



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
DE CHIMBOTE
FILIAL TRUJILLO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA

**EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE SEMILLAS DE
Vitis vinifera (UVA) SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE
MALONDIALDEHIDO EN *Rattus rattus var. Albinus*
CON HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORA:

Bach. ANALY EMPERATRIZ DIAZ CASTILLO

ASESOR:

Mgtr. CÉSAR ALFREDO LEAL VERA

TRUJILLO – PERÚ

2018

JURADO EVALUADOR DE TESIS

Dr. Jorge Luis Díaz Ortega

Presidente

Mgr. Nilda María Arteaga Revilla

Miembro

Mgr. Luisa Olivia Amaya Lau

Miembro

Mgr. César Alfredo Leal Vera

Docente Tutor De Investigación

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darme la fortaleza
y la persistencia necesaria para
culminar mi carrera.

A la Universidad Católica los
Ángeles de Chimbote, a mi asesor
de tesis y a mis docentes por su
esfuerzo y dedicación en mi
formación profesional.

A mis Padres Segundo y Violeta
por apoyarme en todo momento,
por los valores que me han
inculcado y por ser un excelente
ejemplo de vida a seguir.

DEDICATORIA

A mi madre Violeta, por su apoyo en todo momento, por sus consejos, sus valores, por su motivación constante y por su amor.

A mi padre Segundo, por ser ejemplo de perseverancia y constancia, por su valor y por su amor.

A mis abuelitos Santiago y Manuela, y a toda mi familia, quienes siempre confiaron en mí y están presentes día a día en mi vida.

A Marcos Cano, por sus palabras y confianza, por su amor y por brindarme su apoyo para lograr mis metas.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación, fue de tipo experimental, de enfoque cuantitativo corte longitudinal, cuyo objetivo fue determinar efecto del extracto de semillas de *Vitis vinifera* (UVA) sobre la concentración de Malondialdehído en tejido hepático de *Rattus rattus* var. *Albinus* con hepatotoxicidad inducida., en el cual se emplearon 18 ratas macho con un peso aproximado de 200 a 250 mg; divididos aleatoriamente en 3 grupos (N = 6): control negativo solo recibió alimento y agua ad libitum, control positivo comida, agua ad libitum además de CCL₄ a dosis de 2 ml/kg vía oral para generar daño hepático sin extracto acuoso de semillas de *Vitis vinifera* y el experimental recibió una alimentación normal y el extracto acuoso de semillas de *Vitis vinifera* a 200 mg/ kg antes de iniciar el daño hepático con CCl₄ .El extracto se obtuvo mediante un evaporador rotativo al vacío y fue administrado por sonda orogástrica. Empleando como medida para el estudio principal el método de TBARs (especies reactivas al tiobarbitúrico). Los resultados promedio fueron en el grupo control positivo 286.84 ug/g, en el grupo control negativo 193.98 ug/g y en el grupo experimental 239.82 ug/g los cuales fueron sometidos a la prueba de T-STUDENT y prueba ANOVA, obteniéndose un valor de $p < 0.001$ indicando una diferencia estadísticamente significativa, concluyendo que el extracto acuoso de las semillas de *Vitis vinifera* presentó un efecto antioxidante.

Palabras clave: Plantas medicinales, *Vitis vinifera*, uva, antioxidante, tetracloruro de carbono

ABSTRACT

The present research work was of an experimental type, with a longitudinal cut quantitative approach, whose objective was to determine the antioxidant effect of the extract of the seeds of *Vitis vinifera* in *Rattus rattus* Var. Albinus, in which 18 male rats weighing approximately 200 to 250 mg were used; divided randomly into 3 groups (N = 6): negative control received only food and water ad libitum, food positive control, water ad libitum in addition to CCL₄ a dose of 2 ml / kg orally to produce liver damage without watery seed extract *Vitis vinifera* and the experimental one received a normal diet and the aqueous extract of *Vitis vinifera* seeds 200 mg / kg before initiating liver damage with CCL₄. The extract was made by a vacuum rotary evaporator and was administered by an orogastric tube. Using as a measure for the main study the method of TBARs (species reactive to thiobarbituric). The results averaged in the positive control group 286.84 ug/g, in the negative control group 193.98 ug/g and in the experimental group 239.82 ug/g which were subjected to the T-STUDENT test and ANOVA test, obtaining a value of p <0.001 indicating a statistically significant difference, concluding that the aqueous extract of the *Vitis vinifera* seeds presented an antioxidant effect.

Key words: Medicinal plants, *Vitis vinifera*, grape, antioxidant, carbon tetrachloride.

CONTENIDO	Página
Agradecimiento	iii
Dedicatoria	iv
Resumen	v
Abstract	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
III. HIPÓTESIS	12
IV. METODOLOGIA	13
4.1 Diseño de la investigación.....	13
4.2 Población y muestra	13
4.3 Definición y operacionalización de variables e indicadores	15
4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	16
4.5 Plan de análisis	19
4.6 Matriz de consistencia	20
4.7 Principios éticos	21
V. RESULTADOS.....	22
5.1 Resultados.....	22
5.2 Análisis de resultados.....	23
VI. CONCLUSIONES.....	25
Aspectos Complementarios.....	26
Referencias Bibliográficas.....	27
Anexos.....	32

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	Página
Tabla 01. Evaluación de la concentración de Malondialdehido en los grupos control positivo, negativo y experimental de especímenes de <i>Rattus rattus</i> var. <i>Albinus</i>	22
Tabla 02. Comparación del efecto entre los grupos control positivo, control negativo y experimental según la concentración de Malondialdehido en el homogenizado de muestras de hígado en especímenes de <i>Rattus rattus</i> var. <i>Albinus</i> analizados mediante la prueba ANOVA.....	22

I. INTRODUCCIÓN.

Hace algún tiempo el estudio de las plantas medicinales era abarcado por un personal calificado, seleccionado y de modo popular, los avances tecnológicos científicos, ha conllevado que se olvide estas investigaciones e incluso que se aleje de la presentación natural ⁽¹⁾.

Actualmente el 80% de la población, recurre al uso de plantas medicinales para el alivio y mejoría de las diversas patologías o enfermedades debido a la fácil accesibilidad que poseen y al costo menor que presentan frente a los fármacos ⁽²⁾.

El Perú posee más de 4400 variedades de plantas medicinales, siendo la serranía la que mayor porcentaje presenta, ya que es donde la población tiene más cuidado en su cultivo por su empleo para aliviar enfermedades ⁽²⁾.

Muchos estudios, presentados en los últimos años, demuestran que el estrés oxidativo, está vinculado con el origen de diversas patologías (artritis, demencia, cáncer, etc.), debido a ello que el uso de antioxidantes ha denotado mayor importancia en el tratamiento de accidentes cerebrovasculares (ACV) y enfermedades neurodegenerativas ⁽³⁾.

El estrés oxidativo generalmente causa la destrucción de las paredes celulares, alteración del sistema inmunitario, material genético; genera debilitamiento, etc. En los últimos años, se ha incrementado el consumo de alimentos naturales y beneficiosos para la salud humana a los cuales se les ha denominado “alimentos funcionales”, los cuales han denotado mucha importancia debido a las propiedades medicinales que presentan en su forma natural ⁽³⁾.

Las semillas de *Vitis Vinifera* contienen polifenoles (C₆C₃C₆), los cuales son potentes antioxidantes, y han sido muy estudiados en los últimos años ⁽⁴⁾.

Consumir de modo continuo el jugo de uvas genera un consumo rico en flavonoides, disminuyendo de este modo el riesgo contraer problemas cardiacos, debido a la capacidad antioxidante que presenta ⁽⁵⁾.

El estrés oxidativo, producidas por diversos estímulos como el propio metabolismo, pueden desencadenar un aumento de los procesos de peroxidación lipídica (PL), proteica, alteraciones en ADN y desgaste celular, alterando el balance redox celular y conllevando al desarrollo del denominado estrés oxidativo ⁽⁶⁾.

Las sustancias antioxidantes retrasan los procesos, que a modo teórico suele ser beneficioso, actualmente se observa relaciones directas en cuanto enfermedades degenerativas crónicas ⁽⁶⁾.

El hígado es el órgano más afectado .La apoptosis está vinculada con el incremento del estrés oxidativo. La semilla de la uva, contiene a polifenoles, vitaminas C y E, flavonoides, etc, con mayor probabilidad antioxidante ⁽⁷⁾.

La barrera que tiene el organismo contra el estrés oxidativo es innata, pero se vincula con la dieta y semillas de la uva; ya que al ser antioxidante, es una protección de natural ⁽⁷⁾.

“Los estudios epidemiológicos de Hertog y col. , Hein y col. y McElduff y col. relacionan el consumo moderado y regular de vino con una disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, crónicas y degenerativas, realizados a raíz de la 'paradoja francesa” ⁽⁷⁾.

Los contenidos fenólicos de la uva los encontramos en la cáscara, semilla y tejido vascular. La pulpa, contiene más ácidos fenólicos. Los flavonoles y antocianos los encontramos en cáscara de la uva, es por eso que explica la coloración rojiza de los vinos tintos ⁽⁷⁾.

Las procianidinas y flavanoles se encuentran en las semillas; los vinos blancos, contienen más fenoles los cuales están presentes en la pulpa, mientras que en los tintos, la maceración alcohólica permite la liberación y solubilizarían de los flavonoides ⁽⁷⁾.

Dichos compuestos son sustancias orgánicas distribuidas en el reino vegetal. Su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres, desde el grupo hidroxilo aromático- se dona un radical, y la estabilidad de la estructura quinona resultante, tiene la capacidad de soportar un electrón desapareado ⁽⁷⁾.

Los radicales libres (RL) son derivados del oxígeno y no poseen efectos tóxicos, los cuales están en constante formación y en pequeñas cantidades ⁽⁷⁾.

En tiempo normal, la producción de R.L. es continua y neutralizada por las defensas antioxidantes ⁽⁷⁾.

Por lo antes expuesto se plantea la siguiente interrogante:

¿Presentará efecto el extracto de semillas de *Vitis vinifera* (UVA) sobre la concentración de Malondialdehído en tejido hepático de *Rattus rattus var. Albinus* con hepatotoxicidad inducida?

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

OBJETIVO GENERAL

Determinar efecto el extracto de semillas de *Vitis vinifera* (UVA) sobre la concentración de Malondialdehído en tejido hepático de *Rattus rattus var. Albinus* con hepatotoxicidad inducida.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la concentración de Malondialdehído en el grupo control negativo experimental de *Rattus rattus var. Albinus*.
- Evaluar el efecto del CCL₄ sobre la concentración de Malondialdehído en el grupo control positivo.
- Evaluar el efecto del extracto acuoso de *Vitis vinifera* después de la administración de CCL₄ sobre la concentración de Malondialdehído en el grupo experimental.
- Comparar la concentración de Malondialdehído entre los grupos control positivo, control negativo y experimental en el homogenizado de muestras de hígado en especímenes de *Rattus rattus var. Albinus*.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA.

2.1 Antecedentes.

Sandoval, et al ⁽¹⁰⁾ En el 2008 en Perú, en su investigación titulada hepatoprotección antioxidante de la cáscara y semilla de *vitis vinifera* L. (uva) el cual busco determinar la capacidad hepatoprotectora antioxidante, inducida por las semillas y cáscaras de la uva *vitis vinifera* L., en animales de experimentación con agresión alcohólica, mediante la prueba del tbars (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico).

Oyarzábal, et al ⁽⁶⁾ En el 2010 en Cuba, investigo el efectos del policosanol, el extracto de semillas de uva y su terapia combinada sobre marcadores oxidativos en ratas, donde el policosanol, mezcla de alcoholes alifáticos primarios superiores obtenida de la cera de caña de azúcar (*saccharum officinarum*, L.) y el extracto de semillas de uva (*vitis vinífera*, L), producen efectos antioxidantes demostrados experimental y clínicamente.

Mesa, et al ⁽¹⁵⁾ En el 2010 en Cuba, investigo la Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum* donde la búsqueda de nuevos compuestos antioxidantes naturales ha sido de gran interés para la investigación dado que interrumpen el proceso de oxidación por vía radicalaria de lípidos, proteínas, ADN y enzimas. El género *Calophyllum* perteneciente a la familia *Clusiaceae*, produce una gran variedad de metabolitos secundarios con características antioxidantes; los flavonoides, las coumarinas y las xantonas resultan los compuestos más reportados. Las especies de este género pueden ser una fuente de antioxidantes potenciales.

Vélez, et al ⁽¹⁷⁾ en el 2012 en Colombia, presento su investigación titulada papel del resveratrol de uva como antioxidante el cual analizó el papel antioxidante del resveratrol en la salud animal frente al estrés oxidativo. Los compuestos antioxidantes polifenólicos de la uva como el resveratrol, se encuentran en la piel, especialmente en las células epidérmicas y en las semillas; siendo su concentración baja en la pulpa. El resveratrol ha despertado un gran interés en la comunidad científica debido al amplio espectro de sus efectos biológicos.

Doroteo, et al ⁽¹⁶⁾ en el 2013 en Perú, presento su investigación titulada compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas el cual con miras a conocer el potencial de seis plantas peruanas para el desarrollo de fitocosméticos y/o nutracéuticos, en el presente estudio se determinó el contenido de ácido ascórbico, flavonoides y compuestos fenólicos totales; asimismo, se evaluó la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de uncaria tomentosa (uña de gato), zea mays (maíz morado), smallanthus sonchifolius (yacón), lepidium meyenii (maca), krameria triandra (ratania) y physallis peruviana (aguaymanto).

La actividad antioxidante in vitro de dichos extractos fue determinada por medio de los ensayos de inhibición de radicales dpph, superóxido e hidroxilo; como también a través de la medición de su poder reductor y actividad antioxidante total. Los extractos con mayor actividad antioxidante fueron los de uña de gato y ratania, lo cual puede deberse a sus altos contenidos de ácido ascórbico, flavonoides y compuestos fenólicos totales.

Aguilar, et al ⁽¹⁸⁾ en el 2015 en Chile, presento su investigación titulada uso integral de la vid en la elaboración de jugo de uva enriquecido con antioxidante, donde los hollejos, semillas, hojas y tallos de la vid, considerados desechos dentro de la industria vitivinícola, son una buena fuente de compuestos fenólicos que pueden ser recuperados para ser incluidos en un jugo de uva, enriquecido de esta manera en antioxidantes. Extractos generados a partir de jugo de uva no enriquecido en antioxidantes y hollejos (proporción 8:1), por medio de calor (60 °c) y agitación continua, lograron una concentración de polifenoles más alta que los jugos generados con hollejos y aplicación de enzimas. los extractos de hojas alcanzaron concentraciones superiores de compuestos fenólicos que los extractos de hollejos y tallos, con un máximo de 3169 mg l⁻¹ de equivalentes de ácido gálico en la variedad cabernet sauvignon, y 93,5 mmol l⁻¹ de antioxidantes en la variedad lachryma christi, según abts. Los extractos de hollejos demostraron ser ricos en antocianinas y en flavan-3-oles, y los extractos de hojas demostraron poseer concentraciones mayores de flavonoles y ácidos fenólicos, por sobre los otros tipos de extractos, según el análisis por hplc-ms.

2.2 Bases Teóricas.

Farmacognosia.

Es la ciencia que estudia la forma de actuar y reaccionar los medicamentos naturales, en aspectos como el nacimiento, estructura de la misma y sus compuestos químicamente reactivos que van a ejercer el efecto terapéutico ⁽⁸⁾.

Plantas Medicinales.

Abarca a todas aquellas plantas que en su composición se encuentran algunas sustancias que actúan como principios activos y que al ser administrados la cantidad establecida, ejerce un efecto curativo ⁽⁸⁾.

Hoy en día se estima que existen unas 260.000 tipos de plantas que han sido estudiadas, y de este número el 10% se puede denominar planta medicinal las cuales han sido analizadas para desarrollar tratados médicos y establecer su dosificación ⁽⁸⁾.

Vitis Vinifera.

Esta planta posee tallos trepadores y zarcillos que funcionan como órganos específicos, las hojas en la mayoría de los tipos de variedades presenta nerviaciones, las flores son unisexuales y el fruto procede en un promedio de 2 años después ⁽¹²⁾. (Ver anexo 01)

Partes de *Vitis vinífera*.

Encontramos estas capas diferenciadas:

- Cutícula: es la capa superficial y mayormente la componen ácidos grasos hidroxilados y se encuentra recubierta por la pruina ⁽¹²⁾.
- Epidermis: es la capa del medio que a su vez abarca una o dos fases de células dispuestas de forma regular ⁽¹²⁾.
- Hipodermis: es la capa más cercana a la pulpa, existiendo capas más interiores que en ocasiones pueden llegar a confundirse con ésta ⁽¹²⁾.

Morfología.

La planta de la uva se siembra y está constituida por dos sistemas, por el sistema radical (*Vitis spp.* del grupo americano, el cual abarca la mayor parte), y es llamado el patrón y, la parte aérea (*Vitis vinifera L.*), como variedad determinada y esta a su vez abarca el tronco y los pámpanos que contienen a las hojas, los racimos y las yemas. El conjunto de estos dos sistemas mediante un injerto es lo que conforma esta cepa ⁽⁹⁾.

Clasificación Científica.

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Vitales
- Familia: Vitaceae
- Género: Vitis
- Nombre Científico: *Vitis vinífera* ⁽¹²⁾.

Contenido y principios activos:

Hojas

Derivados polifenólicos: antocianósidos, leucoantocianósidos ⁽¹²⁾.

Flavonoides (4 a 5%) (rutósido, quercitrósido, isoquercitrósido, kenferol, luteolol) ⁽¹²⁾.

Taninos gálicos y catéquicos ⁽¹²⁾.

Frutos

Glucosa, tartárico, málico, succínico, cítrico y oxálico ⁽¹²⁾.

Semillas

15-20% de ácidos grasos derivados del ácido fenilacrílico ⁽¹²⁾.

Valor nutricional

El contenido de *Vitis vinifera* suele variar según la clase de uva, pero en forma global, su aporte en hidratos de carbono es mayor, y debido a esto proporciona mucha energía al cuerpo humano, Son hidratos de carbono de buena asimilación como glucosa, fructuosa, sacarosa, dextrosa y levulosa. Estas también son ricas en compuestos fenólicos, principalmente el estilbenos (resveratrol) y los flavonoides ⁽¹²⁾. (Ver anexo 02)

Composición Química

Compuestos fenólicos

El término fenoles posee un promedio de 8000 compuestos que aparecen en el ambiente. Todos ellos tienen una estructura en común: un anillo fenol, es decir, un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo ⁽⁹⁾.

Los flavonoides son los polifenoles que tienen al menos 2 subunidades fenólicas; los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas se denominan taninos ⁽⁹⁾.

Propiedad antioxidante de los polifenoles

Los antioxidantes son unas sustancias que poseen la propiedad de prevenir la degeneración donde intervienen la acumulación de radicales libres en el cuerpo humano lo que se asocia muchas veces con padecimientos cardiovasculares o cáncer, por lo que disminuye que un prooxidante oxide el sustrato ⁽⁹⁾.

Los antioxidantes pueden ejercer estos procesos: ⁽⁹⁾

- Impide la formación de ROS, ayudando a modular las enzimas que intervienen en el estrés oxidativo.
- Forma una barrera frente al ataque de ROS.
- Aislado las sustancias reactivas y formándolos en moléculas menos reactivas.
- Mejora el daño causado por ROS.
- Mantiene un espacio favorable para que los antioxidantes cumplan con su función.
- Amplia la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ROS.

Posee una labor antioxidante de las sustancias polifenolicas depende de su formación estructural y de su número oxidrilo, esta propiedad para neutralizar los compuestos de oxígeno e impedir la oxidación, para ello esto también dependerá de la concentración y calidad de la sustancia. Los polifenoles pueden neutralizar a enzimas generadoras de ROS, como son la xantina oxidasa y la nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa ⁽⁹⁾.

III. HIPÓTESIS

H1: El extracto de las semillas de *Vitis vinifera* presenta efecto antioxidante.

H0: El extracto de las semillas de *Vitis vinifera* no presenta efecto antioxidante.

IV. METODOLOGIA

El presente trabajo de investigación fue de tipo experimental, de enfoque cuantitativo y corte longitudinal.

4.1. Diseño de la investigación

Los grupos están conformados por:

Grupo control negativo: Este grupo estuvo conformado por 6 animales de experimentación (*Rattus rattus* var. *Albinus*), recibieron alimentación balanceada y agua ad libitum.

Grupo control positivo: Este grupo estuvo conformado por 6 animales de experimentación (*Rattus rattus* var. *Albinus*), recibieron alimentación balanceada, agua ad libitum y CCl_4 el sexto y séptimo día.

Grupo Experimental Este grupo estuvo conformado por 6 animales de experimentación (*Rattus rattus* var. *Albinus*), se le administró CCl_4 (2ml /kg) hasta inducir hepatotoxicidad. Antes de la hepatotoxicidad se administró el extracto acuoso de *Vitis vinifera* a una dosis de 200mg kg de peso vivo por sonda orogástrica.

4.2. Población y muestra

Población Vegetal

El *Vitis vinifera* tiene mucha importancia agroeconómica del género *Vitis*; dicha planta pertenece a la familia de las vitaceae, siendo un arbusto pequeño, generalmente cosechada en febrero y abril.

Muestra vegetal

Las semillas fueron la parte seleccionada de la planta, los cuales fueron almacenados en cajas de madera y envueltas en tela de yute para el envío a Trujillo.

Se recolectaron en el Departamento de La Libertad, provincia de Gran Chimú en el mes de febrero del 2017, en un estado de madures biológica (ver anexo 03).

Criterios de Inclusión

Semillas de mayor tamaño.

Semillas íntegras sin laceraciones y mohos.

Criterios de Exclusión

Semillas pequeños.

Semillas con de laceraciones y mohos.

Población biológica

Especímenes de *Rattus rattus* var. *albinus* machos de 3- 4 meses de edad cuyos pesos promedios estaban comprendido entre 200 a 250 g, procedentes del bioterio de la Universidad Cayetano Heredia en Lima.

Muestra Biológica

18 Especímenes de *Rattus rattus* Var *albinus* distribuidos de manera aleatoria en tres grupos (control positivo, control negativo y control experimental), colocándolos en jaulas individuales en un ambiente de temperatura constante de 20°C, con ciclos alternados de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, los animales fueron acondicionados en cajas de 18 polipropileno, empleando viruta de madera como encamado (cambiada cada 3 días) con tapa de rejilla de acero inoxidable.

Los animales de experimentación tuvieron 7 días de aclimatación antes de iniciar propiamente el experimento, recibiendo una alimentación balanceada (ver anexo 04)

4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores

Variable Independiente Extracto acuoso de las semillas de *Vitis vinifera* (Uva), se entiende al extracto sin fermentar, el cual se obtiene por un proceso mecánico a partir de las semillas previamente seleccionadas (CODEX 2005)

Variable dependiente: Efecto antioxidante en *Rattus rattus* var. *Albinus*

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicadores	Escala De Medición
Extracto de <i>Vitis Vinifera</i> (Variable independiente)	Concentrado de principios activos distribuidos en un volumen determinado	Se utilizó una sola concentración del extracto de <i>Vitis Vinifera</i>	Extracto a dosis de 200 mg/kg el grupo experimental.	Variable cualitativa nominal
Efecto Antioxidante (Variable dependiente)	Es la capacidad de un compuesto para retardar la oxidación de una molécula.	Se determinó la disminución de los niveles de Malondialdehído.	ug/g.	Variable cuantitativa de razón

4.4 .Técnicas e instrumentos de recolección de datos:

Técnica: Obtención del extracto acuoso de las semillas de *Vitis vinífera*:

La muestra fue recolectada en Cascas en el mes de febrero del 2017. Se recolecto en su estado de madurez biológica y sin laceraciones.

Para realizar el secado de la muestra vegetal esta fue extraída del fruto y puesta a secar en papel secante, separadas en capas delgadas bajo sombra a temperatura ambiente para no perder su efecto antioxidante este proceso puede demorar entre 4 a 6 días, luego las semillas fueron molidas y posteriormente tamizadas para separar las partículas gruesas, hasta obtener un polvo fino, que fueron guardados en frascos de vidrio ámbar protegidos de la luz.

Concentración del Extracto:

El extracto a concentrar fue obtenido por medio de una extracción acuosa a 90°C, durante 3 horas, a partir de semillas de *Vitis vinífera*. La relación sólido-líquido fue 1 g de semillas y 10 ml de solvente.

La concentración se llevó a cabo en un evaporador rotativo al vacío, trabajando a una temperatura de 60°C, Mediante esta técnica se obtuvo 50 mg/ml de *Vitis vinífera* a partir de la concentración inicial obtenida se trabajó a una dosis de 200mg/kg.

Administración de los tratamientos:

En el presente trabajo de investigación se utilizó CCl₄ como inductor de daño hepático severo y para evaluar el efecto antioxidante del extracto de las semillas de *Vitis vinifera*, se utilizaron 18 especímenes de *Rattus rattus* var. *Albinus*, distribuyéndose en 3 grupos:

- Al grupo experimental se administró el extracto acuoso de *Vitis vinifera* en dosis diaria de 200 mg/kg, por sondo orogástrica durante 7 días, por las mañanas y antes de la comida, el sexto y séptimo día se administró conjunto con el extracto acuoso la dosis de 2ml/kg de CCL₄.
- Al grupo control negativo no se administró ningún tratamiento y se mantuvo en condiciones normales de agua y comida.
- Al grupo control positivo se administró comida y agua en condiciones normales y el CCL₄ a dosis correspondiente 2ml/kg peso durante el 6to y 7mo día.

Al octavo día para el sacrificio de los animales de empleo una dosis de Ketamina de 50 mg/kg.

Técnica de obtención del homogenizado del hígado:

Se realizó una laparotomía a nivel de la línea media del abdomen, se extrajo el hígado, fue lavado en solución fisiológica de cloruro de sodio al 0,9 % y se le secó en papel adsorbente, siendo luego almacenado en la misma solución, en un conservador, se molió en un mortero de porcelana, un gramo de este fue homogenizado con 5ml de la misma solución para la técnica de TBARS, y se filtró haciendo uso de una gasa. (Ver anexo 11)

Técnica de medición de formación de radicales libres: Test TBARS

El fundamento de este técnica es hacer reaccionar la muestra con ácido tiobarbiturico, para estimar mediante una absorbancia de 532 – 535nm.

En tubos de 10ml de capacidad, se añadieron respectivamente 100ul de la muestra, con 100ul de agua destilada (muestra blanco), 100ul de disolución control (muestra control), y a continuación los siguientes reactivos:

- 0.1 ml de reactivo antioxidante (Disolución de 2,2 g/L de butilhidroxitolueno en etanol)
- 0.1 ml de reactivo catalizador (Disolución de 2.7 g/L de tricloruro de hierro en agua destilada)
- 1.5 ml de disolución tampón (Disolución de Hcl-glicocola a un pH 3.5)

Se disolvió 75, 05g de glicocola y 58,44g NaCl en 900ml de agua destilada, ajustando el pH con hidróxido de sodio 0.1 M y completar a 1L.

Esta mezcla se mantuvo durante 60 minutos a 4°C, luego se llevó a ebullición en baño maría a 90°C durante 60 minutos para desarrollar la máxima coloración. Los tubos son tapados para evitar la evaporación.

Luego se extrajo 2.5 ml de la mezcla con 2.5 ml de la disolución de butanol – piridina (1.5:1 V/V) y 0.5ml de agua destilada.

Tras mezclar y centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 min, los sobrenadantes se trasladan a un tubo limpio y se procedió a la lectura de absorbancias.

Tanto las muestras del homogenizado de hígado, como la disolución blanca y control, se realizaron de la misma manera.

4.5 Plan de análisis

Para los análisis del trabajo de investigación los resultados se sometieron a la prueba de T DE STUDENT Y ANOVA para las variables cuantitativas a una 95% de confianza, - 0.5 y un error del 5%.

4.6 Matriz de consistencia.

TITULO: EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE SEMILLAS DE <i>Vitis vinifera</i> (UVA) SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE MALONDIALDEHIDO EN <i>Rattus rattus</i> var. <i>Albinus</i> CON HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA						
Enunciado del problema	Objetivos	Hipótesis	Metodología	Variables	Indicadores y escala de medición	Plan de análisis
¿Presentará efecto antioxidante del extracto de semillas de <i>Vitis vinifera</i> (UVA) en tejido hepático de <i>Rattus rattus</i> var. <i>albinus</i> ?	<p>OBJETIVO GENERAL</p> <ul style="list-style-type: none"> •Determinar el efecto antioxidante del extracto de semilla de <i>Vitis vinifera</i> (Uva) en tejido hepático de <i>Rattus Rattus</i> var. <i>albinus</i>. <p>OBJETIVOS ESPECIFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> •Evaluar el efecto del CCl4 sobre la concentración de Malondialdehido en especímenes de <i>Rattus rattus</i> var. <i>Albinus</i> en el grupo tratado con Tetracloruro de Carbono. •Evaluar la concentración de Malondialdehido en el grupo control negativo de especímenes de <i>Rattus rattus</i> var. <i>Albinus</i>. •Evaluar el efecto del extracto acuoso de <i>Vitis vinifera</i> sobre la concentración de Malondialdehido después de la administración de CCl4 en especímenes de <i>Rattus rattus</i> var. <i>Albinus</i>. •Comparar el efecto entre los grupos control positivo, control negativo y experimental según los niveles de Malondialdehido en el homogenizado de muestras de hígado en especímenes de <i>Rattus rattus</i> var. <i>Albinus</i>. 	<p>H1: El extracto de las semillas de <i>Vitis vinifera</i> presenta efecto antioxidante.</p> <p>H0: El extracto de las semillas de <i>Vitis vinifera</i> no presenta efecto antioxidante.</p>	<p>El presente proyecto corresponde al de tipo de una investigación experimental, observacional, prospectiva, longitudinal, con un nivel de investigación de enfoque explicativo.</p> <p>Diseño: Se formaron 3 grupos de 6 ratas machos, cada uno distribuidos aleatoriamente: Grupo positivo Grupo negativo Grupo estándar</p>	<p>Independiente: Extracto de semillas de <i>Vitis vinifera</i> (uva)</p> <p>Dependiente: Efecto Antioxidante</p>	<p>Variable cualitativa nominal</p> <p>Variable cuantitativa de razón</p>	<p>Para los análisis del trabajo de investigación los resultados se sometieron a la prueba de T DE STUDENT Y ANOVA para las variables cuantitativas a un 95% de confianza, 0.5y un error del 5%</p>

4.7 Principios éticos.

Para la ejecución de este trabajo de investigación se tomó en cuenta los siguientes principios éticos:

Protección a las personas: La persona en toda investigación es el fin y no el medio, por ello necesitan cierto grado de protección, el cual se determinará de acuerdo al riesgo en que incurran y la probabilidad de que obtengan un beneficio.

Beneficencia y no maleficencia.- Se debe asegurar el bienestar de las personas que participan en las investigaciones. En ese sentido, la conducta del investigador debe responder a las siguientes reglas generales: no causar daño, disminuir los posibles efectos adversos y maximizar los beneficios.

Justicia.- El investigador debe ejercer un juicio razonable, ponderable y tomar las precauciones necesarias para asegurarse de que sus sesgos, y las limitaciones de sus capacidades y conocimiento, no den lugar o toleren prácticas injustas

Integridad científica.- La integridad o rectitud deben regir no sólo la actividad científica de un investigador, sino que debe extenderse a sus actividades de enseñanza y a su ejercicio profesional.

Consentimiento informado y expreso.- En toda investigación se debe contar con la manifestación de voluntad, informada, libre, inequívoca y específica

El investigador debe ser consciente de su responsabilidad científica y profesional ante la sociedad. En particular, es deber y responsabilidad personal del investigador considerar cuidadosamente las consecuencias que la realización y la difusión de su investigación implican para los participantes en ella y para la sociedad en general ⁽²¹⁾.

V. RESULTADOS

5.1. Resultados

Tabla 01. Evaluación de la concentración de Malondialdehído en los grupos control positivo, negativo y experimental de especímenes de *Rattus rattus* var. *Albinus*.

Grupos	Promedio concentración MDA	Desviación Tip.
Grupo positivo	286.48 ug/g	4.095
Grupo negativo	193.98 ug/g	2.265
Grupo experimental	239.82 ug/g	1.630

Tabla 02. Comparación del efecto entre los grupos control positivo, control negativo y experimental según la concentración de Malondialdehído en el homogenizado de muestras de hígado en especímenes de *Rattus rattus* var. *Albinus* analizados mediante la prueba ANOVA.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	Coeficiente F	Sig.
Inter-grupos	25669.444	2	12834.722	1627.326	0.000
Intra-grupos	118.305	15	7.887		
Total	25787.749	17			

***Leyenda:**

- Gl: grados de libertad
- p: probabilidad
- $p < 0.05$: significativo
- $p > 0.05$: no significativo

5.2 Análisis de resultados

Las propiedades medicinales de *Vitis vinífera* son muy conocidas en el ámbito de la medicina tradicional, debido a ello el presente estudio analizó el efecto antioxidante del extracto acuoso de las semillas de *Vitis vinífera*, empleando el modelo de inducción a daño hepático por CCl₄. Como se observa,

En la tabla 1 en relación a los niveles Malondialdehído en especímenes de *Rattus rattus* var. *Albinus* en el grupo control positivo estos alcanzaron un promedio final de 286.48 ug/g.

Así mismo se observa que la concentración de Malondialdehído en el grupo control negativo alcanzando un valor un promedio de 193.98 ug/g.

La elevación significativa de los valores de concentración Malondialdehído que se evidencia en el control positivo se debe al CCl₄ el cual es un potente agente hepatotóxico, el cual ejerce su efecto toxico al generar el radical libre (CCl₃^{*}) por acción de las oxidasas ligadas al sistema P-450 en el retículo endoplásmico (RE), paralelamente por una reacción de reducción (vía eliminación de cloro), se formaría el CCl₂. El CCl₃^{*} inicia la rápida peroxidación de lípidos de membrana, lo que provoca una reducción de la fluidez de la membrana, la cual es esencial para preservar la función celular (transducción de señal, secreción y endocitosis). (Ver anexo 12)

Se observó que el grupo tratado con el extracto acuoso de semillas de *Vitis vinifera* a dosis de 200 mg/Kg antes de la exposición con CCl₄ alcanza un valor promedio 239.82 ug/g mostrando una reducción significativa en los valores de concentración Malondialdehído, esto supone la capacidad de los captar los radicales libre y evitar el proceso de peroxidación ⁽²⁰⁾

En la tabla 2, se observa en la tabla que la prueba anova para comparar los grupos nos muestra un nivel de significancia de p (0.000) es menor que el alfa (0.05) por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis afirmativa, es decir existe diferencia estadísticamente significativa después del tratamiento con *Vitis vinifera* en los resultados obtenidos entre los tres grupos de experimentación. Por lo que se concluye que después de la administración del extracto acuoso de semillas de *Vitis vinifera* en el grupo inducido, el extracto acuoso de semillas de *Vitis vinifera* si tiene efecto antioxidante.

VI. CONCLUSIONES

- Se evaluó la concentración de Malondialdehído en el grupo control negativo experimental en *Rattus rattus* var. *Albinus* dando como promedio 193.98 ug/g.
- Se evaluó el efecto del CCL₄ sobre la concentración de Malondialdehído en el grupo control positivo alcanzando un promedio de 286.48 ug/g.
- Se evaluó el efecto del extracto acuoso de *Vitis vinífera* después de la administración de CCL₄ sobre la concentración de Malondialdehído en el grupo experimental dando como promedio 239.82 ug/g.
- Se comparó la concentración de Malondialdehído entre los grupos control positivo, control negativo y experimental en el homogenizado de muestras de hígado en especímenes de *Rattus rattus* var. *Albinus* mediante la prueba Anova nos muestra un nivel de significancia de p (0.000) es menor que el alfa (0.05) por lo que se evidencio que el extracto acuoso de semillas de *Vitis vinífera* si tiene efecto antioxidante.

ASPECTOS COMPLEMENTARIOS

Recomendaciones

- Se recomienda realizar pruebas de capacidad antioxidante in vitro extracto de *Vitis vinífera*.
- Se recomienda realizar un macha fitoquímica para identificar el porcentaje de los metabolitos presentes en la planta.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Salaverry, O y Cabrera, J. Florística De Algunas Plantas Medicinales. Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública. Rev cubana Farm [Internet]. 2014, [Citado 2016-06-05], Pp.165-168. Disponible En: [Http://Www.Scielo.Org.Pe/Scielo.Php?Pid=S172646342014000100025&Script=Sci_Arttext](http://Www.Scielo.Org.Pe/Scielo.Php?Pid=S172646342014000100025&Script=Sci_Arttext)
2. Huamantupa, I et al. Riqueza, Uso Y Origen De Plantas Medicinales Expendidas En Los Mercados De La Ciudad Del Cusco. Rev Cubana Farm [Internet]. 2011, [Citado 2016-05-05], Pp. 283-292. Disponible En: [Http://Www.Scielo.Org.Pe/Scielo.Php?Pid=S1727-99332011000300004&Script=Sci_Arttext](http://Www.Scielo.Org.Pe/Scielo.Php?Pid=S1727-99332011000300004&Script=Sci_Arttext)
3. Castañeda, B. C., Llica, E. R., y Vásquez, L. I. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. horizonte médico, (2008). [Internet]. 2011, [Citado 2016-05-11], Disponible En: [Http://Www.Horizontemedicina.Usmp.Edu.Pe/Index.Php/HorizontemEd/Article/View/196/209](http://Www.Horizontemedicina.Usmp.Edu.Pe/Index.Php/HorizontemEd/Article/View/196/209)
4. Ciudad B., Claudio, y Valenzuela B., Jorge. Contenido De Flavonoles En Uvas Para Vino Cultivadas En El Valle De Casablanca, Chile. Agricultura Técnica, 62(1), 79-86. Recuperado En 05 De Junio De 2016, [Internet]. 2002 [Citado 2016 Jun 05]; Disponible En: [Http://Www.Scielo.Cl/Scielo.Php?Script=SciArttext&Pid=S0365-28072002000100008](http://Www.Scielo.Cl/Scielo.Php?Script=SciArttext&Pid=S0365-28072002000100008)

5. García L, Vicente L, Rojo M, Sánchez E. Plantas con propiedades antioxidantes. Rev cubana Invest Bioméd [Internet]. 2001 Sep [Citado 2016 Jun 05]; 20(3): 231-235. Disponible En: [Http://Scielo.Sld.Cu/Scielo.Php?Script=Sci_Arttext&Pid=S0864-03002001000300011&LNG=Es](http://Scielo.Sld.Cu/Scielo.Php?Script=Sci_Arttext&Pid=S0864-03002001000300011&LNG=Es).
6. Oyarzábal A, Molina V, Jiménez S, Curveco D, Mas R. Efectos del policosanol, el extracto de semillas de uva y su terapia combinada sobre marcadores oxidativos en ratas. Rev Cubana Farm [Internet]. 2010 Mar [Citado 2016 Mayo 18]; 44(1): 87-96. Disponible En: [Http://Scielo.Sld.Cu/Scielo.Php?Script=Sci_Arttext&Pid=S0034-75152010000100011&LNG=Es](http://Scielo.Sld.Cu/Scielo.Php?Script=Sci_Arttext&Pid=S0034-75152010000100011&LNG=Es).
7. Sandoval M, Lazarte K, Arnao I. Hepatoprotección antioxidante de la cáscara y semilla de Vitis Vinifera L. (Uva). Rev Cubana Farm [Internet]. 2008 [Citado 2016 Mayo 20] ; Disponible En: [Http://Www.Scielo.Org.Pe/Pdf/Afm/V69n4/A06v69n4.Pdf](http://Www.Scielo.Org.Pe/Pdf/Afm/V69n4/A06v69n4.Pdf)
8. Zamora J D. Antioxidantes: Micronutrientes en lucha por la salud. Rev. Chil. Nutr. [Internet]. 2007 Mar [Citado 2016 Jun 05]; 34(1):17-2 Disponible En: [Http://Dx.Doi.Org/10.4067/S0717-75182007000100002](http://Dx.Doi.Org/10.4067/S0717-75182007000100002).
9. Pérez, C. Plantas Antioxidantes, [Internet] 2015 [Citado 2016 Jun 05]; Disponible en: [Http://Www.Natursan.Net/Plantas-Antioxidantes/](http://Www.Natursan.Net/Plantas-Antioxidantes/)

10. Sandoval, M., Lazarte, K., & Arnao, I. Hepatoprotección Antioxidante De La Cáscara Y Semilla De Vitis Vinifera L. (Uva). Facultad De Medicina, 69(4), 250-259. (2013). [Citado 2016 Jun 05]; Disponible En: [Http://Revistasinvestigacion.Unmsm.Edu.Pe/Index.Php/Anales/Article/View/1125](http://Revistasinvestigacion.Unmsm.Edu.Pe/Index.Php/Anales/Article/View/1125)
11. Rodríguez, Y. Plantas En Dad.Uncu.Edu.Ar. 10 de junio de 2014. [Citado 2016 Jun 05] Disponible En: [Http://Www.Ecured.Cu/Planta](http://Www.Ecured.Cu/Planta)
12. Arne, JL. Temas De Farmacognosia, Plantas Medicinales, (2013). [Citado 2016 Jun 06] Disponible En: [Http://Www.Plantas-Medicinal-Farmacognosia.Com/](http://Www.Plantas-Medicinal-Farmacognosia.Com/)
13. Escobr, J. Propiedadesde.Net, Propiedades De La Uva, [Citado 2016 Jun 06] Disponible En [Http://Propiedadesde.Net/Propiedades-De-La-Uva/](http://Propiedadesde.Net/Propiedades-De-La-Uva/)
14. Vélez M, Uribe L F, Lenz M. Papel Del Resveratrol De Uva Como Antioxidante. Luna Azul [Internet]. 2012 June [Cited 2016 June 07]; (34): 240-256. Disponible en: [Http:// Www.Scielo.Org.Co/SciELO.Php?Script=Sci_Arttext&Pid=S1909-24742012000100014&LNG=En](http://Www.Scielo.Org.Co/SciELO.Php?Script=Sci_Arttext&Pid=S1909-24742012000100014&LNG=En).
15. Mesa A M., Gaviria C A., Cardona F, Actividad Antioxidante Y Contenido De Fenoles Totales De Algunas Especies Del Género Calophyllum. Rev Cubana Plant Med [Internet]. 2010 Jun [Citado 2017 Jul 29]; Disponible En: [Http://SciELO.Sld.Cu/SciELO.Php?Script=Sci_Arttext&Pid=S1028-](http://SciELO.Sld.Cu/SciELO.Php?Script=Sci_Arttext&Pid=S1028-)

16. Doroteo V H, Díaz C, Terry C, Rojas R, Compuestos Fenólicos Y Actividad Antioxidante In Vitro De 6 Plantas Peruanas. Revista De La Sociedad Química Del Perú 20137913-20. Fecha De Consulta: 29 De Julio De 2017. Disponible En: [Http://Www.Redalyc.Org/Articulo.Oa?Id=371937630003](http://Www.Redalyc.Org/Articulo.Oa?Id=371937630003).

17. Vélez, M Marín, L F, Papel Del Resveratrol De Uva Como Antioxidante, Revista Luna Azul de Colombia. Fecha de Consulta: 15 de enero del 2018. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/luaz/n34/n34a14.pdf>

18. Aguilar, T Uso Integral De La Vid En La Elaboración De Jugo De Uva Enriquecido Con Antioxidantes, Universidad de Concepción Dirección de Postgrado Facultad de Ingeniería Agrícola -Programa de Magister en Ingeniería Agrícola con mención en Agroindustrias de Chile. Fecha de consulta: 15 de enero del 2018. Disponible en: http://repositorio.udec.cl/bitstream/handle/11594/1870/Tesis_Uso_integral_de_la_vid_en_la_elaboracion_de_jugo_de_uva.pdf?sequence=1&isAllowed=y

19. Fuentes F, Mendoza R. Instituto Nacional de Salud. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: raton [Internet]. Lima 2008. [Citado 2018 Jul 29] Disponible desde: http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/GUIA_ANIMALES_RATON.pdf

20. Bermúdez D, Escobar R, Boffill M, Betancourt E, Igualada I, Alonso B. Evaluación del potencial hepatoprotector de la *Mentha piperita* L previo a la inducción 40 de hepatotoxicidad con acetaminofen Cuba 2014 [Tesis] [citado 08 agosto del 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/856/85632545005.pdf>

21. Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. Código de Ética para La Investigación. Versión 001. Aprobado por acuerdo del Consejo Universitario con Resolución N° 0108-2016-CU-Uladech Católica, de fecha 25 de enero de 2016. [Citado 29 de noviembre del 2018]. Disponible en: <https://www.uladech.edu.pe/images/stories/universidad/documentos/2016/codigo-de-etica-para-la-investigacion-v001.pdf>

ANEXOS



Anexo 01: *Vitis vinífera*

	Por 100 g de porción comestible	Por ración (140 g)	Recomendaciones día-hombres	Recomendaciones día-mujeres
Energía (Kcal)	69	99	3.000	2.300
Proteínas (g)	0,6	0,9	54	41
Lípidos totales (g)	Tr	Tr	100-117	77-89
AG saturados (g)	—	—	23-27	18-20
AG monoinsaturados (g)	—	—	67	51
AG poliinsaturados (g)	—	—	17	13
ω -3 (g) *	—	—	3,3-6,6	2,6-5,1
C18:2 Linoleico (ω -6) (g)	—	—	10	8
Colesterol (mg/1000 kcal)	0	0	<300	<230
Hidratos de carbono (g)	16,1	23,2	375-413	288-316
Fibra (g)	0,9	1,3	>35	>25
Agua (g)	82,4	119	2.500	2.000
Calcio (mg)	17	24,5	1.000	1.000
Hierro (mg)	0,4	0,6	10	18
Yodo (μg)	2	2,9	140	110
Magnesio (mg)	10	14,4	350	330
Zinc (mg)	0,1	0,1	15	15
Sodio (mg)	2	2,9	<2.000	<2.000
Potasio (mg)	250	360	3.500	3.500
Fósforo (mg)	22	31,7	700	700
Selenio (μg)	1	1,4	70	55
Tiamina (mg)	0,04	0,06	1,2	0,9
Riboflavina (mg)	0,02	0,03	1,8	1,4
Equivalentes niacina (mg)	0,3	0,4	20	15
Vitamina B₅ (mg)	0,1	0,14	1,8	1,6
Folatos (μg)	6	8,6	400	400
Vitamina B₁₂ (μg)	0	0	2	2
Vitamina C (mg)	4	5,8	60	60
Vitamina A: Eq. Retinol (μg)	3	4,3	1.000	800
Vitamina D (μg)	0	0	15	15
Vitamina E (mg)	Tr	Tr	12	12

Anexo 02: Composición nutricional de *Vitis vinífera*.



Anexo 03: Recolección de *Vitis vinífera*.



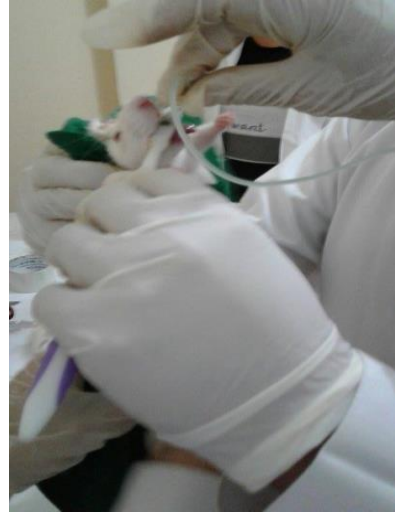
ANEXO 04: Grupos de investigación



ANEXO 05: Molienda de *Vitis vinifera*



ANEXO 06: Pesado de muestras biológicas para dosificar extracto



ANEXO 07: Administración del extracto por sonda orogástrica



**ANEXO 08: Pesado del material biológico
(PRUEBA CON CCL4)**



ANEXO 09: Preparación de CCL₄ con aceite de oliva

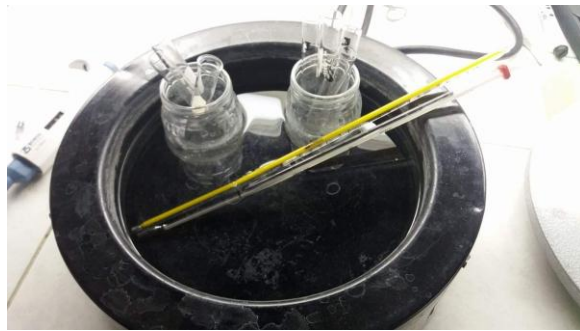
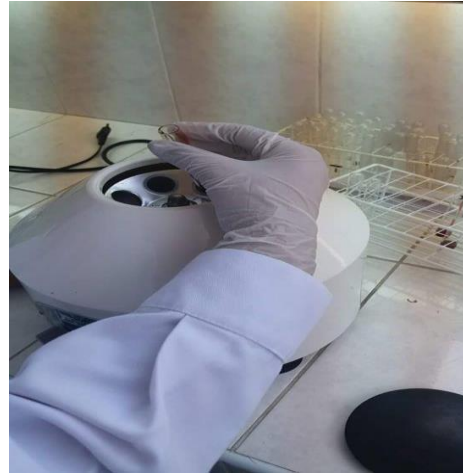


ANEXO 10: Aplicación del CCL₄

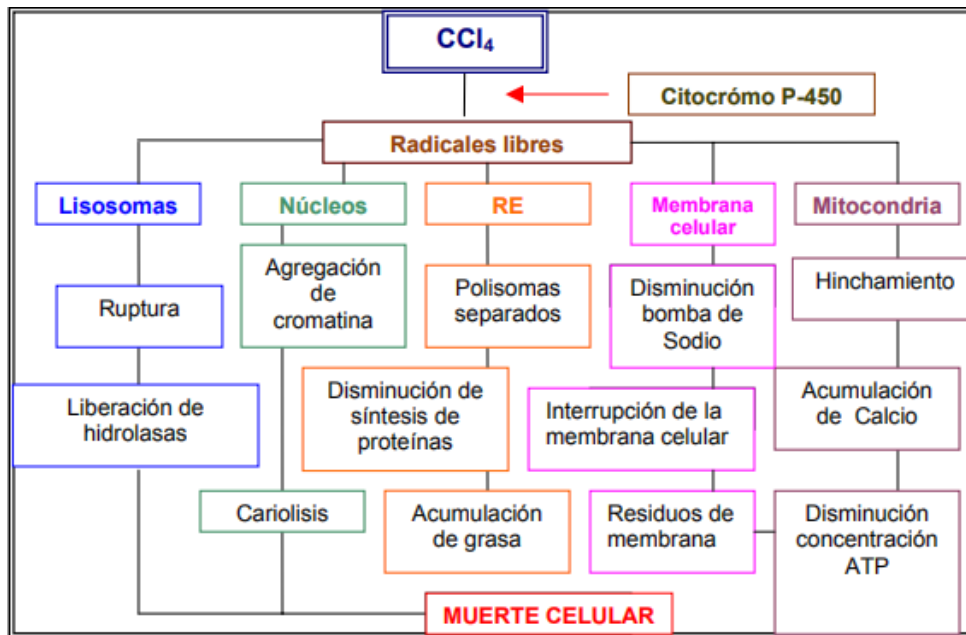


ANEXO 11: Homogenizado de hígado





ANEXO 12: Test de TBARS



ANEXO 12: Esquema del mecanismo de acción del daño hepático inducido por tetracloruro de carbono