sustancias tóxicas, contaminantes del medio ambiente (agentes oxidantes que hay en herbicidas, el humo del tabaco, agua clorada, smog entre otros), aceleran el daño en los tejidos, ya que son fuente principal exógena de producción de radicales libres. Este aumento en la concentración de radicales libres conduce a un desequilibrio entre la rapidez de producción y su neutralización evidenciando una deficiencia en el sistema antioxidante endógeno dando como resultado el estrés oxidativo, el cual produce hepatotoxicidad. ⁽⁸⁾

El organismo tiene un sistema de resguardo antioxidante que actúa impidiendo la formación de radicales libres, bloqueando su propagación o interaccionando directamente con ellos. Este sistema lo componen: la reductasa, la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, proteínas, ácido úrico, glutatión, glucosa, grupos sulfidrilos (-SH), entre otros. Es posible también que el hombre puede ingerir algunas sustancias con capacidad antioxidante como: vitamina C, vitamina E, flavonoides, polifenoles, β -caroteno, Dimetilsulfoxido y otros más, que pueden ser de origen natural o sintético. ⁽¹⁾

1.2. Problema

1.2.1. Problema general:

¿El extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* “Palta” posee efecto antioxidante en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducidas por paracetamol?

1.2.2. Problemas específicos:

1. ¿Cuáles serán los tipos de metabolitos secundarios presentes en mayor concentración en el extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* “Palta”?
2. ¿En qué concentración del extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* “Palta” posee efecto antioxidante en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducida por paracetamol?
3. ¿Cuál será el efecto antioxidante del extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* “Palta” en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducida por paracetamol comparado con el fármaco de Silimarina?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general:

Determinar el efecto antioxidante del extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* “Palta” en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducidas por paracetamol.

1.3.2. Objetivos específicos:

1. Identificar los tipos de metabolitos secundarios que se encuentran en mayores concentraciones en el extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* “Palta”
2. Determinar que concentración del extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* “Palta” posee efecto antioxidante en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducido por paracetamol.
3. Comparar el efecto antioxidante del extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* “Palta” en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducida por Paracetamol comparado con el fármaco de Silimarina.

1.4. Justificación

Los estudios basados en plantas medicinales (medicina tradicional) son de gran importancia ya que constituyen una herramienta de fácil acceso a la población, los resultados obtenidos ayudarán la población que sufre enfermedades hepatotóxicas ya que podrán utilizar *Persea americana Miller* “Palta” en su dieta diaria por su efecto antioxidante.

El consumo de la palta brindará cantidades suficientes de antioxidantes al cuerpo el cual permitirá aminorar los efectos negativos del estrés oxidativo sobre el organismo y mejorar la calidad de vida de la población. Por ende es importante dar prioridad y considerar que un cambio en la alimentación diaria no solo genera altos beneficios a la salud sino también genera un impacto socioeconómico. ⁽⁸⁾

La investigación tiene la finalidad de dar a conocer el efecto antioxidante de la palta frente a los efectos del estrés oxidativo sobre el deterioro celular, así como la importancia de los antioxidantes adquiridos en la alimentación y sobre la disminución de radicales libres.

El estudio realizado abre camino a nuevas investigaciones sobre las plantas más utilizadas en la alimentación diaria y sobre todo las que están al alcance de la población.

1.5. Limitaciones metodológicas

En el presente estudio de investigación se tuvo inconvenientes en el desarrollo de la parte fitoquímica, en la utilización de reactivos controlados y la preparación de los mismos. Se solucionó gracias al laboratorio de farmacognosia de la universidad Inca Garcilaso de la Vega.

Las limitaciones en la parte práctica para el método del efecto antioxidante se debieron en conseguir los reactivos así como también un bioterio y la experiencia en tratar a los animales. Se solucionó gracias al laboratorio de la universidad Peruana Cayetano Heredia.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Estado del arte

2.1.1. Antecedentes nacionales

Troncoso L, Guija E (2007), en este trabajo se trazó como objetivos precisar el efecto antioxidante y hepatoprotector del perejil en ratas con intoxicación hepática inducida por el fármaco de paracetamol. En el estudio se empleó 40 ratas que fueron distribuidas en forma aleatoria en 4 grupos de 10 animales cada uno. A los 4 grupos se les administró la misma dieta y agua ad libitum por vía oral por 5 días: paracetamol en la dosis de 200 mg/kg de peso corporal para poder inducir la intoxicación hepática y un hepatoprotector farmacológico (fármaco hepatoprotector (FHP): Purinor®) o natural (perejil); también, un grupo de paracetamol solo y otro de control. Finalizando la parte de administración, se sacrificaron los animales. En suero sanguíneo se determinó alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), grupos sulfidrilos, gamma glutamil transferasa (GGT), proteínas totales y albúmina sérica; y en el homogenizado citosólico de hígado, fracción pos mitocondrial, se determinó, catalasa, superóxido dismutasa, grupos sulfidrilos, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) o proteínas y radicales libres. También, se realizó el estudio histopatológico del hígado, para identificar signos de necrosis y signos de regeneración pos necrótica. Como resultado el perejil evidenció un mayor efecto hepatoprotector que el FHP, evaluado por, ALT, AST y GGT. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ($p < 0,05$, $p = 0,01$, prueba Kruskal-Wallis) y las TBARS ($p < 0,001$, $p = 0,000$, prueba Kruskal-Wallis) mostraron que había diferencia entre todos los grupos estadísticamente. En el estudio histopatológico, se evidenció signos de necrosis severa en el grupo de paracetamol y en el grupo al que se administró agregando FHP, no se halló un aumento de signos de necrosis comparado con el grupo tratado con perejil. Por lo tanto se puede decir que el perejil ejerce mayor efecto antioxidante y hepatoprotector que el FHP. ⁽¹⁾

Sandoval M, Lazarte K, Arnao I, Troncoso L, Guija E (2008), presentó como objetivo definir si la capacidad antioxidante y hepatoprotectora, inducida por las cáscaras y semillas de la uva en animales de experimentación con agresión alcohólica, mediante la prueba del TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico). Las cáscaras y semillas fueron separadas manualmente, se exprimieron en gasa y se desecaron con aire circulante, a una temperatura de 40° C, por un tiempo de 24 horas; luego de triturarlas, la mezcla de semillas y cáscaras (cas-sem) fue administrada ad libitum en la dieta. Se emplearon 104 ratones albinos machos adultos, que fueron separados en los grupos: (A) cáscara -semilla al 20%; (B) alcohol al 5%; (C) cáscara - semilla con alcohol; (D) fármaco de Silimarina 50 mg/100 g de alimento; (E) Silimarina con alcohol; y, (F) un grupo control. Se extrajeron los hígados y se pesaron, luego fueron analizados por lipoperoxidación, mediante el método de TBARS, y se evaluó la hepatomegalia, por peso en las horas de 24, 48 y 72, y a los 4, 5 y 7 días de tratamiento. Los resultados obtenidos con respecto a la hepatomegalia se evidenciaron desde las 24 horas (36,68% de aumento de masa hepática), en el grupo alcohol, y fue menor en el grupo cáscara - semilla. La prueba TBARS dio mayor concentración de oxidantes al grupo alcohol (63,91 a 67,07 nmol/g-tejido) a diferencia del grupo cáscara - semilla (40,85 a 47,46 nmol/g-tejido) que fue menor; en el grupo cáscara - semilla con alcohol, fue 43 a 63 nmol/g-tejido y la protección se observó en el quinto día (44 nmol/g-tejido). En conclusión el grupo de cáscara - semilla dado en la dieta, al 20% en peso, protege al tejido hepático, hasta el quinto día de exposición constante con alcohol al 5%. ⁽²⁾

Cabrera J, Dilas L, Minchán P (2015), en el presente trabajo se determina la actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto etanólico de la semilla de *Persea americana Miller var. Hass* “palta” obtenida en el departamento de Cajamarca, se hizo un extracto etanólico para realizar la actividad antimicrobiana utilizando el método de Kirby Bauer. Se realizó la actividad antioxidante empleando el método del 1,1-Difenil-2-picril-hidrazilo

(DPPH); los resultados obtenidos fueron: el extracto etanólico de 1 mg/mL a concentraciones de 20 - 100 μ L, puede atrapar radicales libres similares al Trolox (estándar), no habiendo diferencia estadística entre sus capacidades antioxidantes ($p > 0,05$; IC = 95 %) según el análisis de varianza de un factor (ANOVA). Se empleó el Método de Folin Ciocalteu para hallar la concentración de polifenoles totales, determinó que el extracto etanólico de la semilla de *Persea americana Miller var. Hass* “palta”, en concentraciones de 0,1 mg/mL, contiene una concentración de polifenoles totales de $1665,2 \pm 88,3$ mgEAG/gES; y que a concentraciones de 1 mg/mL la concentración varía a $2274,2 \pm 58,4$ mgEAG/gES, resultados que ayudan a corroborar la actividad antioxidante. Demostrando que se tiene que emplear el medio adecuado para la extracción dependiendo de la parte de la planta a investigar. Se tiene como resultado que la semilla de *Persea americana Miller var. Hass* “palta”, es una buena alternativa positiva antimicrobiana y además antioxidante. ⁽⁴⁾

Jiménez S. (2016), presentó como objetivo la comprobación de la actividad analgésica del extracto etanólico de las cascarras de las pepas de *Persea americana Mill* “Palta fuerte” en ratones albinos. Empleándose el método de Koster y Colaboradores, modificado de contorciones inducidas por ácido acético glacial al 0,6 %. Las concentraciones ensayadas fueron 50, 100 y 200 mg/kg, de extracto de las cáscaras de las pepas *Persea americana Mill* “Palta fuerte”, comparado con el fármaco de Tramadol a 40 mg/kg y ácido acetilsalicílico a 200 mg/kg. Obteniendo porcentajes de reducción de contorciones con ácido acetilsalicílico de 200 mg/kg a un 88%, Tramadol a 40 mg/kg a un 94%, *Persea americana Mill* a 100 mg/kg a un 88%, *Persea americana Mill* a 200 mg/kg a un 94%. Se comprobó entonces la actividad analgésica del extracto etanólico de las cáscaras de las pepas *Persea americana Mill* al 200 mg/kg y un 94% de reducción de contorciones comparado con el fármaco de Tramadol a 40 mg/kg que llegan a presentar el mismo efecto. ⁽⁹⁾

Rengifo P. (2014), se formuló como objetivos determinar el aceite de los cotiledones de la semilla de *Persea americana Mill. Var. Hass Fuerte* y cuantificar su actividad antioxidante total y de las fracciones saponificable y no saponificable. Se obtuvo por el método de Soxhlet el aceite, se realizaron los análisis fisicoquímicos siguiendo las normas establecidas por AOCS (Sociedad Americana de la Química del Aceite) y el análisis químico a través de un tamizaje fitoquímico y por el método cromatográfico de gases se determinó el perfil de ácidos grasos. Se llegó a determinar la actividad antioxidante mediante el método de DPPH (α , α -difeníl- β -picrilhidrazilo) obteniéndose una actividad antioxidante total del aceite de $9,676 \pm 0,260$ $\mu\text{mol TE/kg}$. Mientras que la fracción saponificable tuvo una actividad antioxidante de $8,700 \pm 0,26$ $\mu\text{mol TE/kg}$; y la no saponificable fue de $7,37 \pm 0,169$ $\mu\text{mol TE/kg}$. Entonces se concluye que el aceite analizado es de calidad similar al aceite de oliva extra virgen, teniendo una elevada concentración de ácido linoleico y linolénico; y la actividad antioxidante del aceite podría deberse a la presencia de esteroides y polifenoles. ⁽¹⁰⁾

2.1.2. Antecedentes extranjeros

Chavez F, Aranda M, García A, Pastene E. (2011), tuvieron como objetivo demostrar que la inhibición de enzimas tal como la ureasa, resulta ser un método por el que los polifenoles pueden limitar la colonización por *H. pylori*. Se obtuvo un extracto polifenólico (77 % de EAG) desde el epicarpio del fruto de *Persea americana* (palto), rico en procianidinas derivadas de epicatequina, con un alto grado de polimerización $DP_m = 6.10$. Se evaluó también la actividad antioxidante mediante la metodología de TEAC-CUPRAC, TEAC-DPPH, TEAC-FRAP, TEAC-crocina. En el extracto se pudo evidenciar una actividad inhibitoria de la ureasa de *H. pylori* con un $IC_{50} = 1.02$ $\mu\text{g EAG/mL}$. El fraccionamiento de las procianidinas permitió agruparlas según su peso molecular, hallándose una relación entre el tamaño y la capacidad de inhibir la ureasa. ⁽¹¹⁾

Rosero R. Johanna C. (2017), se planteó como objetivo realizar el análisis cuantitativo de los compuestos fenólicos presentes en sub-productos

(semilla y epicarpio) del fruto de aguacate (*Persea Americana Mill*). Se empezó evaluando un diseño experimental con dos disolventes de extracción (acetona/agua 70:30 y metanol/agua 80:20 v/v), teniendo en cuenta la parte del fruto y el tipo de disolvente y como factor de respuesta se tomó la actividad antioxidante (TEAC) y el contenido fenólico total (CFT). Se obtuvieron para la semilla y epicarpio los siguientes extractos: extracto crudo de semilla (ECS) y epicarpio (ECE), extracto purificado de semilla (EPS) y epicarpio (EPE) y las fracciones separadas para la semilla (F1S, F2S, F3S) y epicarpio (F1E, F2E, F3E). Se cuantificó el contenido de flavonoides totales (FT), el contenido fenólico total (CFT) y la actividad antioxidante mediante los métodos TEAC y DPPH. Se evaluó el contenido fenólico total (CFT), flavonoides totales (FT) y la actividad antioxidante de los extractos frente a los radicales libres ABTS y DPPH mediante espectroscopía UV-Vis. El análisis de los datos mediante el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher y la prueba de múltiples rangos permitió establecer que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$, nivel de confianza 95%) cuando se comparan los valores del CFT, FT y TEAC de todas las muestras. Los extractos crudos de semilla y epicarpio (ECS y ECE) mostraron valores relativamente bajos en el CFT y TEAC con respecto a los extractos purificados (EPS y EPE), se encontró que estos valores son mayores para EPE y EPS. El mayor CFT, FT y TEAC lo presentaron las fracciones con peso molecular intermedio de la semilla y epicarpio (F2E y F2S) y las más pesadas (F3E y F3S), siendo las fracciones F2E y F2S quienes presentan los mayores valores. Comparando los valores TEAC de los extractos purificados y sus fracciones (semilla y epicarpio) con el CFT, se observó estadísticamente una relación significativa ($p < 0.05$) entre estas características, para la semilla se encontró un $r = 0,96945$ y para el epicarpio un $r = 0,984621$. El comportamiento de los extractos para el caso de la actividad antioxidante evaluada por el método DPPH fue diferente, no se evidenció una clara correlación entre los valores DPPH y CFT, sin embargo las fracciones más pesadas (F3S y F3E) fueron las más antioxidantes (menor FRS50). ⁽¹²⁾

2.2. Bases teóricas y/o legales

2.2.1. Descripción general *Persea americana* Miller (Palta)

Es una planta de familia Lauraceae, un arbusto comestible, se utilizan en jardines, parque y huertos de tamaño 10 a 20 metro de altura. ⁽¹³⁾

De la familia Lauraceae es la única especie de importancia desde el punto de vista económico, debido a que es utilizado para la extracción de aceite y su uso en procesos de la industria cosmética, así como de sus posibilidades para el consumo ya sea fresco o procesado. ⁽¹⁴⁾

Nombre Común o Vulgar: Palta fuerte.

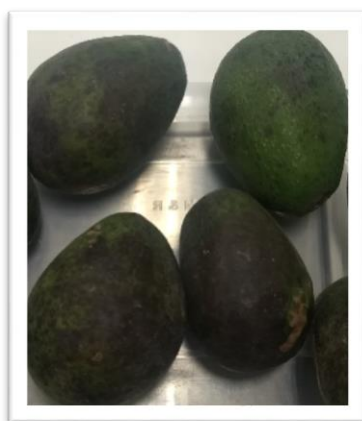


Figura N° 1: *Persea americana* Miller "Palta"

Fuente: Elaboración Propia

- **Distribución taxonómica**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Magnolidae

Orden: Laurales

Familia: Lauraceae

Género: *Persea*

Especie: *Persea americana* Miller.

Fuente: Museo de Historia Natural (ver anexo 2)

- **Cultivos y usos**

Cultivos: Echando abonos antes de la floración para un buena producción.

Poda: Ramas u hojas dañadas. ⁽¹³⁾

Variedades: En fruto, hojas y tamaño de altura. ⁽¹³⁾

- **Componentes**

Su composición nutricionales alimenticios es: Agua 73,23 g, Energía 160 kcal, Galactosa 0,10 g, Maltosa 0,00 g, Lactosa 0,00 g, Fructosa 0,12 g, Glucosa (dextrosa) 0,37 g, Sucrosa 0,06 g, Azucares total 0,66 g, Vitamina B6 0,257 mg, Vitamina B5 (Ácido Pantoténico) 1,389 mg, Vitamina B3 (Niacina) 1,738 mg, Vitamina B2 (Riboflavina) 0,130 mg, Vitamina B1 (Tiamina) 0,067 mg, Vitamina C (Ácido ascórbico) 10,0 mg, Grasas (Lípidos Totales) 14,66 g, Proteínas 2,00 g, Carbohidratos 8,53 g, Fibra 6,7 g, Cenizas 1,58 g, Selenio 0,4 mcg, Flúor 7,0 mcg, Manganeso 0,142 mg,, Hierro 0,55 mg, Magnesio 29 mg, Cobre 0,190 mg, Zinc 0,64 mg, Sodio 7 mg, Potasio 485 mg, Fósforo 52 mg, Calcio 12 mg, Almidón 0,11 g. Vitamina A 146 UI, Vitamina B12 0,00 mcg, Ácido Fólico 0 mcg, Vitamina E (alfa tocoferol) 2,07 mg, Delta-tocoferol 0,02 mg, Gamma-Tocoferol 0,33 mg, Beta-tocoferol 0,05 mg, Vitamina K (filoquinona) 21,0 mcg, Folatos total 81 mcg, Á. grasos polinsaturados 1,816 g, Á. grasos monoinsaturados 9,799 g, Ácidos grasos saturados 2,126 g, Beta-citosterol 76 mg, Campesterol 5 mg, Estigmasterol 2 mg, Colesterol 0 mg, Ácido Aspártico 0,236 g, Ácido Glutámico 0,287 g, Alanina 0,109 g, Arginina 0,088 g, Cistina 0,027 g, Fenilalanina 0,232 g, Glicina 0,104 g, Isoleucina 0,084 g, Leucina 0,143 g, Lisina 0,132 g, Metionina 0,038 g, Tirosina 0,049 g, Treonina 0,073 g, Triptófano 0,025 g, Prolina 0,098 g, Serina 0,114 g, Valina 0,107 g, Alfa-Caroteno 24 mcg y Beta-Caroteno 62 mcg. ⁽¹⁴⁾

- **Descripción botánica**

Árbol siempre verde, crece entre 10 a 20 metros de altura, con hojas grandes, verdes medio oscuro redondeado, alternas, simples, de un

largo entre 6 a 30 cm, de tronco recto, corto y corteza rugosa, de flores pequeñas amarillo verdoso, de ancho entre 1 a 3 cm, el fruto es una drupa de forma esférica o piriforme que es comestible, la cáscara es gruesa de diferentes variedades de colores: amarillo, verde o violeta. La pulpa puede ser de color verde o amarillento, pero es de consistencia grasosa; tiene una única semilla que es ovalada, dura y oleosa. Produce en buena cantidad de frutos. ⁽¹⁴⁾

- **Distribución y Hábitat**

Persea americana Miller está distribuido en zonas tropicales cálidas, soleadas, cálidas o templado. ⁽¹⁴⁾

Se encuentra distribuida en los países: Brasil, Bolivia, Cuba, Costa Rica, Colombia, Chile, Ecuador, Estados Unidos, El Salvador, Filipinas, Gabón, Guyana, Guatemala, Honduras, Panamá, Perú, Paraguay, Puerto Rico, México, Nicaragua, República Dominicana, Venezuela, Belice, Camerún, Tanzania, Trinidad y Tobago. ⁽¹³⁾

- **Propiedades nutricionales**

La palta tiene un excelente valor nutritivo equivale a una porción de carne y la pulpa es fuente de proteínas, energía y minerales. Ayuda a aumentar los valores de colesterol “bueno” y disminuir los niveles del colesterol “malo”. La palta contiene: carbohidratos, fibra, grasas, proteínas, vitaminas del complejo B, vitaminas C, A, E, y minerales como: hierro, magnesio, fósforo, calcio y potasio.

Se recomienda su consumo con frutas ácidas y dulces, con excepción a la piña, ni con huevos. Este fruto se debe consumir maduro, no cuando se encuentre descompuesto, o cuando se prepare en postre, o con pimienta o picante.

A la fecha existen miles de recetas con este fruto: como una deliciosa ensalada hasta un Mousse de aguacate. Para evitar su oscurecimiento, se puede añadir unas gotas de limón y una pizca de sal, lo que también ayuda a pronunciar su sabor. Con la palta se pueden elaborar muchos purés, ensaladas, salsas, sopas frías, y son parte de los rellenos de batidos, helados, flanes y pizzas.

- **Propiedades Medicinales**

Posee grandes virtudes medicinales, presentan sustancias que benefician al organismo y lo nutren para la prevención de enfermedades; considerado un fruto prodigioso, algunas variedades poseen cualidades como altos poderes vermífugos y antirraquíticos. ^(13, 14)

De este fruto se extrae aceite de la semilla, que es aplicado sobre el cabello para evitar su caída e hidratar la piel, y para aliviar el reumatismo o gota. También se puede usar en infusión para aliviar la fiebre, migraña y cólicos menstruales. La cáscara puede ser empleada directamente sobre la sien para aliviar el dolor de cabeza. ^(13, 14)

2.2.2. Paracetamol.

- **Definición**

El paracetamol también conocido como acetaminofeno o acetaminofén, es un fármaco analgésico y antipirético, es decir sirve para eliminar el dolor y reducir la fiebre. A diferencia de otros medicamentos no es antiinflamatorio. ^(15, 16)

El paracetamol es usado para los tratamientos de cuadros que presentan dolor, como dolor dental o dolor de cabeza o que puedan ser dolores asociados a procesos como menstruación y/u osteomusculares; y también es empleado en el tratamiento de procesos febriles o en cuadros que lo produzcan como la gripe o el resfriado. ^(16, 17)

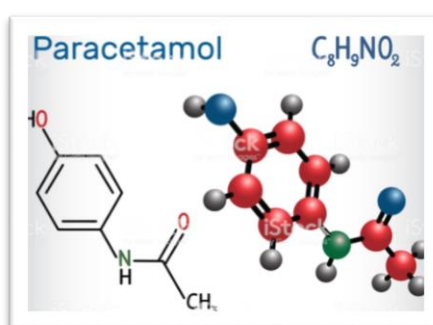


Figura N° 2: Molécula de Paracetamol

Fuente: www.google.com

- **Farmacocinética**

Luego de su administración oral el paracetamol es absorbido de manera rápida y completa en el tracto digestivo. Entre los 30 a 60 minutos se alcanzan las máximas concentraciones plasmáticas, aunque no necesariamente está relacionado con los efectos analgésicos. Un 25% el paracetamol se une a las proteínas del plasma. En el metabolismo de primer paso, aproximadamente una cuarta parte de la dosis lo experimenta en el hígado, donde se metaboliza también la parte de la dosis de acción terapéutica donde se producen los conjugados glucurónicos y sulfatos, que luego son eliminados en la orina. A través de las isoenzimas de citocromo P450, la dosis experimenta entre un 10-15% de un metabolismo oxidativo, posteriormente siendo conjugado con ácido mercaptúrico y cisteína.

En casos de sobredosis, junto con malnutrición o alcoholismo, existe una depleción hepática de los glucurónicos y sulfatos, experimentando así un metabolismo oxidativo tóxico, a través del sistema enzimático CYP2E1 y CYP1A2. Este metabolismo también se puede presentar cuando se administra el paracetamol con otros fármacos que sean inductores hepáticos.

En casos de insuficiencia renal, se puede acumular metabolitos del fármaco, pero no el fármaco sin alterar.

La eliminación del paracetamol es entre 2 a 4 horas en casos de los pacientes con la función hepática normal, pasando a ser indetectable en el plasma luego de 8 horas después de su administración. En caso de los pacientes con disfunción hepática el tiempo de eliminación aumenta pudiendo ocasionar el desarrollo de una necrosis hepática. ^(15, 18)

- **Mecanismo de acción**

No es muy bien conocido el mecanismo de acción del paracetamol aunque se sabe que la interacción es a nivel central. Se dice que el fármaco de paracetamol llega a aumentar el umbral al dolor inhibiendo las ciclooxigenasas en el sistema nervioso central, que son las enzimas que participan en la síntesis de las prostaglandinas. No obstante, el

paracetamol no llega a inhibir las ciclooxigenasas en los tejidos periféricos, razón por la cual se cree que carece de actividad antiinflamatoria.

El fármaco de paracetamol también se cree que puede inhibir la síntesis y/o los efectos de numerosos mediadores químicos que sensibilizan los receptores del dolor a los estímulos químicos o mecánicos.

Los posibles efectos antipiréticos del paracetamol tienen lugar al bloquear el pirógeno endógeno en el centro hipotalámico que es el regulador de la temperatura, inhibiendo la síntesis de las prostaglandinas. El calor es disipado por vasodilatación, sudoración aumento del flujo sanguíneo periférico.

Las sobredosis que puede presentar el paracetamol son debido al uso continuo que puede llegar a ocasionar hepatotoxicidad y nefropatía, debidas a un metabolito oxidativo (N-acetil-p-benzoquinonemina) que se produce en el hígado y, en menor grado, en el riñón. Este metabolito en su forma covalente se une a las proteínas que contienen azufre, originando así una necrosis celular. La disminución de las reservas de glutathion constituye el inicio de la toxicidad hepática del paracetamol. La administración de metionina o N-acetil cisteína reducen la toxicidad hepática, pero no previene la toxicidad renal, en la que juegan un cierto papel los conjugados sulfurados del paracetamol y que se caracteriza por necrosis papilar y nefritis intersticial. ⁽¹⁵⁾

- **Indicación Terapéutica**

Es indicado para el tratamiento de procesos que con llevan dolor, por ejemplo: mialgias, cefaleas, dismenorrea, dolor de espalda, así como fiebre y molestias relacionadas a procesos gripales o refriados.

- **Administración Terapéutica**

- Niños mayores de 12 años y Adultos: Se puede administrar una dosis entre 325 - 650 mg por vía oral o rectal cada 4-6 horas al día. Una dosis alternativa es de 1.000 mg, cada 2 - 4 veces al día. No se debe de administrar más de 1 g en una sola toma o más de 4 g por día.

- Niños menores de 12 años: Se administra entre 10 - 15 mg/kg por vía oral o rectal cada 4-6 horas al día. No se debe de administrar más de cinco dosis al día o en 24 horas.
- Neonatos: Administrar dosis de 10 - 15 mg/kg por kilo por vía oral cada 6 - 8 horas.

- **Modo de Administración**

- Polvo para solución oral: Se reconstituye en agua (disuelve) antes de ser ingerido.
- Solución oral: Puede tomar de manera directa o diluida, ya sea en: agua, zumo de frutas o leche.
- Granulado para solución oral: Se prepara disolviendo el granulado en 1/2 vaso de agua fría y se toma inmediatamente.
- Granulado efervescente: Se disuelve en agua, y se toma cuando cesa el burbujeo.
- Comprimido bucodispersable: Tiene la propiedad de deshacer en la boca antes de ser ingerido o tragado.
- Supositorio: Se introduce en el recto profundamente. Se administra un supositorio completo, no se debe de fraccionar para su administración, asegurarse que no se encuentre blando antes de utilizarlo, de ser necesario ponerlo en la nevera 30 minutos antes de su uso o bajo el chorro de agua fría antes de quitar el empaque o envoltura. ⁽¹⁵⁾

- **Contraindicaciones**

Se ha reportado hipersensibilidad al paracetamol, cuando las personas presentan enfermedad hepática (con o sin insuficiencia hepática). En casos de hepatitis viral, existe el riesgo de hepatotoxicidad. ⁽¹⁵⁾

- **Advertencias y Precauciones**

- En casos de alcoholismo crónico: puede presentarse hemorragias digestivas y/o potenciar la toxicidad hepática. En estos casos se debe evitar los tratamientos prolongados, no deben de administrarse más de 2 g/día.
- En los casos de Anemia existe la posibilidad de originarse alteraciones sanguíneas; se recomienda evitar tratamientos

prolongados. En la Anemia a causa del déficit de G6PD: se ha observado casos de hemólisis.

- Evitar el consumo junto con bebidas alcohólicas.
- Durante el embarazo: se pueden usar dosis terapéuticas a corto plazo. Paracetamol pertenece a la categoría de riesgo B.
- En casos de daño renal: Es de uso ocasional, ya que aumenta el riesgo de toxicidad renal con altas dosis y tratamientos prolongados, lo que pueden conllevar a una insuficiencia grave.
- En casos de daño hepático: existe un metabolito intermediario que es tóxico, por lo cual se deben ajustar las dosis que deben ser administradas.
- En casos de que la fiebre o dolor persistan por más de 72 horas, el paciente debe ser evaluado nuevamente.
- Produce una hipersensibilidad a salicilatos, lo que constituye una alternativa en pacientes con alergias; pero en algunos pacientes hipersensibles a los AINES o ácido acetilsalicílico, se han presentado reacciones broncospásticas. Los cuadros de reacción cruzada han sido menos de 5 % en pacientes alérgicos a salicilatos, por lo que se aconseja control clínico durante su administración. ⁽¹⁵⁾

- **Reacciones Adversas**

- Ocasionalmente se presenta: anemia hemolítica (en pacientes con déficit de G6PD), pancitopenia, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia, agranulocitosis, dermatitis alérgica, urticaria, ictericia fiebre y exantemáticas.
- Raras veces: se presenta: hepatitis viral (asociada a casos de sobredosis), pancreatitis, insuficiencia renal (con dosis elevadas o uso prolongado), cólico renal, ictericia, daño hepático y orina turbia,
- Excepcionalmente: y en especial en niño, se ha presentado hipoglucemia. ⁽¹⁵⁾

2.2.3. Silimarina

- **Definición**

La Silimarina es conocida desde la antigüedad como descongestivo y protector hepático, es un complejo flavonoide compuesto por tres flavolignanós: silicrisina, silidianina y silibina, que es aislado de la planta cardo mariano.

El famoso herborista Culpepper (1616-1654) lo usaba para el tratamiento de la ictericia y litiasis biliares. Plinio el Viejo, lo describe como un excelente remedio productor de bilis. En el año 1968 científicos alemanes descubren que la Silimarina era el principio que daba al cardo mariano sus excelentes propiedades, desde ese entonces se iniciaron estudios clínicos para demostrar su seguridad e eficacia en las enfermedades inflamatorias del hígado tales como: hepatitis, cirrosis, e infiltraciones de grasas inducidas por el alcohol y otras toxinas.

Debido a que es extraída de una planta, países como E.E.U.U. consideran a la Silimarina como un suplemento alimenticio y no como un medicamento. ⁽¹⁹⁾

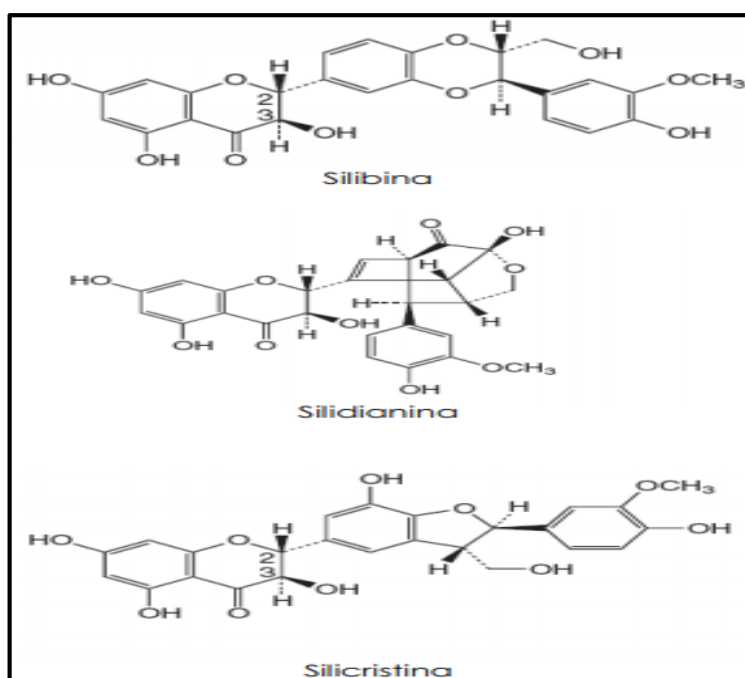


Figura N° 3: Molécula de Silimarina

Fuente: www.google.com

- **Mecanismo de Acción**

Se sabe que la Silimarina neutraliza los radicales libres que dañan las células hepáticas expuestas a varias toxinas porque es un potente antioxidante. La Silimarina es un fármaco antioxidante muy potente casi diez veces más que la vitamina E. El aumento de las concentraciones de glutatión en el hígado es debido a la Silimarina en más de un 35% en personas sanas y en más de un 50% en ratas. El glutatión es el responsable de la desintoxicación de una amplia variedad de hormonas, fármacos y productos químicos. Los niveles altos de glutatión en el hígado aumentan su capacidad para la desintoxicación. La Silimarina incrementa el nivel de la enzima superóxido dismutasa, que es un importante antioxidante en cultivos celulares. ⁽¹⁹⁾

El aumento de síntesis de proteínas en el hígado es debido a la Silimarina a través de la estimulación de la polimerasa I y la transcripción del RNAr, lo que resulta en un incremento en la producción de nuevas células hepáticas para sustituir las dañadas por hepatotoxinas. Adicionalmente, la Silimarina inhibe la síntesis de los mediadores de la inflamación como los leucotrienos, que puede resultar en la psoriasis, entre otras patologías. ⁽¹⁹⁾

- **Farmacocinética**

El estudio de la farmacocinética en una administración de Silimarina a una concentración de 200 mg fue evaluado y estudiado en 16 voluntarios sanos (8 hombres y 8 mujeres). En donde se observaron pequeñas diferencias en los diferentes parámetros farmacocinéticos siendo estos menores en las mujeres: tiempo para llegar a la máxima concentración plasmática: T max = 2.14 ± 0.26 y 2.6 ± 0.12 horas en varones y mujeres respectivamente; área bajo la curva (AUC): 12.82 ± 0.77 g * h/ml y 11.27 ± 1.01 12.82 ± 0.77 g * h/m; concentraciones plasmáticas máximas C max : 2.79 ± 0.35 g/ml y 1.86 ± 0.12 g/ml; semi-vida de absorción: 1.19 ± 0.2 1 h y .54 ± 0.1; aclaramiento: 15.66 ± 0.89 L/h y 17.87 ± 1.66 L/h; volumen de distribución: 26.74 ± 3.6 L y 39.74 ± 2.7 L.

La Silimarina tiene un metabolismo hepático. En estudios realizados sobre la excreción urinaria después de la administración oral de Silimarina a voluntarios sanos, se evidenció en la orina total, recolectada en 24 horas, alrededor del 3% al 7% de la silibina administrada. Examinando la excreción biliar y urinaria de silibina, silicristina y silidianina tras la administración de una única dosis de 140 mg de Silimarina (equivalente: 60 mg de silibina) en pacientes con colecistectomía, se evidenció una excreción de silicristina en un 1%, una excreción urinaria de silibina insignificante (5%) y silidianina no se pudo determinar ni en orina y bilis. Después de 24 horas silibina y silicristina fueron principalmente excretadas en bilis, como sulfatos y glucurónidos, en porcentajes de 20 a 40% y 4 a 10% respectivamente. ⁽¹⁹⁾

- **Indicación Terapéutica**

- En adultos: Se recomienda una dosis de 150 mg vía oral, 3 veces al día, después de ingerir alimentos. El tratamiento dura aproximadamente entre 4 a 6 semanas, posteriormente se mantiene el tratamiento y se aplica una dosis de 150 mg 2 veces al día.
- En niños y adolescentes: No se tienen datos sobre la administración en paciente de este grupo de edad.
- En ancianos: El tratamiento es el mismo que en los adultos; no se tienen datos o registros sobre algunos problemas en este grupo de edad. ⁽¹⁵⁾

- **Modo de Administración**

Ingerir vía oral con agua u otros líquidos, después de los alimentos. ⁽¹⁵⁾

- **Contraindicaciones y Precauciones**

- La Silimarina está contraindicada a los pacientes alérgicos a la Silimarina o algunos de los componentes del medicamento.
- Si se pretende usar por un largo tiempo debe ser monitoreada por un médico.
- Este medicamento solo debe de ser utilizado en mujeres embarazadas bajo supervisión médica y que el beneficio justifique los

riesgos ya que no se cuentan con datos de su administración en este periodo.

- Algunos estudios demuestran que este medicamento aumenta la producción de la leche en un 80%, pero en la administración del placebo no hubo diferencia significativa. En ninguno de los casos se ha encontrado Silimarina en la leche. Por lo cual ha sido utilizado como galactogogo en mujeres con bebés prematuros. ⁽¹⁹⁾

- **Advertencias y Precauciones**

- Niños (sin datos disponibles); tratamiento de larga duración (control médico). ⁽¹⁵⁾
- Embarazo: Antes de su administración valorar riesgo/beneficio. No se han realizado estudios en humanos, se llevaron a cabo estudios en animales y no han mostrado indicios de teratogenia. ⁽¹⁵⁾
- Lactancia: Se desconoce si se excretan en la leche materna la Silimarina o sus metabolitos. Por tanto, no se puede excluir el riesgo en recién nacidos. ⁽¹⁵⁾
- Efectos sobre la capacidad de utilizar máquinas y conducir, es nula o insignificante. ⁽¹⁵⁾

- **Interacciones**

No se han realizado estudios de interacciones. ⁽¹⁵⁾

- **Reacciones Adversas**

Silimarina puede producir efectos adversos muy poco frecuentes, entre las cuales se han puntualizado las siguientes:

- Muy raras (afectan de cada 10.000 al menos un paciente) Trastornos del sistema inmunológico: reacciones alérgicas
- Poco frecuentes (afectan de cada 1000, entre 1 y 10 pacientes) Trastornos gastrointestinales: diarreas y dolor de estómago. ⁽¹⁹⁾

2.3. Hipótesis

2.3.1. Hipótesis general:

El extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* "Palta" en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducida por paracetamol posee efecto antioxidante.

2.3.2. Hipótesis específicas:

1. Existen tipos de metabolitos secundarios con mayor presencia en el extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* "Palta".
2. Existe una concentración del extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* "Palta" con efecto antioxidante en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducido por paracetamol.
3. Existe en el extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* "Palta" efecto antioxidante en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducido por paracetamol comparado con el fármaco de Silimarina.

- **Variables:**

Variable independiente: Extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* "Palta"

Variable dependiente: Efecto antioxidante

- **Tabla de Operacionalización de variables**

Tabla 01: Operacionalización de Variables

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES
V. Independiente Extracto acuoso de la pulpa del fruto de <i>Persea americana Miller</i> "Palta"	Tamizaje fitoquímico	Alcaloides Flavonoides Saponinas Taninos Compuestos fenólicos Quinonas
	Cromatografía en Capa fina	Alcaloides Flavonoides
	Concentraciones a evaluar	Concentraciones al 250, 500 y 1000 mg/Kg, Paracetamol 200 mg/Kg y Silimarina 20 mg/Kg.
V. Dependiente Efecto antioxidante	Determinación de las especies reactivas al ácido Tiobarbitúrico (TBars) o radicales libres	Concentración de TBARS (MDA $\mu\text{M}/\text{ml}$), evaluación estadística de la significancia.

Fuente: Elaboración propia

2.4. Definición de términos básicos

Antioxidante.- Es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Protegen al organismo desactivando a los radicales libres, minimizando el daño a nivel celular. ⁽⁴⁾

Control.- Se hace referencia a casos o grupos seleccionados para ser usado en un estudio como referencia por sus características específicas como sexo, raza, edad, estatus económico, etc. Término relacionado: estándar, patrón.

Control, grupo.- Es un grupo que es seleccionado sin someterlo a exposición de ningún tipo integrado por animales, células o hasta humanos, etc.

Cuarentena.- Es un período de aislamiento impuesto a un ser vivo u objeto para evitar un riesgo o alguna enfermedad, no necesariamente tiene que ser 40 días.

Dilución.- Acción y efecto de diluir. Disminuir la concentración de una disolución añadiendo disolvente.

Efecto.- Es todo cambio producido en un sistema biológico por una sustancia química.

Estrés oxidativo.- Desequilibrio entre las especies reactivas del oxígeno y los sistemas de defensa antioxidante.

Hepatotoxicidad.- Enfermedad hepática tóxica que puede ser inducida por drogas implicando un daño funcional o anatómico del hígado.

Metabolitos primarios.- Son todos aquellos que intervienen directamente en los procesos químicos en la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas. Estos metabolitos son muy importantes para la vida vegetal: lípidos, proteínas, vitaminas, carbohidratos y hormonas. ⁽²⁰⁾

Metabolitos secundarios.- Son compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es letal para el organismo. ⁽²⁰⁾

Oxidación celular.- Es el proceso de alimentación y desgaste de nuestras células.

Parámetros bioquímicos.- Representan concentraciones de determinadas sustancias químicas que se hallan en la sangre en el momento del estudio u análisis.

Peso corporal.- Es la masa del cuerpo en kilogramos. También llamado masa corporal. En ciertos países puede variar la unidad de medida como en Estados Unidos que utiliza libras en vez de kilogramos.

Tamizaje fitoquímico.- Es la extracción de metabolitos de la planta a través de reactivos o solventes apropiados siguiendo procedimientos adecuados de: precipitación y reacción de color. Los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico son únicamente de orientación y se debe de interpretar en conjunto con los resultados del Screening farmacológico. ⁽²⁰⁾

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de investigación

El presente estudio fue experimental es decir no se limitó a observar sino a intervenir, empleando un diseño con pos prueba únicamente y grupo de control.

Nivel: Explicativo por tener variables de causa y efecto.

Se basó en el modelo de intoxicación con paracetamol propuesta por Fedekar F. et al (2014) y actividad antioxidante determinada por la prueba del TBARS propuesto por Ohkawa H. et al (1979).

PARTE EXPERIMENTAL – INVESTIGACION PALTA



Figura N° 4: Diseño experimental en la línea de tiempo.

Fuente: Elaboración Propia

3.2. Población y muestra

Población de animales de experimentación: Ratas Holtzman del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Población de especie vegetal: Se recolectó 4.5 Kg de *Persea americana Miller* "Palta" en el departamento de Ayacucho, provincia de Huamanga del distrito de Ocros, Fundo ARCCACC que se encuentra a 3146 msnm.

Muestra de animales de experimentación: Treinta ratas albinos machos (cepa Holtzman) de 6 a 8 semanas de vida teniendo un promedio de peso que oscila entre 220 ± 10 g.

Muestra de especie vegetal: Se utilizaron 3Kg de *Persea americana Miller* "Palta" pelados y en trozos

3.3. Equipos, materiales y reactivos

- **Equipos e instrumentos**

- Balanza Gramera.- para el pesado de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* "Palta" y de las ratas albinas.
- Balanza Analítica.- para el pesado del estándar de Quercetina.
- Estufa.- para el secado del extracto acuoso de la Palta.
- Plancha de calentamiento.- para evaporar el solvente de la placa cromatográfica.
- Luz UV 254 y 366 nm.- para ver las manchas de los metabolitos
- Baño maría.- para la homogeneización de la muestra
- Centrifuga.- para la separación de las fases en la muestra
- Espectrofotómetro UV-VIS.- para las lecturas de las absorbancias

- **Material Biológico**

- Fruto de *Persea americana Miller* "palta"
- Ratas machos albinas de cepa Holtzman provenientes del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

- **Materiales de Vidrio**

Materiales de laboratorio en total esterilidad, Matraz erlenmeyer, papel kraft, mortero y pilón, recipiente cónico de vidrio “embudo”, tubos de ensayo y papel filtro, fiolas de 50 mL, picetas de 500 mL, peras de decantación de 250 mL, estándar de cafeína y de quercetina, material quirúrgico y jaulas de Polietileno.

- **Reactivos**

Mayer, Wagner, Dragendorff, Reineckato, Reactivo de shinoda que es la suma de limaduras de magnesio y ácido clorhídrico qp, gelatina al 1%, cloruro férrico, para la reacción de Bortranger se usó el reactivo de hidróxido de sodio al 5%, Lugol, Ninhidrina, los reactivos de Fehling tanto A y B, etanol al 96°, metanol, agua destilada, cloroformo, isopropanol, acetato de sodio 1 M, tricloruro de aluminio al 2%, la fase móvil compuesta por agua y metanol (75:25), la composición de Butanol : Agua : AAG en proporciones de (4:3:1), el revelador con ácido sulfúrico 2 N, hidróxido de sodio al 10%, ácido tricloroacético al 20%, ácido clorhídrico 0.1 N, ácido Tiobarbitúrico y Malonaldehído.

3.4. Procedimiento experimental

Para el procedimiento experimental, esta se dividió en dos partes; la primera fue el tratamiento de la muestra *Persea americana Miller* “Palta” y los análisis correspondientes a la cual llamaremos la parte fitoquímica; una segunda parte constará de el efecto antioxidante a la cual llamaremos parte farmacológica.

Para la obtención de los datos se hará fichas de observación que serán elaborados por nosotros mismos los investigadores, teniendo en cuenta los respectivos indicadores.

3.4.1. Parte Fitoquímica

- **Recolección de la muestra:**

Se recolectó en el mes de junio del 2019 en el Fundo ARCCACC - Ocros - Ayacucho, de esta planta se utilizó la pulpa del fruto.

- **Limpieza y lavado del fruto de *Persea americana* Miller “Palta”**

Se recolectaron aproximadamente 4.5 Kg del fruto de *Persea americana* Miller “Palta”, estas fueron limpiadas con agua ultra pura tipo I (grado farmacéutico) se procedió a recolectar solo la pulpa obteniéndose 3 Kg.

- **Extracción acuosa del fruto de la Palta**

Se puso la pulpa del fruto de *Persea americana* Miller “Palta” en un recipiente de fondo plano 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 poder así poder extraer sus metabolitos sin alterarlos. Una vez culminada la extracción acuosa por reflujo se filtró la muestra en el embudo buchner que se encuentra acoplada a una bomba al vacío para generar presión al momento de la extracción. Aquí se obtiene el extracto líquido de la palta. Para este procedimiento se utilizó un peso promedio de palta de 250 gramos para un volumen de agua de 1000 mL, se considera la concentración del extracto para dosis posteriores en la parte farmacológica.

- **Extracto seco del fruto de la Palta**

Una vez obtenido el extracto líquido, una parte es destinada para la realización de la prueba de Cromatografía en su variante de capa fina y el resto es destinado en recipientes de porcelana para ser colocado en la estufa a temperatura no mayor de 40° C, con un tiempo de 24-48 horas, al transcurrir el tiempo es sacada de la estufa y recolectada en un recipiente hermético que será protegido de la luz y guardada a temperatura que oscilará de 2 a 8 °C hasta su utilización.

- **Tamizaje Fitoquímico**

Para la realización de esta prueba es necesario saber que se han probado diferentes métodos para poder determinar en forma preliminar los diferentes constituyentes químicos o mejor dicho metabolitos en las plantas, frutos, basándose en la extracción con solventes adecuados ya que este estudio es de coloración y precipitación.

Para la evaluación se hicieron pruebas para metabolitos Primarios y Secundarios, usando los siguientes reactivos.

Metabolitos Secundarios

➤ **Prueba para Alcaloides.-** Aplicado a compuestos que en su estructura presentan nitrógeno, propuesta la terminología por W. Meissner en 1819. Se utiliza reactivos generales porque tienen importancia en los métodos de búsqueda, aislamiento, purificación e incluso identificación, estos reactivos se agrupan en dos grandes grupos como son:

a.- Reactivos de Precipitación

a.1. Reactivos Yodados Precipitan a los alcaloides de las soluciones acuosas ácidas, bajo la forma de poliodatos complejos, como son:

Reactivo de Wagner (conformado por yodo-yoduro de potasio), siendo positiva cuando se aprecia un color marrón al agregar entre 3 a 5 gotas del reactivo.

Reactivo de Mayer (conformado por yoduro de potasio y mercurio), siendo positiva cuando se aprecia un color blanco a crema al agregar entre 3 a 5 gotas a una solución que se encuentra acidulada.

Reactivo de Dragendorff (conformado por yoduro de potasio y bismuto), siendo positiva cuando se aprecia un color rojo a naranja al agregar entre 3 a 5 gotas a la solución que se encuentra acidulada.

Con estos reactivos se obtienen combinaciones amorfas, coloreadas, a veces solubles en exceso de reactivo.

a.2.- Otros reactivos de precipitación: como son:

Reactivo de Reineckato (conformado por $\text{NH}_4 [\text{Cr} (\text{NH}_3)_2(\text{SCN})_4]2\text{H}_2\text{O}$), siendo positivo cuando se aprecia un precipitado floculante de color rosa al agregar entre 3 a 5 gotas del reactivo.

b.- Reactivos de Coloración: Se utiliza para identificar y dosificar a los alcaloides, se emplea ácidos minerales concentrados especialmente el Sulfúrico. Para la Doctora Olga Lock sobre el extracto a evaluar, se considera que hay presencia de alcaloides si se obtienen cuatro resultados positivos de los ya citados.

➤ **Prueba para Flavonoides y Compuestos Fenólicos:**

Para las pruebas en mención se trabajará con hidróxido de sodio al 5% para la reacción de Bortranger, así como también el reactivo de Shinoda, gelatina al 1% y cloruro férrico.

También es importante mencionar a las quinonas en sus dos variantes como son los antra y nafto quinonas, así como también, saber si los taninos puedan ser hidrosolubles o condensados de la forma de flavonoides o ácidos fenólicos respectivamente.

Reactivo de Shinoda: (conformado por el complejo de limaduras de magnesio y ácido clorhídrico qp.), las coloraciones que se presentan son variadas teniendo así diferentes tipos y cada una de ellas indica un flavonoide específico; así tenemos: flavonas y flavonoles de colores amarillas a rojas, flavanonoles de un color rojo magenta, flavanonas dando colores como rojo, violeta o azul, isoflavonas con una coloración amarilla, si esta no presenta coloración pueden ser isoflavononas, chalconas y auronas.

Reactivo de Cloruro Férrico: (conformado por cloruro férrico disuelto en agua), siendo positivo cuando se aprecia coloraciones azul, verde o negra cuando se le adiciona entre 3 a 5 gotas del reactivo. Es una prueba general.

Reactivo de Gelatina al 1%: (conformado por gelatina + cloruro de sodio), siendo positivo cuando se aprecia un precipitado blanco cuando se le adiciona entre 3 a 5 gotas del reactivo. Es una prueba para taninos.

Reactivo de Hidróxido de sodio al 5% (llamado reacción de Bortranger): siendo positivo cuando se aprecia una coloración roja al adicionar entre 3 a 5 gotas del reactivo para identificar quinonas.

➤ **Prueba para Aminoácidos:**

La prueba para la identificación de Aminoácidos es evidenciable por la reacción del reactivo de Ninhidrina con la muestra.

Reactivo de Ninhidrina: Se le agrega de 3 a 5 gotas a la muestra e inmediatamente es llevada a calentar, la presencia de una coloración rosada medio lila es positiva para aminoácidos.

Metabolitos Primarios

➤ Prueba para Carbohidratos:

Son polisacáridos más comunes en las plantas, se encuentran asociados a las ligninas e integran el material estructural de la pared celular.

Reactivo de Fehling A y B: se le adiciona 5 mL del reactivo A y B a la muestra de trabajo y posteriormente es llevada a baño maría, cuando se observe la presencia de precipitado anaranjado ladrillo será positivo para glúcidos.

➤ Prueba para Almidón

El almidón es la mezcla de dos polímeros como son la Amilosa y la Amilopectina.

Reactivo de Lugol: se adiciona 3 gotas del reactivo a la muestra en estudio si esta presenta una coloración oscura estamos en presencia de almidón en la muestra.

➤ Prueba para Cetonas

Reactivo de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH): Se añadió de 3 a 5 gotas del 2,4-DNPH a la muestra, para ver si hay presencia de la formación de un anillo rojizo que es positivo.

Tabla 02: Marcha Fitoquímica

Metabolitos Primarios	Reactivo de identificación	Reacción Positiva
Carbohidratos	Fehling A + Fehling B	Precipitado anaranjado ladrillo
Almidón	Lugol	Coloración oscura
Cetonas	2,4-DNPH	Formación de un anillo rojizo
Aminoácidos	Ninhidrina	Coloración negruzca
Metabolitos Secundarios	Reactivo de identificación	Reacción Positiva
Alcaloides	Wagner	Precipitado marrón
	Mayer	Coloración blanquecina
	Dragendorff	Precipitado rojo o naranja
	Reineckato	Coloración purpura
Flavonoides	Shinoda	Color rojo
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico	Color verde
Taninos	Gelatina al 1%	Precipitado blanco
Naftoquinonas y Antraquinonas	Reacción de Bortranger	Color rojo

Fuente: Elaborado por los investigadores

- **Prueba de solubilidad**

Para la realización de la prueba se contó con el extracto seco de *Persea americana Miller* "Palta", se tomó una cantidad de muestra seca y la colocó en los tubos de ensayo; se añadieron los reactivos como (Metanol, Alcohol de 96°, Cloroformo, Isopropanol y Agua) unos 5 mL. La prueba nos mostró la miscibilidad del soluto con el solvente.

Tabla 03. Prueba de solubilidad

N° Muestra	Solventes
M-1	Etanol
M-2	Metanol
M-3	Cloroformo
M-4	Agua
M-5	Isopropanol

Fuente: Elaborado por los investigadores

- **Prueba de cromatografía en capa fina (CCF)**

La Cromatografía en capa fina es usada ampliamente para la determinación cualitativa en el ámbito farmacéutico y productos naturales.

También esta técnica nos permite comparar las intensidades de las manchas observadas con los estándares adecuados.

Para la detección de las manchas se utiliza una luz de onda corta a 254 nm y una luz de onda larga a 365 nm a visualizar los colores dejados.

➤ **Cromatografía en capa fina para alcaloides**

Esta prueba cromatográfica se llevó a cabo usando como fase estacionaria a la sílica gel de la marca Merck y como fase móvil en proporciones especificadas de 25:75, para metanol y agua respectivamente; es en esta proporción donde se vio la elución de los metabolitos que pueda tener la Palta.

Se usó el estándar de cafeína como comparativo de que la fase móvil es la indicada para dicho metabolito. La concentración de la cafeína es de 10 mg/mL que se disolvió en metanol.

Para dicho ensayo se inyectó una muestra de 5 µl, tanto para el estándar como para nuestras muestras de *Persea americana Miller* (Palta).

Una vez terminada la elución de todos los metabolitos existentes en nuestra muestra como la de cafeína, se retiró la placa y se esperó hasta la evaporación del solvente; se usó la plancha de calentamiento, acto seguido para la evidencia se roció ácido clorhídrico a una concentración del 2% y el revelador de Dragendorff.

Se consideró positivo al observar manchas de color naranja, tanto en el estándar como nuestra muestra de *Persea americana Miller* (Palta).

➤ **Cromatografía en capa fina para flavonoides**

Esta prueba cromatográfica se llevó a cabo usando como fase estacionaria a la sílica gel de la marca Merck y como fase móvil en proporciones especificadas de 20:5:25 para butanol, ácido acético glacial y agua respectivamente, es en esta proporción es donde se ve la elución de los metabolitos que pudiera tener la Palta.

Se usó el estándar de Quercetina como comparativo de que la fase móvil es la indicada para dicho metabolito. La concentración de Quercetina es de 10 mg/mL que se disolvió en metanol.

Para dicho ensayo se inyectó una muestra de 5 µl, tanto para el estándar como para nuestras muestras de *Persea americana Miller* (Palta).

Una vez terminada la elución de todos los metabolitos existentes en nuestra muestra como la de Quercetina, se retiró la placa y se esperó hasta la evaporación del solvente; este proceso puede ser ayudado usando la plancha de calentamiento, se roció como revelador el reactivo de tricloruro de aluminio ácido clorhídrico a una concentración del 2%.

Se consideró positivo al observar manchas de color amarillo, tanto en el estándar como nuestra muestra de *Persea americana Miller* (Palta).

3.4.2. Parte Farmacológica

El presente trabajo tuvo como objetivo, primero la determinación de la Toxicidad Aguda Oral en ratas, para analizar si el extracto acuoso en estudio causa mortalidad o signos adversos en los animales de

experimentación y segundo la determinación del Efecto Antioxidante del extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* "Palta".

En ambos ensayos la administración del extracto acuoso fue por la vía oral.

En la prueba del efecto antioxidante de la muestra fue administrada mediante el empleo de una sonda nasogástrica a un total de 30 ratas machos distribuidas de la siguiente forma: tres niveles de dosis en 15 ratas albinas machos (250, 500 y 1000 mg/kg de peso corporal), 5 ratas control positivo, tratadas con el medicamento Silimarina a la dosis de 20 mg/kg y 5 ratas inducidas sin tratamiento, 5 ratas control negativo, animales normales, sin inducción alguna, todas de la cepa Holtzman.

- **Evaluación de la Toxicidad Aguda Oral - Método de Clases (DL₅₀)**

Se evalúa la toxicidad aguda oral del extracto acuoso que será administrada oralmente de acuerdo con la Guía OECD Test 423, mediante el uso de una sonda nasogástrica a dos grupos de tres ratas cada uno (un grupo con una repetición) y un grupo control (agua destilada).

Se realizarán observaciones diarias, buscando signos o síntomas de toxicidad o efectos adversos y mortalidad en los animales de experimentación. Además se hará control visual del agua y alimento ad libitum.

Tabla 04: Tratamientos de Toxicidad Aguda

Dosis (mg / Kg rata)	N° de animales Machos
2000	3
2000 (repetición)	3
Control	3

Fuente: Elaborado por los investigadores

La prueba incluye un tratamiento del extracto acuoso en estudio con una repetición con dosis de 2000 mg/Kg de peso corporal. El volumen de administración de la muestra diluida en agua destilada es de 1 ml, al grupo control se le administra agua destilada. La mortalidad se observa diariamente hasta 14 días.

- **Evaluación del Efecto Antioxidante**

La primera evaluación biológica de las actividades es la determinación del efecto antioxidante que comprende 6 grupos de experimentación.

Los diferentes tratamientos y respectivos valores de concentración se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 05: Tratamientos del Efecto Antioxidante

Grupos	Animales (ratas)	Vía	Dosis de paracetamol	Dosis de tratamiento
Control negativo	5	Oral	Solución salina	Solución salina
Inducido con paracetamol sin tratamiento	5	Oral	200 mg/kg	0
Control positivo (inducido)	5	Oral	200 mg/kg	20 mg/kg Silimarina
G. Experimentación 1 (inducido)	5	Oral	200 mg/kg	250 mg/kg p.c*
G. Experimentación 2 (inducido)	5	Oral	200 mg/kg	500 mg/kg p.c*
G. Experimentación 3 (inducido)	5	Oral	200 mg/kg	1000 mg/kg p.c*

p.c*: Peso Corporal de ratas
Fuente: Elaboración Propia

Aquí se incluye, la generación del daño hepático a las ratas, induciéndolas con paracetamol a la dosis de 200 mg/kg por 3 días sumando una dosis final de inducción de 600 mg/kg p.c*. De aquí se empieza el tratamiento por 21 días con el extracto a ensayar.

- **Inducción hepática con Paracetamol:**

Fue administrado a todas las ratas del grupo control positivo, control inducido sin tratamiento, control negativo y a los 3 grupos de tratamiento la dosis de 200 mg/kg peso corporal por tres días consecutivos para generar el daño hepático severo.

- **Administración de los tratamientos:**

La administración del extracto acuoso de *Persea americana Miller* "Palta" 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.

- **Actividad Antioxidante.- Determinación de TBars en homogenizado de hígado de ratas, inducidas con paracetamol.**

La segunda evaluación incluye el proceso de Liperoxidación de ácidos grasos para homogenizado, en este caso el hígado, como órgano dañado. Se realiza según las técnicas de Buege y Aust (descrita para plasma) que se basa en la medición de sustancias reactivas al ácido Tiobarbitúrico con formación del complejo Tiobarbitúrico - Malonaldehido (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 extracción de los hígados de todos los animales ensayados.

Finalmente se sigue la técnica citada para la determinación de la actividad antioxidante, con lectura de absorbancias de las muestras tratadas. Estas lecturas nos evaluarán la presencia del efecto antioxidante y a que concentraciones del extracto acuoso hay el efecto, y si es significativa con respecto a los controles (Análisis estadístico).

- **Condiciones de Ensayo**

Las condiciones de temperatura, humedad y fotoperiodo se llevaron a cabo en todo el proceso de experimentación en donde se registraron 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.

- **Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos, en los diferentes tratamientos, se analizaron estadísticamente con ANOVA (Análisis de Varianza) para evaluar el efecto del extracto acuoso sobre los diferentes tratamientos con niveles de significancia del 95% ($p < 0.05$), y luego por un test de comparación múltiple (Test de Tukey) para determinar si existen diferencias significativas entre ellas. Prueba de Normalidad de Anderson Darling, T-Student de 1 muestra para datos paramétricos y Wilcoxon para datos atípicos

3.5. Procesamiento de datos

Para el análisis estadístico de los resultados se realizó lo siguiente:

- Análisis de Varianza (ANOVA).
- Prueba de Tukey
- Prueba de Anderson Darling
- Prueba de T-Student de 1 muestra
- Prueba de Wilcoxon

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Presentación

Los resultados en todas las pruebas realizadas se demuestran en tablas y figuras para un mejor entendimiento de los objetivos planteados.

A. Resultados de la marcha fitoquímica

Tabla 06: Marcha Fitoquímica de *Persea americana* Miller “Palta”

N°	Metabolitos	Reactivo de identificación	Reacción Positiva	Resultado
1.	Alcaloides	Wagner	Precipitado marrón	(+++)
		Mayer	Coloración blanquecina	(+)
		Dragendorff	Precipitado rojo o naranja	(+++)
		Reineckato	Coloración purpura	(++)
2.	Flavonoides	Shinoda	Color rojo	(+)
3.	Compuestos fenólicos	Cloruro férrico	Color verde	(++)
4.	Taninos	Gelatina al 1%	Precipitado blanco	(+)
5.	Naftoquinonas y Antraquinonas	Reacción de Bortranger	Color rojo	(-)
6.	Carbohidratos	Fehling A + Fehling B	Precipitado anaranjado ladrillo	(++)
7.	Almidón	Lugol	Coloración oscura	(+)
8.	Cetonas	2,4-DNPH	Formación de un anillo rojizo	(+)
9.	Aminoácidos	Ninhidrina	Coloración negruzca	(+++)

Leyenda: (-) nulo; (+) poco; (++) moderado; (+++) abundante.

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la tabla 06: los resultados corresponden a *Persea americana Miller “Palta”* para la identificación de sus metabolitos, dando positivo para alcaloides y compuestos fenólicos en gran proporción.

B. Resultado de prueba de solubilidad

Tabla 07: Prueba de solubilidad de *Persea americana Miller “Palta”*

N°	Solventes	Resultado
1.	Etanol	Ps°
2.	Metanol	Ps°
3.	Cloroformo	Ins°
4.	Agua	S°
5.	Isopropanol	Ins

Leyenda: insoluble (Ins°), poco soluble (PS°), soluble(S°)

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la tabla 07: Los resultados corresponden a la prueba de solubilidad de *Persea americana Miller “Palta”* con diferentes solventes y grados de polaridad, siendo en el solvente de agua la mayor solubilidad y en menor grado para el etanol y metanol; esto se debe a que la extracción fue en medio acuoso y en esta prueba da la conformidad.

C. Resultado de cromatografía en capa fina

Tabla 08: Prueba de cromatografía en capa fina de *Persea americana* Miller “Palta”

Metabolitos secundarios	Fase Móvil	Resultado
Flavonoides	Rvo. BAW (Butanol: Ácido acético glacial: Agua) (20:5:25)	Se evidencian manchas amarillas
Alcaloides	Metanol: Agua (25:75)	Se evidencian manchas anaranjadas

Fuente: Elaboración Propia

D. Resultado de la Toxicidad Aguda Oral - Método de Clases (DL₅₀)

El extracto acuoso de *Persea americana* Miller (“Palta”) 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 09: Toxicidad Aguda Oral

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

Fuente: Elaboración Propia

Interpretación de la tabla 09: Los resultados corresponden a la toxicidad aguda oral donde se evidencia que no ha ocurrido muerte tanto en la primera inoculación como en la repetición.

E. Efecto Antioxidante (TBars):

De acuerdo con los resultados obtenidos la muestra analizada del extracto acuoso de *Persea americana Miller* ("Palta") presenta Efecto Antioxidante en el modelo estudiado, a las dosis de 250, 500 y 1000 mg de muestra/Kg de peso corporal. Estos resultados son significativos en comparación con el control y las dosis ensayadas.

Los niveles de Malonaldehido (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 $p < 0.05$.

Los datos son mostrados en la siguiente tabla:

Tabla 10: Resultado de TBars

Grupo/Dosis	TBARS (MDA uM//ml)	Nivel de significancia
Control negativo	0.06 ± 0.05	-
Inducidas sin tratamiento	0.52 ± 0.086	-
Inducidas Silimarina 20 mg/Kg	0.020 ± 0.003	* $p < 0.05$
Inducidas 250 mg/kg	0.083 ± 0.008	* $p < 0.05$
Inducidas 500 mg/kg	0.047 ± 0.008	* $p < 0.05$
Inducidas 1000 mg/kg	0.042 ± 0.039	* $p < 0.05$

* $p < 0.05$ = Existen diferencias significativas con respecto al grupo inducido sin tratamiento

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la tabla 10: los resultados de TBars demuestran que hay efecto antioxidante a medida de que aumente la concentración de *Persea americana Miller* "Palta".

Tabla 11: Resultado de Análisis de Varianza a los resultados de TBars a todas las concentraciones de *Persea americana Miller* (Palta)

Análisis de Varianza						
Origen de las variaciones	Suma de los cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Ent. Grupos.	0.928968	5	0.1857936	122.9918907	2.71246 E-16	2.62065
Dent. Grupos.	0.0362548	24	0.001510617			
Total	0.9652228	29				

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 11 se evidencian los resultados del Anova (análisis de varianza) de todos los grupos ensayados. Para un mejor entendimiento se hace referencia a las hipótesis correspondiente.

H₀: Todos los grupos presentan igual resultado de TBars ($P > 0.05$)

H_a: Todos o al menos uno de los grupos presentan diferente resultado de TBars ($P < 0.05$).

Criterio de aceptación: Como el nivel de significancia usado es de 5% y el P_{value} hallado es menor a ese valor y el $F_{\text{experimental}}$ es $>$ al $F_{\text{crítico}}$, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alterna. Por lo tanto estadísticamente existe diferencia significativa en todas las concentraciones ensayadas.

Los resultados obtenidos son (2.71×10^{-16}) menores al 0.05 del P_{value} y un $F_{\text{experimental}}$ de 122.99 mayor que el $F_{\text{crítico}}$, demostrando la aceptación de la hipótesis alterna con la cual se dice que todos o al menos uno de los grupos presenta diferente resultado de TBars.

Tabla 12: Resultado del Estadístico de Tukey a todas las concentraciones de *Persea americana Miller* (Palta) y Silimarina

Estadístico de Tukey		
HSD	0.072	(Diferencia honestamente significativa)
Mul	4.17	(Valor Q alfa de la prueba de Tukey)
Mse	0.0015	(Cuadrado del valor medio)
n	5	(Tamaño de muestra de cada uno de los grupos, número de elementos de cada grupo)

	Inducidas sin tratamiento	Silimarina 20 mg/Kg	Inducidas 250 mg/Kg	Inducidas 500 mg/Kg	Inducidas 1000 mg/Kg
Inducidas sin tratamiento		0.4996	0.4368	0.4728	0.4780

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 12 se determina los resultados estadísticos de Tukey comparándolos con el grupo Inducidos sin tratamiento

Criterio de aceptación: los valores mayores al HSD son los que hacen la diferencia, que los grupos comparados con el control negativo (Inducidas sin tratamiento) presentan efecto.

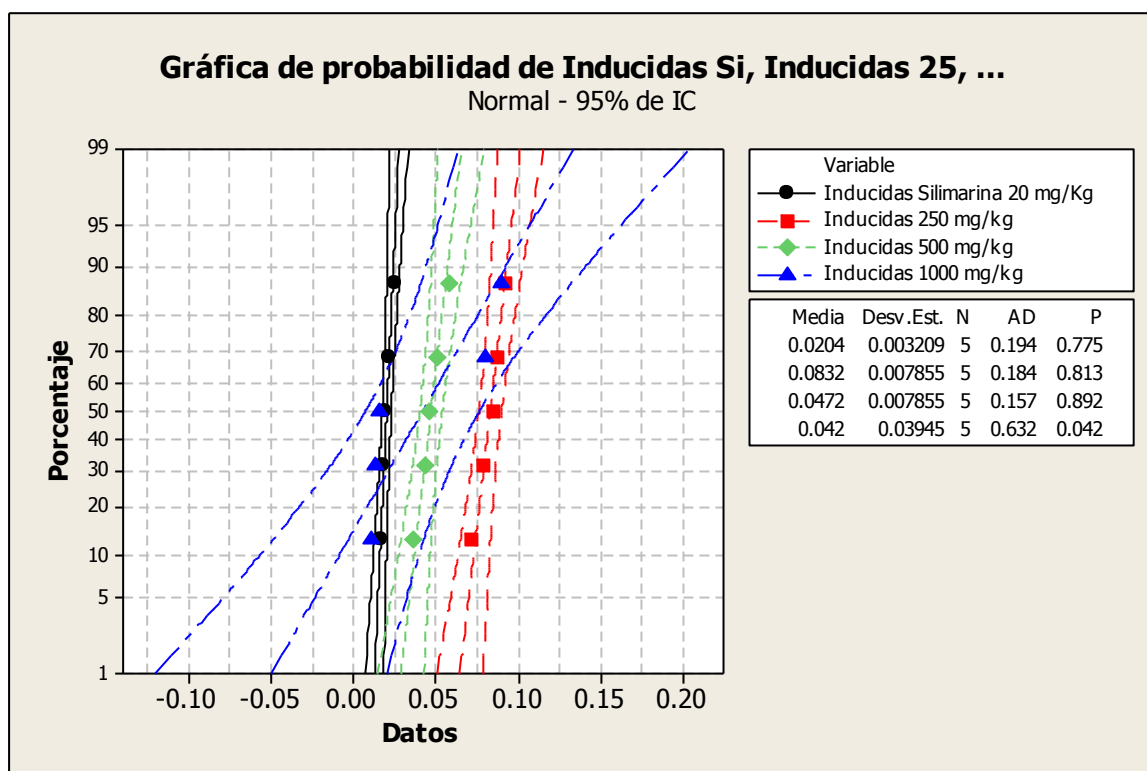


Figura N°05. Grafica de Distribución de Datos de las diferencias en valor absoluto

Fuente: Elaboración propia

La figura N° 05 nos muestra que el P_{value} para los datos de las concentraciones ensayadas es mayor a 0.05; excepto en la concentración de 1000 mg/Kg. Para el resultado se tomó como base las hipótesis correspondientes.

H₀: Los resultados Sí presentan una distribución normal.

H_a: Los resultados No presentan una distribución normal

Criterio de aceptación:

Para las variables de silimarina, 250 mg/kg y 500 mg/kg el $P_{\text{value}} > 0.05$ por lo tanto se rechaza la H_a , demostrando que los resultados según tabla presentan distribución normal.

Para la variable de 1000 mg/kg el $P_{\text{value}} < 0.05$ por lo tanto se rechaza la H_0 , demostrando que los resultados según tabla presentan una distribución No normal o No paramétrica.

Tabla 13: Resultado de T-Student de una muestra y Wilcoxon a todas las concentraciones ensayadas

T de una Muestra: de la Diferencia en Valor Absoluto								
Prueba de $\mu = 0.020$ Vs < 0.020								
Variable	N	Media	Des. St	E. St Me	95% L.S.	T	P	Estadístico usado
250 mg/Kg	5	0.08320	0.00785	0.00351	0.09069	17.99	1.000	T-Student 1 muestra
500 mg/Kg	5	0.04720	0.00785	0.00351	0.05469	7.74	0.999	T-Student 1 muestra
1000 mg/Kg	5	0.04650	--	--	--	--	0.705	Test de Wilcoxon

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 13 se puede ver los resultados al efectuar el análisis estadístico de T-Student de una muestra (datos Normales) y Wilcoxon (dato Atípico), teniendo resultados mayores al P_{value}

Para un mejor entendimiento se hace referencia a las hipótesis correspondientes.

H₀: Los resultados obtenidos son menores a 0.020

H_a: Los resultados obtenidos son mayores a 0.020.

Criterio de aceptación: Si $P_{\text{value}} > 0.05$ se rechaza la H_0 , demostrando que los resultados son mayores a 0.020

Tabla 14. Porcentaje de los resultados

N° Animales	Inducidas Silimarina 20 mg/Kg	%	Inducidas 250 mg/Kg	%	Inducidas 500 mg/Kg	%	Inducidas 1000 mg/Kg	%
1	0.022	94.8	0.072	82.9	0.058	86.2	0.011	97.4
2	0.025	95.1	0.092	82.0	0.046	91.0	0.090	82.4
3	0.017	96.3	0.085	81.5	0.051	88.9	0.016	96.5
4	0.020	96.6	0.079	86.4	0.037	93.6	0.080	86.2
5	0.018	97.1	0.088	86.0	0.044	93.0	0.013	97.9
Promedio	0.020	96.0	0.083	83.8	0.047	90.5	0.042	92.1

Fuente: Elaboración propia

Fórmula de Porcentaje:

$$\% = 100 \times \frac{(\text{Inducido sin Tratamiento} - \text{Grupo Ensayado})}{\text{Inducido sin Tratamiento}}$$

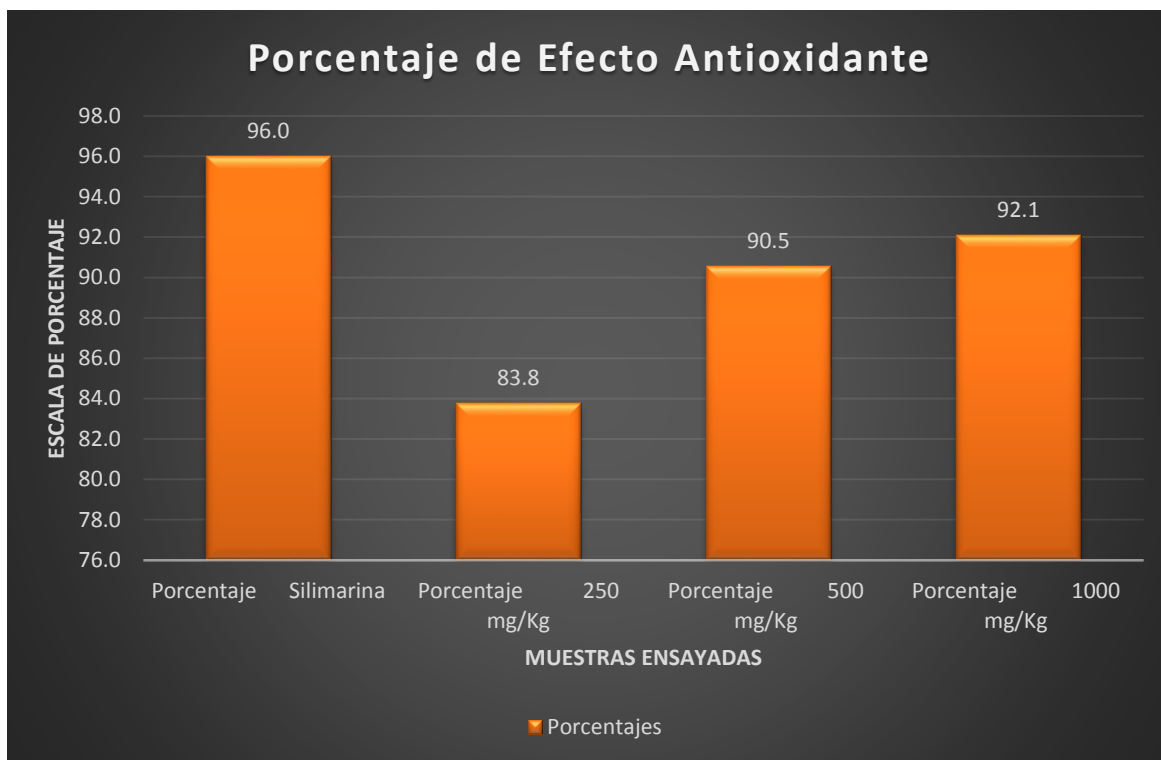


Figura N°06. Gráfica de los porcentajes de Efecto Antioxidante

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 14 y en la figura N° 06, Se observa los porcentajes obtenidos de las muestras ensayadas.

4.1.1. Contrastación de hipótesis

La contrastación de hipótesis se realiza basándose en los resultados de los estadísticos aplicados como son: Anderson Darling (prueba de normalidad), T-Student (T1 muestra – Wilcoxon) y estadístico de Tukey

Hipótesis General

H₀: El extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* “Palta” si posee efecto antioxidante en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducida por paracetamol.

H_a: El extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* “Palta” no posee efecto antioxidante en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducida por paracetamol.

Se recurre al estadístico de Anova (Análisis de varianza) y Tukey para evaluar la decisión.

Decisión.- Se rechaza la H_a y se acepta la H₀ por lo tanto estadísticamente el extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* “Palta” en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducida por paracetamol si posee efecto antioxidante.

Hipótesis Especifica 1

H₀: Si existen tipos de metabolitos secundarios con mayor presencia en el extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* “Palta”.

H_a: No existen tipos de metabolitos secundarios con mayor presencia en el extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* “Palta”.

Se cita la tabla N° 06 de la marcha fitoquímica donde se observa la presencia de metabolitos secundarios como: alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos y taninos, para evaluar la decisión.

Decisión.- Se rechaza la H_a y se acepta la H_0 por lo tanto estadísticamente si existen tipos de metabolitos secundarios con mayor presencia en el extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* “Palta”.

Hipótesis Específica 2

H₀: El extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* “Palta” presenta efecto antioxidante en todas las concentraciones (250, 500 y 1000 mg/kg) en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducido por paracetamol.

H_a: El extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* “Palta” no presenta efecto antioxidante en ninguna de las concentraciones (250, 500 y 1000 mg/kg) en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducido por paracetamol.

Se cita las tablas N° 11 y 12 y recurre al estadístico de Anova (Análisis de varianza) y Tukey para evaluar la decisión.

Decisión.- Se rechaza la H_a y se acepta la H_0 por lo tanto estadísticamente todas las concentraciones ensayadas (250, 500 y 1000 mg/Kg) del extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* “Palta” presentan efecto antioxidante en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducido por paracetamol.

Hipótesis Especifica 3

H₀: En el extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana* Miller “Palta” en todas las concentraciones (250, 500 y 1000 mg/kg) tiene mayor efecto antioxidante comparado con el fármaco de Silimarina.

H_a: En el extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana* Miller “Palta” en todas las concentraciones (250, 500 y 1000 mg/kg) no tiene mayor efecto antioxidante comparado con el fármaco de Silimarina.

Se cita las tablas N° 13 y 14 así como la figuras N° 05 y 06 y se recurre a los estadísticos de Anderson Darling (prueba de Normalidad) y T-Student (1 muestra) para evaluar la decisión.

Decisión.- Se rechaza la H₀ y se acepta la H_a por lo tanto estadísticamente ninguna concentración ensayada supera al fármaco de elección de Silimarina.

4.2. Discusión

El trabajo de investigación sobre el efecto antioxidante se basó en una extracción acuosa de la pulpa de la “palta” *Persea americana Miller*, por ser una de las técnicas más empleadas para la extracción en mayor cantidad de metabolitos que a fruto se refiere; esto lo puede afirmar Cabrera, J. (2015) cuando probó extractos de semilla de la “Palta” en medio etanólico, afirmando que es importante elegir un buen solvente de acuerdo a la parte de la planta para obtener óptimos resultados.

Los resultados del tamizaje fitoquímico revelaron la presencia de compuestos fenólicos y alcaloides con una evidencia notable y para aldehídos y cetonas con una sola poca evidencia; así lo señala Rosero, R. (2017), cuando obtuvo resultados muy notables al cuantificar los metabolitos de compuestos fenólicos, extrayéndolos de la semilla y pericarpio del fruto de aguacate, donde se evidenció el efecto antioxidante por el método de DPPH.

En las pruebas de solubilidad el estudio señala que la muestra es altamente soluble en agua y muy poco polar al disolverse en cloroformo e isopropanol. En las pruebas cromatográficas de capa fina, las fases móviles tienen buena elución para los alcaloides y flavonoides como lo plantea Olga, U (1994) en su libro de “Investigación fitoquímica”.

En la determinación de la actividad antioxidante de la pulpa del fruto de la *Persea americana Miller* “Palta” se procedió con el método de determinación por TBARS por el proceso de Lipoperoxidación de ácidos grasos para homogenizado según la técnicas de Buege y Aust (descrita para plasma) que se basa en la formación del complejo Tiobarbitúrico - Malonaldehído (MDA); obteniéndose grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a su concentración y con efecto muy bueno a la dosis de 500 y 1000 mg/Kg esto lo sostiene Sandoval, M. (2008), donde evaluó las semillas de Uva y por el mismo método teniendo resultados satisfactorios al igual que Troncoso, L. (2007) que precisó el efecto antioxidante del perejil demostrando que el uso del método de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) es una herramienta adecuada para determinar el efecto.

Al efectuar el estudio de comparación del extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana* Miller “Palta” se determinó que en ninguna de las concentraciones ensayadas de 250 mg/kg (83.8%), 500 mg/kg (90.5%) y de 1000 mg/kg (92.1%) superaron al fármaco de Silimarina (96.0%) sin embargo si se logra demostrar el efecto antioxidante en todas las concentraciones, estos resultados son similares al propuesto por Jiménez S. (2016), donde evaluó la actividad analgésica del extracto etanólico de las cáscaras de las pepas de *Persea americana* Miller “Palta Fuerte” obteniendo en su concentración de 100 mg/kg un resultado menor (88%) al Tramadol (94%). Demostrando de esa manera que las concentraciones a ensayar aun siendo menores en resultado que los fármacos de elección poseen el efecto farmacológico deseado.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones:

1. El extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* (palta) presenta efecto antioxidante frente a intoxicación hepática inducida por paracetamol en ratas albinas cepa Holtzman.
2. El extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* (palta) presentó metabolitos secundarios tales como alcaloides, taninos y compuestos fenólicos en mayor concentración.
3. Existe efecto antioxidante en todas las concentraciones estudiadas (250, 500 y 1000 mg/kg) del extracto acuoso del fruto de pulpa de *Persea americana Miller* (Palta) a la intoxicación hepática con Paracetamol en ratas albinas cepa Holtzman.
4. El extracto acuoso de la pulpa del fruto de *Persea americana Miller* (palta) en todas sus concentraciones (250, 500 y 1000 mg/kg) son menores al efecto antioxidante de la Silimarina en ratas albinas cepa Holtzman.

5.2. Recomendaciones:

1. Se recomienda hacer investigaciones de sinergia con las diferentes partes de la planta como la semilla o pericarpio.
2. Se recomienda realizar estudios más profundos para saber qué metabolito es el responsable de ejercer el efecto antioxidante en *Persea americana Miller* "Palta".
3. Se recomienda hacer estudios complementarios en un periodo de tiempo diferente.
4. Profundizar en estudios para buscar la concentración máxima que pueda ser mejor que el fármaco de Silimarina y con bajo efecto toxicológico.

REFERENCIAS

1. Troncoso L, Guija E. Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol. Anales de la facultad de medicina. Lima, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
2. Sandoval M, Lazarte K, Arnao I, Troncoso L, Guija E. Hepatoprotección antioxidante de la cáscara y semilla de *Vitis vinifera* L. (uva). Anales de la facultad de medicina. Lima, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008.
3. Tejada F. Hepatotoxicidad por fármacos. Rev. Clínica médica. España 2010. Disponible en <http://scielo.isciii.es/pdf/albacete/v3n3/especial1.pdf>.
4. Cabrera J, Dilas L, Minchán P. Determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto etanólico de la semilla de *Persea americana* Miller var. Hass "palta". Rev. Perspectiva. Cajamarca 2015.
5. Villar M. Composición nutricional y componentes bioactivos de cuatro variedades de paltas (*Persea americana*) comerciales chilenas. comparación de componentes bioactivos, cosechas 2011-20112 [Tesis]. Santiago, Universidad de Chile; 2016
6. Bermúdez D *et. al.* Evaluación del potencial hepatoprotector de la *Mentha piperita* L previo a la inducción de hepatotoxicidad con acetaminofén. Boletín Latinoamericano y del Caribe; 2014.
7. Organización Mundial de la Salud Medicina Tradicional 2014-2023. Disponible en:
http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95008/9789243506098_spa.pdf;jsessionid=62F1784CBA3182BBA487C24878490D89?sequence=1.

8. Delgado L. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. Rev. Científica de América Latina. España 2010. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=67415744003>
9. Jiménez S. Actividad analgésica del extracto etanólico de las cascara de las pepas *Persea americana* Mill “palta fuerte” en ratones. [Tesis]. Lima, Universidad Wiener; 2016.
10. Rengifo P. Caracterización del aceite de la semilla de palta *Persea Americana* Mill. Var. Hass fuerte y medición de su actividad antioxidante. [Tesis]. Lima, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
11. Chavez F, Aranda M, García A, Pastene E. Los polifenoles antioxidantes extraídos del epicarpio de Palta (*Persea americana var. Hass*) inhiben la ureasa de *Helicobacter pylori*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Chile, Universidad de Santiago de Chile; 2011.
12. Rosero J. Extracción y caracterización de los principios activos fenólicos con actividad antioxidante a partir de residuos de aguacate: epicarpio y semilla (*Persea americana*). [Tesis]. San Juan de Pasto. Colombia, Universidad de Nariño; 2017.
13. Vivero Chaclacayo Disponible en: <http://www.viverochaclacayo.com.pe/palta-fuerte-persea-americana-282-general.html>
14. Enciclopedia Cubana *Persea americana* Disponible en: <https://www.ecured.cu/Aguacate>
15. Vademecum. Paracetamol. Disponible en: <https://www.vademecum.es/principios-activos-paracetamol-n02be01>
16. Diario farma. Paracetamol, que es, cuando y como debemos tomarlo. Disponible en: <https://www.diariofarma.com/2017/05/02/paracetamol-cuando-debemos-tomarlo>

17. Enciclopedia Libre. Paracetamol. Disponible en:
<https://es.wikipedia.org/wiki/Paracetamol>

18. Artículos publicados en las bases de datos SCIMAGO. Disponible en:
http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol49_3_15/far19315.htm

19. Frascini F, Dermatini G, Espoti D. Pharmacology of Silymarin. Rev. Clin. Drug Invest. Italia 2002. Disponible en:
<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/s014.htm>

20. Ugaz, O. "Investigación Fitoquímica", Métodos en el estudio de productos naturales. Perú 1994.

21. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1978; 52:302-10. Cohelo RJL.

ANEXOS

ANEXO 1: Matriz de Consistencia

“EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA PULPA DEL FRUTO DE *Persea americana Miller* (palta) EN RATAS ALBINAS CEPA HOLTZMAN, CON INTOXICACIÓN HEPÁTICA INDUCIDA POR PARACETAMOL”

PROBLEMAS	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	INDICADORES	METODOLOGÍA	INSTRUMENTOS
<p>GENERAL</p> <p>¿El extracto acuoso de la pulpa del fruto de <i>Persea americana Miller</i> "Palta" posee efecto antioxidante en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducido por paracetamol?</p> <p>ESPECÍFICOS</p> <ol style="list-style-type: none"> ¿Cuál serán los tipos de metabolitos secundarios presentes en mayor concentración en el extracto acuoso de la pulpa del fruto de <i>Persea americana Miller</i> "Palta"? ¿En qué concentración del extracto acuoso de la pulpa del fruto de <i>Persea americana Miller</i> "Palta" posee efecto antioxidante en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducida por paracetamol? ¿Cuál será el efecto antioxidante del extracto acuoso de la pulpa del fruto de <i>Persea americana Miller</i> "Palta" en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducida por paracetamol comparado con el fármaco de Silimarina? 	<p>GENERAL</p> <p>Determinar el efecto antioxidante del extracto acuoso de la pulpa del fruto de <i>Persea americana Miller</i> "Palta" en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducidas por paracetamol.</p> <p>ESPECÍFICOS</p> <ol style="list-style-type: none"> Identificar los tipos de metabolitos secundarios que se encuentran en mayores concentraciones en el extracto acuoso de la pulpa del fruto de <i>Persea americana Miller</i> "Palta". Determinar que concentración del extracto acuoso de la pulpa del fruto de <i>Persea americana Miller</i> "Palta" posee efecto antioxidante en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducido por paracetamol. Comparar el efecto antioxidante del extracto acuoso de la pulpa del fruto de <i>Persea americana Miller</i> "Palta" en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducido por paracetamol comparado con el fármaco de Silimarina. 	<p>GENERAL</p> <p>El extracto acuoso de la pulpa del fruto de <i>Persea americana Miller</i> "Palta" en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducida por paracetamol posee efecto antioxidante.</p> <p>ESPECÍFICAS</p> <ol style="list-style-type: none"> Existen tipos de metabolitos secundarios con mayor presencia en el extracto acuoso de la pulpa del fruto de <i>Persea americana Miller</i> "Palta". Existe una concentración del extracto acuoso de la pulpa del fruto de <i>Persea americana Miller</i> "Palta" con efecto antioxidante en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducido por paracetamol. Existe en el extracto acuoso de la pulpa del fruto de <i>Persea americana Miller</i> "Palta" efecto antioxidante en ratas albinas cepa Holtzman con intoxicación hepática inducido por paracetamol comparado con el fármaco de Silimarina. 	<p>VI:</p> <p>Extracto acuoso de la pulpa del fruto de <i>Persea americana Miller</i> "Palta"</p> <p>VD:</p> <p>Efecto antioxidante</p> <p>V. INT.</p> <p>Peso de las ratas</p>	<p>VI:</p> <p>- Concentraciones a evaluar:</p> <p>250 mg/Kg</p> <p>500 mg/Kg</p> <p>1000 mg/Kg</p> <p>Paracetamol</p> <p>200mg/Kg</p> <p>Silimarina</p> <p>20 mg/Kg</p> <p>VD:</p> <p>Determinación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBars) o radicales libres.</p> <p>V. INT.</p> <p>Gramos de peso de las ratas</p>	<p>Diseño:</p> <p>Experimental</p> <p>Nivel: Explicativo</p> <p>Población: Fruto de la pulpa de la palta y Ratas albinas cepa Holtzman</p> <p>Muestra</p> <p>Extracto acuoso de la pulpa del fruto de <i>Persea americana Miller</i> "Palta"</p> <p>Técnicas:</p> <p>Estadístico de Anova y Tukey</p>	<p>Ficha y cuestionario de Observación Ad Hoc</p>

ANEXO 02: 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° 370-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 (tallo con hojas y fruto), recibida de **Jheffersón Alberto Tataje Nieto**; de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, Universidad Inca Garcilaso de la Vega; ha sido estudiada y clasificada como: ***Persea americana*** Miller.; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: MAGNOLIIDAE

ORDEN: LAURALES

FAMILIA: LAURACEAE

GENERO: Persea

ESPECIE: *Persea americana* Miller.

Nombre vulgar: "Palta fuerte"
Determinado por: Mg. María Isabel La Torre Acuy

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

Lima, 03 de Octubre de 2018

 
Mg. **ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA**
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/ddb

ANEXO 3: Fotos del trabajo realizado

1.- Lugar de recolección de la muestra



Palta del sector de Ocos - Ayacucho



2.- Pesado del fruto de la Palta para posteriores cálculos



3.- Pesado de la muestra biológica: Ratas Holtzman para posteriores cálculos.



4.- Extracción Acuosa del fruto de la Palta



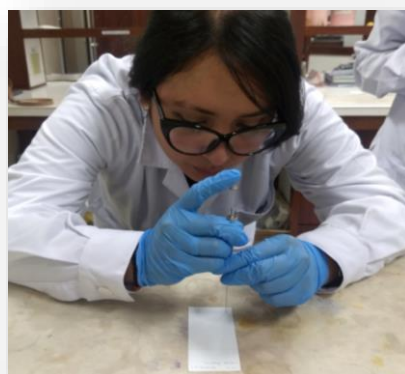
5.- Prueba de Cromatografía en Capa Fina “Alcaloides” y “Flavonoides”

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





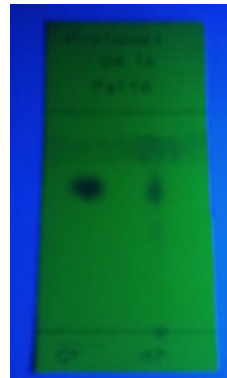
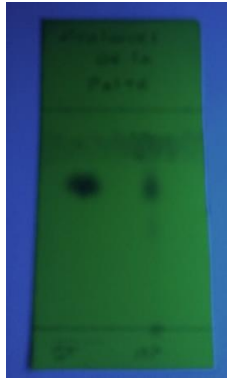
B.- Aplicación de los estándares de Quercetina y Cafeína con sus respectivas muestras de Palta.



C.- Implementos para la corrida en capa fina

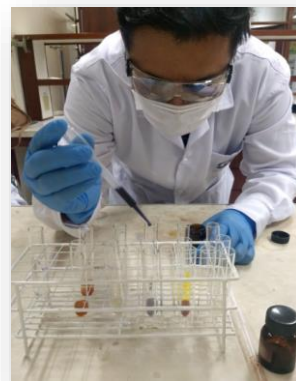
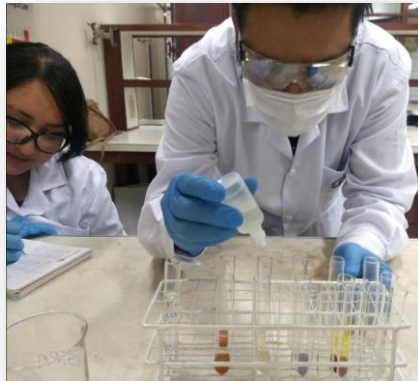


D.- Cromatografía en capa fina y la observación de las manchas

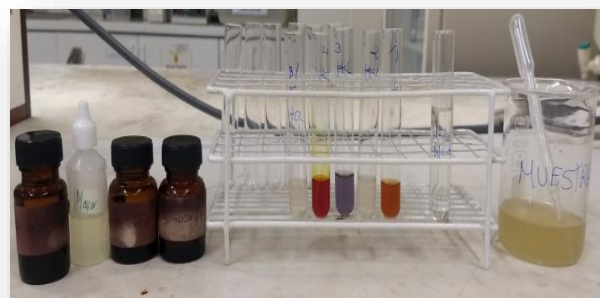
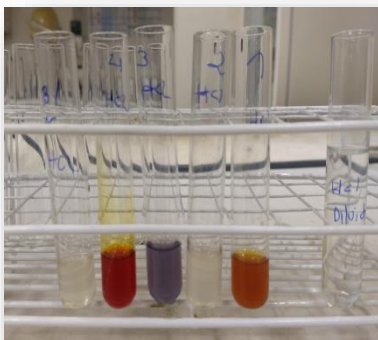


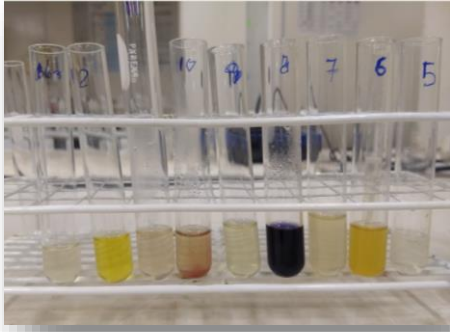
6.- Marcha Fitoquímica de la pulpa del fruto de la Palta

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



B.- Se procede a verificar los resultados obtenidos.





7.- Parte farmacológica de la pulpa del fruto de la Palta

A.- Administración oral del extracto acuoso de la palta



B.- Evaluación del Efecto antioxidante (Determinación del TBars)



Eutanasia: Dislocación cervical



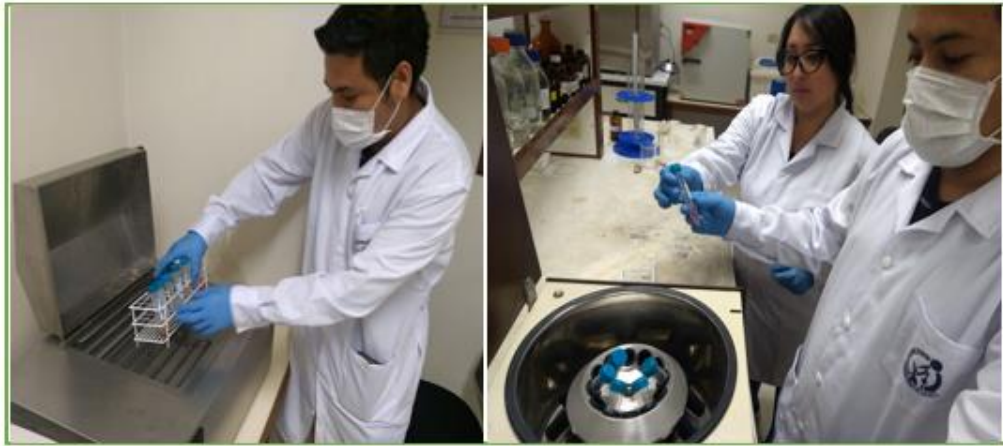
Necropsia: Extracción de hígados



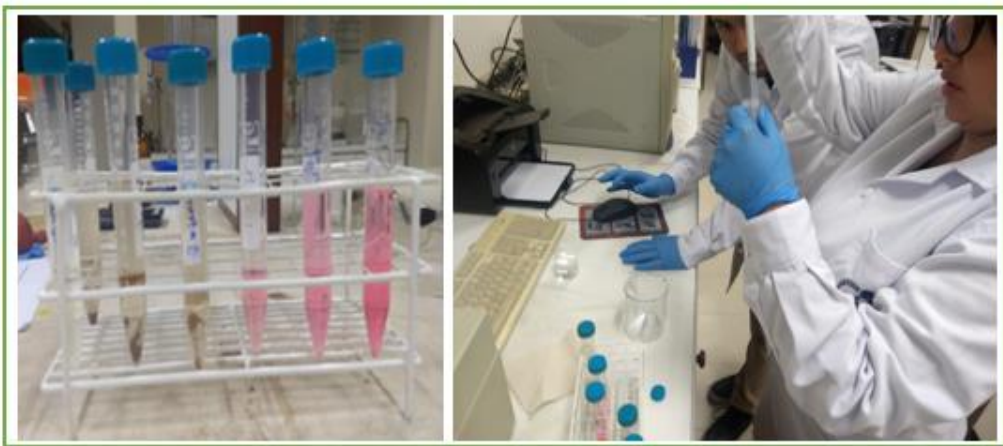
Homogenizado del hígado



Preparación del homogenizado para la medición de las sustancias reactivas al TBARS



Muestras llevadas a baño maría y luego a centrífuga



Lectura del sobrenadante en el UV-VIS

ANEXO 4: Fichas de Observación

FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE LA MARCHA FITOQUÍMICA

EFFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA PULPA DEL FRUTO DE *Persea americana Miller* (palta) EN RATAS ALBINAS CEPA HOLTZMAN, CON INTOXICACIÓN HEPÁTICA INDUCIDA POR PARACETAMOL

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 PALTA (<i>Persea americana Miller</i>)				
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.	ALCALOIDES	Wagner	Precipitado marrón	
		Dragendorff	Precipitado rojo o naranja	
		Mayer	Coloración blanquecina	
		Reineckato	Coloración purpura	
5.	COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl ₃	Coloración Verde	
6.	TANINOS	Gelatina 1%	Precipitado denso blanco	
7.	FLAVONOIDES	Shinoda	Flavanoles: Rojo a magenta	
8.	AMINOÁCIDOS	Ninhidrina	Coloración violácea	
9.	NAFTAQUINONAS, ANTRAQUINONAS Y ANTRANONAS	Bortranger (NaOH 5%)	Coloración roja	

Leyenda:

(-) : La coloración o precipitado no se evidencia.

(++) : La coloración o precipitado es moderada.

(+) : La coloración o precipitado es leve.

(+++): La coloración o precipitado es total.

CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

EFFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA PULPA DEL FRUTO DE *Persea americana Miller* (Palta) EN RATAS ALBINAS CEPA HOLTZMAN, CON INTOXICACIÓN HEPÁTICA INDUCIDA POR PARACETAMOL

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

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 lógica?.....() () () () () (x)

6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?.....() () () () () (x)

SUGERENCIAS

1. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?

Considero que los ítems propuestos son los indicados

2. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?

Considero que los ítems propuestos son los indicados

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

Considero que los ítems propuestos son los indicados

Fecha:

Validado por:

28 de JUNIO 2019
MARIO C. P.
J 399

**HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO
CUSTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA PULPA DEL FRUTO DE *Persea americana* (Palta) EN RATAS ALBINAS CEPA HOLTZMAN, CON INTOXICACIÓN HEPÁTICA INDUCIDA POR PARACETAMOL

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

50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100

7. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograran los objetivos propuestos?.....() () () () () (x)
-
8. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?.....() () () () () (x)
-
9. ¿Qué porcentaje de un ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?.....() () () () (x) ()
-
10. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?.....() () () () () (x)
-
11. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia logica?.....() () () () () (x)
-
12. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?.....() () () () () (x)

SUGERENCIAS

4. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?

Considero que los ítems propuestos son los indicados, ya que otros pueden ser tóxicos y fiscalizados.

5. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?

Considero que los ítems propuestos son los indicados.

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

Considero que hay que tener cuidado con el Cloroformo y con el Metanol este último por ser controlado, pero con mayor accesibilidad.

Fecha:

Validado por:

[Handwritten signature]
28/06/2018
8970
DR. Q.F. HECTOR VILCHEZ

FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA DETERMINAR EL EFECTO ANTIOXIDANTE DE *Persea americana Miller* (PALTA)

EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA PULPA DEL FRUTO DE *Persea americana Miller* (Palta) EN RATAS ALBINAS CEPA HOLTZMAN, CON INTOXICACIÓN HEPÁTICA INDUCIDA POR PARACETAMOL

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

TBARS (MDA uM//ml)						
Muestras	Control negativo	Inducidas sin tratamiento	Silimarina 20 mg/Kg	Inducidas 250 mg/Kg	Inducidas 500 mg/Kg	Inducidas 1000 mg/Kg
M-1						
M-2						
M-3						
M-4						
M-5						
Promedio						

**HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO
CUSTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA PULPA DEL FRUTO DE *Persea americana Miller* (Palta) EN RATAS ALBINAS CEPA HOLTZMAN, CON INTOXICACIÓN HEPÁTICA INDUCIDA POR PARACETAMOL

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

50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100

13. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?.....() () () () () (x)
-
14. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?.....() () () () () (x)
-
15. ¿Qué porcentaje de un ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?.....() () () () () (x)
-
16. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?.....() () () () () (x)
-
17. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica?.....() () () () () (x)
-
18. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?.....() () () () () (x)

SUGERENCIAS

7. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?

Considero que los ítems propuestos son los indicados.

8. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?

Considero que los ítems propuestos son los indicados.

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

Considero que se tomaron las medidas para que el trabajo abarque lo esperado.

Fecha:

20-06-19

Validado por:

Mg. Q.F. OSCAR FLORES GONZALEZ
