



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

“EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *RUBUS ROBUSTUS* C. PRESL.
(ZARZAMORA)”

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO**

AUTOR

BACH. NORMALINDA CORREA YAJAHUANCA

ASESOR

Mg. JORGE ANTONIO CHAVEZ PEREZ

LIMA - PERÚ

2019

Dedicatoria

A Dios y a mis padres, por estar a cada paso conmigo, por ser mis mentores de la vida, por ilustrarme a ser una buena persona y no claudicar ante los obstáculos, por apoyarme y guiarme, por ser los pilares de mi fortaleza y quienes me ayudaron a llegar hasta este punto.

Dedico a mi familia, a mi hijo Liam y a mi esposo Nolbert, quienes han sido los motores fundamentales para realizar este trabajo, ellos son quienes me dieron grandes enseñanzas y los principales protagonistas de este “sueño alcanzado”.

Agradecimiento

Agradezco a Dios, quien con su bendición nos ilumina la vida, por guiarme y regalarme una familia hermosa, por ser mi fortaleza en aquellos momentos de difícil

Al Instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Agradezco a los docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Interamericana Para el Desarrollo, por compartir sus conocimientos durante estos 5 años académicos, y a todas las personas quienes me apoyaron con este trabajo.

Gracias a mis padres: Guillermo y Adelaida, por confiar y creer en mis expectativas, por los consejos, por creer en mí, por inculcarme valores y los mejores principios.

Índice General

Dedicatoria	2
Agradecimiento	3
Índice De Tablas	7
Índice De Figuras	8
Resumen	9
Abstract	10
Introducción	11
CAPÍTULO I	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
1.1.1.2	
1.2 Formulación del Problema	13
1.2.1 Problema General	13
1.2.2 Problemas Específicos	13
1.3 Objetivos de la investigación	13
1.3.1 Objetivo General	13
1.3.2 Objetivos Específicos	13
1.4 Justificación de la Investigación	14
CAPITULO II	15
FUNDAMENTOS TEÓRICOS	15
2.1 Antecedentes de la Investigación	15
2.1.1 Antecedentes Nacionales	15
2.1.2 Antecedentes Internacionales	15
2.2 Bases Teóricas	16
2.2.1 Clasificación taxonómica	18
2.3 Marco Conceptual	19
2.4 Hipótesis	19
2.4.1 Hipótesis General	19
2.4.2 Hipótesis Específicas	19
2.5 Operacionalizacion de variables e indicadores	20
CAPITULO III	21
METODOLOGÍA	21
3.1 Tipo de Investigación	21

3.2 Descripción del Método y Diseño	21
3.2.1 Experimental	21
3.2.2 Aplicada	21
3.2.3 Prospectivo	21
3.2.4 Longitudinal	21
3.3. Población y muestra	21
3.3.1. Población	21
3.3.2. Muestra	21
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	22
3.4.1 Ensayo de Actividad Citotóxica por el método de lechuga.	25
3.4.2 Ensayo de Actividad antioxidante por el Método DPPH:	25
3.4.3 Técnicas para la evaluación del efecto antioxidante	28
3.4.4 Técnicas para la evaluación de la actividad Citotóxica	28
3.5 Técnicas de procesamiento y análisis de datos	29
CAPITULO IV	32
PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	32
4.1 Presentación de Resultados	32
4.1.1 Prueba de solubilidad	32
4.1.2 Marcha Fitoquímica	33
4.1.3 Ensayo del efecto antioxidante del extracto etanólico de <i>Rubus robustus</i> C. presl “Zarzamora”	35
4.1.3 Ensayo de la actividad citotóxica del extracto etanólico de <i>Rubus robustus</i> C. presl “Zarzamora”	37
4.2 Prueba de Hipótesis	39
4.2.1 Hipótesis General	39
4.2.1 Hipótesis Específica	42
4.3 Discusión de Resultados	45
CAPITULO V	48
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
5.1 Conclusiones	48

5.2 Recomendaciones	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
Anexos	52
Anexo A: <i>Matriz de consistencia</i>	52
Tipo de Investigación	52
Anexo B: Instrumento	53
Anexo C: Consolidado	56
Anexo D: Cronograma Del Programa Experimental	58
Anexo E: Testimonios Fotográficos	59
Anexo F: Juicio De Expertos	66

Índice De Tablas

Tabla 1:Operacionalización de las Variables	20
Tabla 2:Marcha Fitoquímica.	27
Tabla 3:Solventes para pruebas de solubilidad.	27
Tabla 4:Resultados de prueba de solubilidad	32
Tabla 5:Resultados de Marcha Fitoquímica	33
Tabla 6:Porcentaje de efecto antioxidante de Rubus robustus C presl. Frente Al reactivo 2, 2 difenil-1-picrilhidracilo DPPH	35
Tabla 7:Medias para la determinación del efecto antioxidante de Rubus robustus C presl.	35
Tabla 8:Análisis de Varianza para la determinación del efecto antioxidante	36
Tabla 9:Prueba de Tukey para la determinación la actividad Antioxidante	36
Tabla 10:Determinación del IC50 para actividad antioxidante del extracto de hojas de Rubus robustus C. presl. “Zarzamora”	37
Tabla 11:Comparación de Medias entre grupos para la actividad Citotóxica	37
Tabla 12:Análisis de varianza para la determinación de la actividad citotóxica	38
Tabla 13:Prueba de Tukey para la determinación la actividad Citotóxica	38
Tabla 14:Coeficiente de correlación de Pearson para demostrar el efecto antioxidante para demostrar la Hipótesis general.	39
Tabla 15:Coeficiente de correlación de Pearson para demostrar el efecto antioxidante para demostrar que existe correlación lineal entre los valores de concentración y efecto antioxidante.	40
Tabla 16:Resumen de modelo y estimaciones de parámetro para la demostración del efecto antioxidante	40
Tabla 17:Coeficiente de correlación de Pearson para demostrar la actividad citotóxica.	41
Tabla 18:Resumen de modelo y estimaciones de residuo para la demostración de la actividad citotóxica	41
Tabla 19:Porcentaje de efecto citotóxico	43

Índice De Figuras

- Figura 1: Prueba de solubilidad del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. presl
- Figura 2: Marcha fitoquímica del extracto de hojas de *Rubus robustus* C. presl “zarzamora” dentro de las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Agraria
- Figura 3: porcentaje de efecto antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Rubus robustus* C. presl. Fuente: autor. Elaboración propia.
- Figura 4: porcentaje de efecto citotóxico del extracto etanólico de las hojas de *Rubus robustus* C. presl en radícula de semillas de lechuga. Fuente: autor. Elaboración propia 44
- Figura 5: porcentaje de efecto citotóxico del extracto etanólico de las hojas de *Rubus robustus* C. presl en hipocótilo de semillas de lechuga. Fuente: autor. Elaboración propia 44
- Figura 6: Lugar de recolección de *Rubus robustus* C. presl Distrito Usquil,, provincia de Otuzco
- Figura 7: *Rubus robustus* C. presl Distrito Usquil, provincia de Otuzco departamento la Libertad, ubicado
- Figura 8: Selección de hojas de *Rubus robustus* C. presl. Fuente: autor. Imagen propia.
- Figura 9: Peso de *Rubus robustus* C. presl. Fuente: autor. Imagen propia.
- Figura 10: Identificación de flavonoides en el extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. presl. Fuente: autor.
- Figura 11: Identificación de aminoácidos en el extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. presl. Fuente: autor.
- Figura 12: Identificación de cardenólidos en el extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. presl.
- Figura 13: Identificación de alcaloides en el extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. presl. Fuente: autor.
- Figura 14: Identificación de alcaloides en el extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. presl. Fuente: autor.
- Figura 15: extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. presl. Fuente: autor. Imagen propia.
- Figura 16: Dilución del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. presl. Fuente: autor. 64
- Figura 17: Efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. presl. Fuente: autor.

Resumen

Este trabajo se centró en caracterizar los componentes químicos, evaluar el lambda máximo, determinar la solubilidad del extracto seco de *Rubus robustus C presl* frente a solventes diversos, analizar la actividad antioxidante por el método DPPH, evaluar el efecto citotóxico del extracto etanólico en semillas de lechuga en germinación. La determinación de los diferentes grupos químicos, se realizó en diferentes fracciones: Fracción A (Etanólico), Fracción B (Insoluble), Fracción C (Clorofórmica), y Fracción D, mediante estas se evidencia mayor presencia de flavonoides. Se realizó un barrido espectral ultravioleta visible en el cual se presentan 2 bandas de máxima absorción demostrando de esta manera la presencia de flavonoides. Para determinar el efecto antioxidante se usó el método 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH). Esta medición se realizó a 517 nm de longitud de onda, y la actividad antioxidante se determinó mediante la diferencia de absorbancias. Mediante estas se determina el coeficiente de determinación de 0,9987, lo que demuestra la linealidad de acuerdo a su concentración y actividad antioxidante. También se determinó el efecto tóxico frente a semillas de lechuga. El método consistió en evaluar el porcentaje de inhibición en la germinación y elongación de la radícula y del hipocótilo de las semillas, se puede evidenciar notablemente la inhibición en el crecimiento de las radículas, llegando hasta inhibir 93,6% del crecimiento en el grupo al que se administró mayor concentración del extracto.

PALABRAS CLAVE: *Rubus robustus C Presl, DPPH, flavonoides, germinación, elongación, radícula, hipocótilo.*

Abstract

This work focused on characterizing the chemical components, evaluating the maximum lambda, determining the solubility of the dry extract of *Rubus robustus* C presl against various solvents, analyzing the antioxidant activity by the DPPH method, evaluating the cytotoxic effect of the ethanolic extract on seeds of germinating lettuce. The determination of the different chemical groups was carried out in different fractions: Fraction A (Ethanolic), Fraction B (Insoluble), Fraction C (Chloroform), and Fraction D, through these evidence increased presence of flavonoids. A visible ultraviolet spectral scan was performed in which 2 bands of maximum absorption are presented demonstrating the presence of flavonoids. To determine the antioxidant effect, use the 2,2-diphenyl-1-picril hydrazyl (DPPH) method. This measurement was performed at 517 nm wavelength, and the antioxidant activity was determined by the difference in absorbances. When determining the coefficient of determination of 0.9987, which demonstrates the linearity of the agreement according to its concentration and antioxidant activity. The toxic effect against lettuce seeds was also determined. The method consists in evaluating the percentage of inhibition in the germination and elongation of the radicle and the hypocotyl of the seeds, the inhibition in the growth of the radicles can be remarkably evidenced, reaching up to inhibit 93.6% of the growth in the group at that higher concentration of the extract was administered.

KEY WORDS: *Rubus robustus* C Presl, DPPH, flavonoids, germination, elongation, radicle, hypocotyl.

Introducción

La zarzamora es un arbusto que forma tallos de hasta 4m que acaban arrastrándose por el suelo. Las flores, rosadas o blancas, forman unas bayas que en realidad son la agrupación de muchos pequeños frutos negros. Son angulosos y con fuertes espinas. Las hojas son caducas y alternas, y están compuestas por 3-7 foliolos ovalados o elípticos que presentan el borde dentado.

En el Perú la zarzamora constituye una de las plantas más numerosas por sus variedades e híbridos que presenta. Dentro de su composición posee vitaminas A, B1, B2, C, también, *minerales como* potasio, fósforo, hierro, sodio, magnesio, manganeso, selenio, zinc, cobre y calcio, además de otros componentes que resultan muy importantes para nuestra salud, *como ácido fólico*, niacina, y otros componentes químicos con actividad antioxidante.

Las propiedades de las hojas y fruto de esta planta son de gran importancia, por sus metabolitos secundarios, que son capaces de contrarrestar numerosas enfermedades dentro de nuestra sociedad, la cual es muy vulnerable por el estilo de vida y sedentarismo que lleva. Tanto fruto como hojas pueden ayudar a combatir diarreas, gastroenteritis, cólicos y hasta enfermedades inmunodepresoras a través de la disminución de radicales libres.

Esta planta también puede ser tóxica frente a determinadas especies, por lo cual también una dosis excesiva del extracto de esta planta puede interferir en el desarrollo normal de las actividades celulares de nuestro organismo.

Durante el desarrollo de la investigación se planificó comprobar el efecto antioxidante y citotóxico del extracto etanólico de las hojas de *Rubus robustus* C. presl, mediante el método DPPH para efecto antioxidante y método de la lechuga para efecto citotóxico.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la Realidad Problemática

En el mundo, según estudios realizados en la organización mundial de la salud (OMS) 1.4 millones de personas tienden a sufrir enfermedades cardiovasculares, demencia, cáncer y diabetes tipo 2 debido a sus hábitos alimenticios sedentarios. REUTERS, (2018).

En el Perú, la vida sedentaria, la ingesta de comida bajos en nutrientes y con abundante grasa y carbohidratos, ha generado diversos y graves problemas en la salud en general. Así las estadísticas nos muestran una elevada prevalencia de sobrepeso y obesidad. Así en nuestro país durante el año 2016 el sobrepeso en mujeres fue de 18% y 19% en varones. Villena, (2017). Todos estos y con abundantes oxidantes, a ello sumarle el estrés oxidativo. Navarrete, (2017).

Resulta muy importante cambiar la rutina alimentaria e incluir en su mayoría nutrientes con propiedades antioxidantes, también nos conlleva a realizar búsquedas mediante investigaciones de compuestos que ayuden a contrarrestar el efecto oxidante de estos malos nutrientes. También es un reto para el Químico Farmacéutico el realizar investigaciones que nos permita identificar alimentos con excelente nivel de nutrientes ricos en grupos químicos capaces de contrarrestar los oxidantes y a la vez incrementar la capacidad de respuesta de nuestro sistema inmunológico. Pérez (2003).

Numerosos son los vegetales que se utilizan en medicina y constituyen fuentes importantes de biosíntesis de medicamentos. Los grupos Químicos hacen referencia a compuestos que van desde lo simple a lo más complejo. Entre estos podemos mencionar a los antioxidantes, como los Flavonoides, aminoácidos, vitaminas, fenoles, terpenos como los más comunes. Peñarrieta (2014).

Garro, (2015.) en Colombia nos menciona que la producción de radicales libres debido al estrés oxidativo, degradación por un proceso de oxidación a lípidos, proteínas, DNA y enzimas que dañan al tejido celular.

En el interior de nuestro país, especialmente en la sierra de la región La Libertad, se cree que la mora tiene muchas propiedades curativas, y los habitantes de la zona lo utilizan para curar diversos tipos de enfermedades, como tratamiento antigripal, antiséptico en la curación de heridas superficiales, e incluso para el alivio del estrés. En este trabajo de investigación nos enfocamos en identificar los diversos posibles grupos químicos con propiedades antioxidantes.

1.2 Formulación del Problema

1.2.1 Problema General

¿Tendrá actividad antioxidante y citotóxica el extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. presl (Zarzamora)?

1.2.2 Problemas Específicos

¿Cuál es la concentración del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. Presl. (Zarzamora) con mayor efecto antioxidante?

¿Qué concentración del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. Presl (Zarzamora) presentará mayor actividad citotóxica?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antioxidante y citotóxica del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. presl. (Zarzamora).

1.3.2 Objetivos Específicos

Determinar la concentración del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. Presl. (Zarzamora) que presenta mayor efecto antioxidante.

Evaluar la concentración del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. Presl. (Zarzamora) que presenta mayor efecto citotóxico.

1.4 Justificación de la Investigación

Dada la necesidad de producción de fitofármacos y productos alimenticios seguros y eficaces y de acceso a la población, por el potencial uso de las múltiples propiedades medicinales de *Rubus robustus* C. Presl. (Zarzamora), es de interés científico realizar ensayos preliminares para identificar los principales componentes de las hojas de zarzamora con propiedades antioxidantes utilizando parte de la planta no comestible que son fuentes importantes de compuestos asociados a la capacidad antioxidante.

Puesto que la actividad de los compuestos fenólicos resulta importante por su capacidad para inhibir lipoperoxidasas y remover radicales libres, capaces de reducir el ión férrico a ferroso, y capaces de inhibir la actividad catalítica del hierro, como también inhibir las micelas del ácido linoleico.

Resulta interesante conocer también la actividad citotóxica de esta planta en estudio, pues podría ser aplicado al control de agentes infecciosos como son los parásitos, hongos, bacterias y virus. Por todo lo expuesto sobre *Rubus robustus* C. Presl. una de las posibles nuevas fitoterapias para disminuir los niveles de estrés oxidativo en nuestro organismo, tal es el caso que pretende nuestro estudio determinar su actividad antioxidante y citotóxica.

CAPITULO II

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Antecedentes de la Investigación

2.1.1 Antecedentes Nacionales

Gerónimo (2019) realiza una investigación en el Perú sobre los compuestos fenólicos como antioxidantes, en frutos de *Rubus floribundus Kunth*, a través de un extracto etanólico al 80% durante 7 días de maceración. Encontrando que en el estadio maduro existen 99,76 mg de polifenoles con propiedades antioxidantes por cada 100g de muestra analizada, en el estadio intermedio 84,57 mg por cada 100 g de muestra y en un estado inmaduro similar al intermedio con un resultado de 83,01 mg por cada 100 g de muestra analizada.

Rojas (2012) en Huancayo, en un estudio realizado al extracto metanólico de zarzamora evaluó la cantidad de polifenoles existentes. En sus resultados nos muestra que en el estadio maduro del fruto por cada 100 gramos de muestra existe 252,952 mg de GAE/100 g, valor mayor al encontrado en la pulpa fisiológicamente madura, cuyo valor fue de 173,905 mg GAE/100 g.

Cruzado (2019) en Jaén estudió las múltiples propiedades antioxidantes de la zarzamora (*Rubus fruticosus*) y el contenido de polifenoles totales versus el grado de madurez del fruto a tres temperaturas de extracción; encontrando que el contenido de polifenoles totales en la cáscara es mayor a 80°C. El análisis por DPPH mostró porcentaje de inhibición de 95%, 97% y 98% a 80°C es más eficiente con 98, 80°C y en los 3 niveles de maduración. Concluyendo que a mayor temperatura mayor extracción de compuestos fenólicos, y que el grado de madurez es determinante en la capacidad antioxidante.

2.1.2 Antecedentes Internacionales

Oszmiannki (2015) en Polonia refiere que se recolectaron 26 muestras diferentes de hojas de mora silvestre de varias localidades del sudeste de Polonia. Las muestras de hojas se evaluaron con respecto a sus perfiles y contenidos de compuestos fenólicos por LC / MS QTOF, y su actividad antioxidante por ABTS y FRAP. Se detectaron 33 compuestos fenólicos (15 flavonoles, 13 ácidos hidroxicinámicos, tres derivados de

ácido elálgico y dos flavonas). Los derivados del ácido elálgico fueron los compuestos predominantes en las hojas analizadas, especialmente la sanguina H-6, elagitaninos, lambertianina C y casuarinina. El estudio mostró que las hojas de mora silvestre pueden considerarse una buena fuente de compuestos antioxidantes. Existe un claro potencial para la utilización de las hojas de mora como aditivo alimentario, fuente medicinal o té de hierbas.

Rojas (2004) en un trabajo realizado en Reino Unido realizó una búsqueda de información acerca del uso tradicional de la zarzamora con fines terapéuticos. Este artículo destacó los fines terapéuticos encontrando, que la mayor información documentada respecto a este grupo de frutos corresponde a la frambuesa, cuyas hojas han sido reportadas como relajante uterino y estimulante del parto.

Cruz (2011) en México reportó un alto contenido de antocianinas, fenoles y flavonoides en el fruto seco de *Rubus adenotrichus* relacionándolos con la capacidad antioxidante (DPPH). El elevado contenido de antocianinas y el valor de CE50 permiten recomendar su uso como antioxidante. Demuestra que la actividad física de alta intensidad puede provocar daño muscular y en consecuencia, afectar el rendimiento de los atletas, por lo que el uso de alimentos con alto contenido de antioxidantes, como la mora puede estimular los procesos de recuperación muscular en los atletas de alta competencia.

2.2 Bases Teóricas

Las plantas sintetizan gran cantidad de grupos químicos, algunos pueden ser utilizados en la salud como antioxidante, los cuales evitan el desarrollo de numerosas enfermedades, entre estos, los polifenoles desempeñan funciones de protección contra la radiación ultravioleta y posee un mecanismo de defensa frente a los radicales libres Pérez (2012). De estas propiedades nace un interés en conocer los grupos químicos con capacidad antioxidante. García (2017).

Muchas enfermedades son el resultado de la evolución de alteraciones celulares, debido a la excesiva producción de radicales libres. Este estado se le denomina estrés celular y se caracteriza por presentar un desequilibrio entre la generación y eliminación

de especies reactivas, ocasionada por la disminución de los niveles de las defensas antioxidantes celulares, del aumento de la velocidad de producción de las especies reactivas, como también por la sumatoria de estas dos. Gil (2009).

Entre las especies reactivas del oxígeno destaca los radicales libres como el ion superóxido (O_2^-), radical hidroxilo ($\cdot OH$), alcoxilo ($ROO\cdot$) y óxido de nitrógeno. Un segundo grupo de ROS lo constituyen los no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peroxinitrito ($ONOO^-$). Estos compuestos por si no son reactivos, pero en presencia de metales de transición como el Fe o Cu u otros ROS generan RL (radicales libres). Gil (2009).

La toxicidad de cada radical viene determinada, desde el punto de vista químico, por cuatro características básicas, como son reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. Los tres componentes con mayor capacidad de difusión son: $O_2^- < H_2O_2 < OH$. Capaces de reaccionar con moléculas que se encuentran alejadas del lugar de origen incluso con capacidad de atravesar membranas celulares. Gutiérrez (2002).

La contribución de los antioxidantes presentes en los alimentos juega un papel muy importante en la defensa frente al estrés oxidativo, implicado en distintos procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Sin embargo, durante el procesado de los alimentos y con la finalidad de mejorar sus características sensoriales en función de las demandas de los consumidores, se puede inducir cambios que afecten a la capacidad antioxidante de los mismos y por lo tanto a su potencial efecto beneficioso para la salud.

La zarzamora de acuerdo a su clasificación está dentro del género *Rubus*, este género comprende más de 700 especies, se encuentran distribuidas en todo el mundo. Campell (1999). A los frutos de estas especies se le ha dado un valor comercial, incluso en muchas regiones de Sudamérica por las espinas que posee muchas especies se utilizan para delimitar linderos de un terreno a otro (cercos vivos).

2.2.1 Clasificación taxonómica

La muestra fue identificada en el museo de Historia Natural de la Universidad Nacional de San Marcos, constancia N° 187-USM-2019 según el sistema de clasificación de Cronquist (1988). *Rubus robustus* C. Presl (Zarzamora). Según su posición Taxonómica

Taxonomia de Rubus robustus c. presl

DIVISION: <i>Magnoliophyta</i>
CLASE: <i>Magnoliopsida</i>
SUBCLASE: <i>Rosidae</i> ;
ORDEN: <i>Rosales</i> ;
FAMILIA: <i>Rosaceas</i> ;
GENERO: <i>Rubus</i> ;
ESPECIE: <i>Rubus Robustus C. Presl.</i>
NOMBRE VULGAR: "Zarzamora"

Existen diferencias morfológicas entre subgéneros; el criterio más utilizado para su clasificación es el método de separación del fruto maduro. Ibáñez (2011).

En la actualidad urge la necesidad de encontrar otras especies con elevados contenidos de grupos químicos como las antocianinas, flavonoides y compuestos fenólicos. Estos grupos químicos resultan importantes para la disminución del estrés oxidativo y otras enfermedades degenerativas de nuestro sistema inmunológico. Zuloeta (2017).

La zarzamora además de los compuestos fenólicos, flavonoides y azúcares con propiedades reductoras, también posee otros componentes como las vitaminas A, C y E, hierro, potasio y también calcio. Lo más abundante de esta planta son pigmentos naturales que le confieren olor, sabor y efecto antioxidante. Maldonado (2010). Además, posee otros compuestos con actividad antimicrobiana. Hersh (2014).

2.3 Marco Conceptual

Compuestos Fenólicos: Grupos químicos que contiene al menos un anillo aromático dentro de su estructura.

Antioxidante: Compuesto químico que el cuerpo humano utiliza para eliminar radicales libres.

Citotoxicidad: Susceptibilidad de las células frente a compuestos tóxicos.

DPPH: Reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.

Fitofármacos: Formas farmacéuticas extraídas de los vegetales.

Vitaminas: Sustancia orgánica que se encuentra en los alimentos y que, en cantidades pequeñas, es esencial para el desarrollo del metabolismo de los seres vivos.

Antocianinas: son pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos

Flavonoides: son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos.

Pigmento: Sustancia colorante que se encuentra en las células de los seres vivos.

Sistema Inmunológico: es la defensa natural del cuerpo contra las infecciones.

Estrés oxidativo: es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de decodificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante.

2.4 Hipótesis

2.4.1 Hipótesis General

El extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus C. presl.* (Zarzamora) tiene efecto antioxidante y citotóxico.

2.4.2 Hipótesis Específicas

La concentración del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus C. Presl.* (Zarzamora) que presenta mayor efecto antioxidante es 10g/100mL.

La concentración del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus C. Presl.* (Zarzamora) que presenta mayor actividad citotóxica es de 100 mg/mL.

2.5 Operacionalización de variables e indicadores

Tabla 1: Operacionalización de las Variables

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICION OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADORES
Extracto etanólico de hojas de <i>Rubus robustus C. Presl</i>	Metabolitos secundarios	1.25 g/100 mL	Flavonoides (+++)
		2.5g/100 mL	Taninos (+++)
		5,0g/100 mL	Triterpenos (++)
		10,0 g/ mL	Alcaloides (+)
		metabolitos	Esteroides (+)
VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICION OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADORES
Actividad antioxidante	La actividad es una prueba para determinar la capacidad de inhibición de las especies reactivas del oxígeno (radicales libres).	Capacidad antioxidante (antiradicalaria). DPPH	Capacidad Inhibitoria (Absorbancias)
Capacidad Citotóxica	Efecto en la variación del crecimiento de radículas e hipocótilos de semillas vegetales.	Semillas vegetales	Concentración en g/100 mL que demuestre la inhibición en el crecimiento de hipocótilo y radículas en las semillas de lechuga

descripción de las variables del problema de investigación, desde lo más complejo o general hacia lo más específico. Fuente: Elaboración propia.

CAPITULO III

METODOLOGÍA

3.1 Tipo de Investigación

Esta investigación es prospectivo, experimental y longitudinal de tipo aplicada.

3.2 Descripción del Método y Diseño

3.2.1 Experimental

Se trabaja con grupos control y se manipula la variable independiente

3.2.2 Aplicada

Se orienta a resolver los problemas de la vida cotidiana y controlar situaciones prácticas

3.2.3 Prospectivo

Los datos se recogen a medida que se va trabajando

3.2.4 Longitudinal

Se realizan diversas mediciones repetidas

3.3. Población y muestra

3.3.1. Población

Las hojas de *Rubus robustus C. Presl.* (Zarzamora) se recolectó a las 8 am en el distrito de Usquil, provincia Otuzco, región La Libertad a 3500 msnm. Se recolectó aproximadamente 5 Kg y las muestras fueron trasladadas a la ciudad de Lima a los laboratorios de la Universidad Interamericana para el Desarrollo (UNID) y con el asesoramiento de especialistas investigadores del Instituto de Bioquímica de la Universidad Agraria La Molina. La hoja se limpió con agua purificada y alcohol al 70%, se secó a temperatura ambiente, después para completar el secado se realizó en una estufa de convección a 40°C, con la finalidad de evitar la alteración de los diferentes grupos químicos de importancia para el estudio. Posteriormente se trituro hasta obtener un polvo fino.

3.3.2. Muestra

50g de extracto etanólico de las hojas de *Rubus robustus C. prel* (Zarzamora)

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se utiliza una ficha de llenado de datos y se anota lo observado

Instrumentos Utilizados:

- Espectrofotómetro de absorción UV- VIS para medir las absorbancias del efecto antioxidante.
- Tabla milimetrada para medir el crecimiento de la radícula e Hipocótilo de las semillas de lechuga en el efecto citotóxico.
- Instrumento de recolección de datos para prueba de solubilidad
- Instrumento de Marcha fitoquímica, considerados estudios preliminares de reconocimiento
- Tabla de consolidado de datos obtenidos para el efecto antioxidante y citotóxico del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. presl (Zarzamora).

Estudios Preliminares

- Marcha Fitoquímica: Identifica metabolitos secundarios contenidos en el extracto etanólico de *Rubus robustus* C. presl (Zarzamora).
- Espectrofotometría UV-VIS: para pruebas de identificación de compuestos químicos presentes en el extracto
- Solubilidad: para medir grados de compatibilidad y distribución dentro de un solvente determinado

Obtención y Preparación de la muestra

Pesar 10 g de polvo de hojas secas, se transfiere a un frasco estéril ámbar con capacidad para 250 mL, se agregó 100 mL de etanol (alcohol de 96°), se agitó por rotación suave de forma manual, se selló herméticamente y agitó de forma intermitente durante el proceso de extracción. Se almacenó a temperatura ambiente, en un lugar fresco y protegido de la luz durante 7 días. Pasado este tiempo se filtró por papel filtro Whatman. Y para obtener el extracto seco se lleva a estufa a 40°C para la utilización de estudios preliminares.

Marcha fitoquímica

Se realizó extracciones sucesivas con diferentes solventes y cada fracción (05) se evaluó para el reconocimiento cualitativo de los principales grupos de compuestos.

Obtención de la Fracción A

Se transfiere 4,0 mL del extracto filtrado a un envase de capacidad adecuada, diluir con agua purificada si el extracto presenta oscurecimiento y filtrar. Identificar los grupos químicos de acuerdo a los ensayos siguientes: taninos (Reacción de gelatina y Cloruro férrico), determinación de aminoácidos (Reacción con Ninhidrina), determinación de flavonoides (Reacción de Shinoda).

Obtención de la Solución Ácida y Fracción Insoluble:

Transferir 46 mL del extracto filtrado, secar a 40°C, hasta sequedad, agregar 15 mL de ácido clorhídrico al 1%, colocar en una estufa a 50°C durante 1.5 horas, filtrar por papel Whatman. Agregar 15 mL nuevamente de ácido clorhídrico al 1%, colocar a la estufa y filtrar por papel whatman.

Fracción ácida: Líquido filtrado

Fracción Insoluble: Residuo en el papel

Tratamiento de la Fracción insoluble

Lavar el papel filtro Whatman con abundante agua purificada, secar a 45°C durante 48 horas, retirar y almacenar en un desecador si es necesario. Colocar el papel dentro de un vaso de precipitación, agregar 10 mL de cloroformo, agitar constantemente con una varilla de vidrio, calentar en una plancha sin evaporar, pasar por papel filtro Whatman y secar con sulfato de sodio anhidro. A esta última solución se denomina fracción B. En esta fracción identificar lo siguiente: esteroides y quinonas.

Tratamiento de la Fracción ácida

Medir el pH de la solución ácida, y anotar el resultado. Llevar a pH 9,0 con hidróxido de amonio. Transferir toda la solución a una pera de decantación, añadir 25 mL de cloroformo

y agitar, se forman dos fases (fase clorofórmica es la fase inferior y la superior, la fase alcalina). Transferir la fase clorofórmica a un matraz.

Agregar 25 mL de triclorometano a la fase alcalina, y decantar la fase orgánica al mismo matraz que contiene la fase clorofórmica. Rotular adecuadamente como Fase clorofórmica.

Transferir la fase acuosa a otro matraz y rotular como fase acuosa.

Tratamiento de la Fase Clorofórmica

Transferir la fase clorofórmica a un embudo de separación, agregar 15 mL de agua destilada, agitar y dejar reposar unos minutos. Transferir la fase acuosa al matraz con rótulo fase acuosa, realizar una segunda extracción.

A la fase clorofórmica se le agrega sulfato de sodio anhidro con el fin de eliminar residuos de agua. Filtrar. Esta solución corresponde a la fracción C, en la cual se realizan las reacciones de Kedde (Cardenólidos) y Liebermann Burchard (esteroides).

Tratamiento de la Fase Acuosa

Agregar 100 mg de sulfato de sodio anhidro por cada mL de solución acuosa, pasar por papel filtro whatman. Transferir el filtrado a una pera de decantación de 250 mL de capacidad, realizar 2 extracciones con una mezcla de Cloroformo/Etanol en proporción de 3 a 2 respectivamente. Transferir la fase clorofórmica a un matraz (**Matraz C**) y la acuosa a otro matraz y rotular adecuadamente. La fase acuosa es la **Fracción E**, en la que se realiza la reacción de Shinoda (flavonoides) y la reacción de Rosenheing (Leucoantocianidinas)

Fase Clorofórmica:

Transferir la fase clorofórmica del **matraz C** (obtenido en la separación de la fase acuosa), a un embudo de separación, Lavar con 10 mL de solución de sulfato de sodio anhidro, agitar y separar las fases, la fase acuosa se elimina. Secar la fase clorofórmica con sulfato de sodio anhidro y pasar por papel filtro Whatman. Esta solución se denomina **Fracción D**
La fracción D correspondiente a las fases clorofórmicas es empleada para determinar la presencia de flavonoides, Leucoantocianidinas, Cardenólidos, esteroides, Triterpenos y alcaloides.

3.4.1 Ensayo de Actividad Citotóxica por el método de lechuga.

Pre germinación: Seleccionar de forma aleatoria semillas de lechuga, colocar dentro de una placa Petri que contiene papel filtro humedecido y colocarlo dentro de una cámara húmeda, incubar a 20° C durante 24 horas.

Grupo Control T: Colocar papel filtro dentro de tres placas Petri, inyectar 1000 µL de etanol en centro del papel de cada una de ellas, colocar 5 semillas de similares características en cada una de las placas, agregar 700 µL de agua purificada en el centro del papel contenida en las placas. Tapar las placas e incubar por 52 horas a 20°C. Medir los hipocótilos y tallos de cada semilla. Comparar con los demás grupos.

Grupo experimental: Colocar papel filtro dentro de tres placas Petri, inyectar 1000 µL de extracto etanólico de Zarzamora en centro del papel de cada una de ellas, seguir el procedimiento del grupo control. Se trabajó en siete grupos problema a diferente concentración.

Problema T1 : Grupo al que se trabaja con un extracto equivalente a 100 mg/mL

Problema T2 : Grupo al que se trabaja con un extracto equivalente a 30 mg/mL

Problema T3 : Grupo al que se trabaja con un extracto equivalente a 10 mg/mL

Problema T4 : Grupo al que se trabaja con un extracto equivalente a 3 mg/mL

Problema T5: Grupo al que se trabaja con un extracto equivalente a 1 mg/mL

Problema T6: Grupo al que se trabaja con un extracto equivalente a 0,3 mg/mL

Problema T7: Grupo al que se trabaja con un extracto equivalente a 0,1 mg/mL

3.4.2 Ensayo de Actividad antioxidante por el Método DPPH:

Solución DPPH: Pesar 11,8 mg de DPPH, transferir a una Fiola de 100 mL, agregar 60 mL de metanol, agitar hasta disolver, diluir a volumen con metanol y mezclar.

Para los ensayos, se realizarán diluciones al 1% y al 0.1% a partir del extracto de zarzamora, se cogerán 1,0 ml de cada muestra y se le agregará 0.4mL a cada uno como control positivo se usará ácido gálico, posteriormente se incubarán las muestras por 30

minutos en oscuridad, terminado el tiempo se leerán inmediatamente en el espectrofotómetro a 517nm, el blanco reactivo se preparará agregando 10,0 mL de metanol a 4 mL de la solución DPPH.

El porcentaje de inhibición se calculará usando la siguiente formula.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(Ab. bl - Ab. m)}{Ab. bl} \times 10$$

Donde:

Ab.bl. : absorbancia del blanco reactivo (DPPH más metanol).

Ab.m: absorbancia de la muestra más DPPH.

Grupos Experimentales:

Control: Grupo al que se aplica solo DPPH

Problema I: Grupo al que se aplica extracto a la concentración del 10%

Problema II: Grupo al que se aplica extracto a la concentración del 5%

Problema III: Grupo al que se aplica extracto a la concentración del 2.5%

Problema IV: Grupo al que se aplica extracto a la concentración del 1.25%

Datos preliminares

Como estudios preliminares se realiza la prueba de solubilidad y marcha fitoquímica según método Olga Lock (2016).

Marcha Fitoquímica estudio preliminar

Se realiza con 40 mg de extracto seco de *Rubus robustus* C. presl, con ayuda de 20 mL de agua purificada para solubilizar, seguido se transfiere 1 mL a cada tubo de ensayo, para en seguida agregar V gotas de los reactivos a continuación presentados.

Tabla 2:Marcha Fitoquímica.

REACTIVO	METABOLITO SECUNDARIO
Ninhidrina	Aminoácidos
Gelatina	Taninos
Tricloruro Férrico	Taninos
Shinoda	Flavonoides
Liebermann Burchard	Esteroides y triterpenos
Borntrager	Antraquinonas
Fehling	Azucres reductores
Kedde	Carotenoides
Mayer	Alcaloides
Wagner	Alcaloides
Rosenheim	Leucoantocianinas

Fuente. Elaboración propia con información recopilada en la bibliografía (Olga Lock,1997). Marcha fitoquímica para identificar metabolitos secundarios en el extracto etanólico de Zarzamora.

Solubilidad estudio Preliminar

Se pesa 5 mg de extracto seco y se transfiere a un tubo de ensayo, seguido se agrega 1 mL de los reactivos que a continuación presentamos.

Tabla 3:Solventes para pruebas de solubilidad.

REACTIVO
Agua
Etanol
Metanol
Cloroformo
Acetato de Etilo
n-butanol

Fuente. Elaboración propia con información recopilada en la bibliografía (Olga Lock,1997). Prueba de solubilidad determinar el grado de dispersión y distribución del extracto en diferentes reactivos partiendo de lo más polar a lo menos polar.

3.4.3 Técnicas para la evaluación del efecto antioxidante

Prueba para medir la capacidad antioxidante 2, 2 difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

Fundamento:

El radical libre DPPH reacciona con los compuestos antioxidantes a través de un proceso similar a la reacción de primer orden, esta reacción se caracteriza por la transferencia de un átomo de hidrógeno del agente antioxidante al radical y se mide por la disminución de la absorbancia en función al tiempo.

Procedimiento:

Se prepara una curva de calibración a través de concentraciones de DPPH que van desde 0,035 a 0,2 mM en metanol grado HPLC. Las concentraciones de catequina se preparó a la concentración de $6,67 \times 10^{-3}$. La reacción se desarrolla a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad; transcurrido el tiempo se realiza las lecturas en un espectrofotómetro UV-VIS. En paralelo se incubaba un tubo de ensayo blanco que solamente contenía metanol. Además de la curva de calibración se prepara muestras con 3 repeticiones en las lecturas de cada grupo.

Problema I: se trabaja con extracto al 1,25%

Problema II: se trabaja con extracto al 2,5%

Problema III: se trabaja con extracto al 5,0%

Problema IV: se trabaja con extracto al 10,0%

Se encontró el efecto antioxidante expresado como porcentaje de inhibición oxidante

3.4.4 Técnicas para la evaluación de la actividad Citotóxica

Método de la lechuga para medir la actividad citotóxica en vegetales.

Fundamento:

Se basa en el principio de inhibición en el crecimiento del proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plantas en los primeros días de desarrollo. El punto final se evalúa mediante la inhibición en el crecimiento y elongación de radícula e hipocótilo de las semillas de lechuga en germinación.

Procedimiento:

Se colocan las semillas de lechuga dentro de una placa Petri con papel filtro húmedo. Seguido se coloca dentro de una cámara húmeda durante 24 horas a 20°C.

En una placa de Petri se coloca papel filtro, se inyecta 1000 μ L de metanol en el centro del papel, se ubica 5 semillas de similares características dentro de las placas, se agrega 700 μ L de agua purificada en el centro del papel contenida en las placas. Se tapa e incuba por 52 horas a 20°C. como punto final se mide la radícula e hipocótilo de cada semilla. De la misma manera se trabaja los grupos experimentales excepto de la adición de metanol. Se compara con los demás grupos.

3.5 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Se calcula la concentración de inhibición del extracto etanólico del efecto antioxidante y citotoxicidad el cual se presenta en tablas gráficos. (Análisis de Varianza Anova, prueba de Tukey) con procesador de datos SPSS v 25. para los datos obtenidos ($p < 0.05$).

Mediana:

Está representada por el dato o la variable de posición central de una serie de datos ordenados. Cuando se tiene 2 datos la mediana coincide con la media aritmética.

Media aritmética

Se calcula determinando la sumatoria de todos los datos divididos entre el número de datos utilizados en la sumatoria.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

Varianza:

Mide el grado de proximidad entre un conjunto de datos dispersos en relación con su media. Se calcula como la sumatoria de los residuos elevados al cuadrado dividido entre el total de datos obtenidos. Si calculamos la varianza de valores se resta la media de cada valor individual, las diferencias se elevan al cuadrado y luego se suman.

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_j - \bar{X})^2}{n-1}$$

Desviación Estándar:

Es una medida de dispersión más usada que indica que tan distantes están los datos obtenidos con referencia a la media. Mide la separación entre datos y lo podemos expresar como la raíz cuadrada de la varianza.

$$S = \sqrt{\frac{\text{suma}(x_i - \text{media aritmética})^2}{n}}$$

Prueba de Tukey:

Sirve para comparar todos los intervalos de confianza entre múltiples grupos, usa medias graduadas, basado en la comparación de varianza, asegurando que lo aparente en muchos balances que se califique como significativa.

Análisis de Varianza de un Factor (Anova):

Mediante este método se prueba la hipótesis de que las medias de dos o más poblaciones sean iguales, se basa en la aceptación o rechazo de la hipótesis nula, cuando se rechaza normalmente no se continúa con las comparaciones estadísticas, que permitan analizar datos empíricos, para establecer si hay diferencia significativa entre el conjunto de medias.

Coefficiente de correlación de Pearson:

Es la medida entre dos variables cuantitativas y continuas, es independiente entre la escala de medidas, varía en el intervalo entre $[-1, 1]$. Si $r=1$ significa que hay una correlación positiva perfecta; si $0 < r < 1$, existe una correlación positiva; si $r=0$ no existe relación lineal, pero esto no quiere decir que las variables sean independientes. Si $-1 < r < 0$, existe una correlación negativa; si $r=-1$ existe una correlación negativa perfecta.

CAPITULO IV

PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Presentación de Resultados

Los datos son presentados en tablas con respaldo fotográfico en anexos

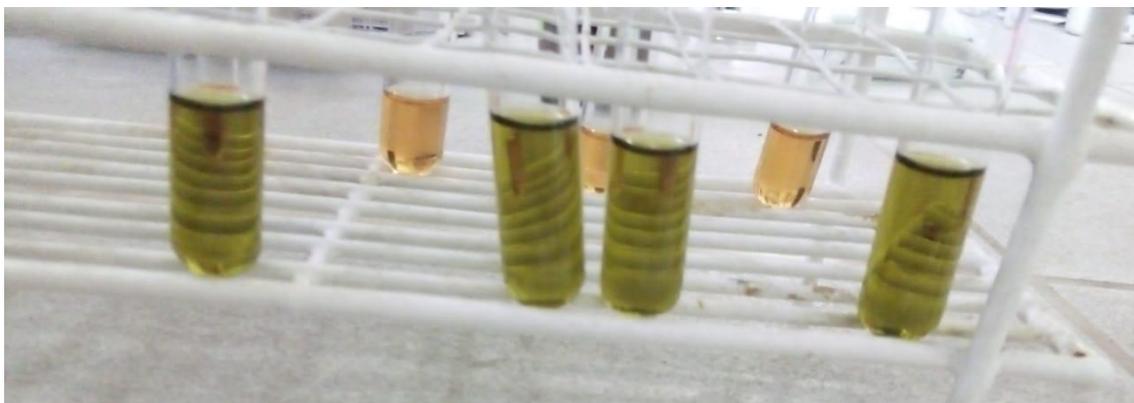
4.1.1 Prueba de solubilidad

Tabla 4: Resultados de prueba de solubilidad

SOLVENTE	SOLUBILIDAD
Agua	++
Etanol	++
Metanol	+++
Cloroformo	++
Acetato de etilo	++
Hexano	+
N-butanol	+

Fuente el autor. Elaboración propia. Leyenda: Muy soluble (+++), Soluble (++) , Poco soluble (+), Insoluble (-).

De acuerdo a los ensayos al extracto seco de hojas de *Rubus robustus* C. presl, realizada en el laboratorio de Biología molecular de la Universidad Agraria la Molina. Se obtiene como resultado de este ensayo mayor solubilidad frente al solvente metanol.



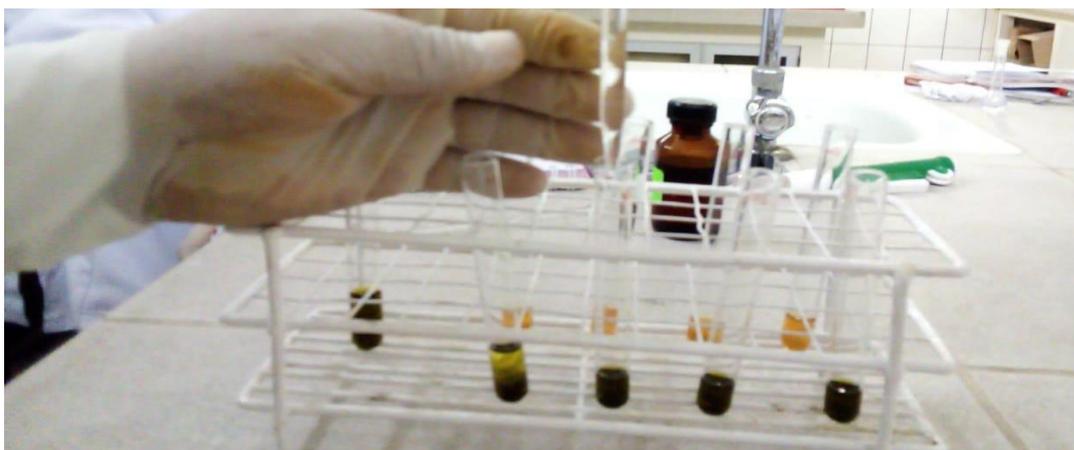
4.1.2 Marcha Fitoquímica

El resultado obtenido para esta prueba marcha fitoquímica del extracto de hojas de *Rubus robustus* C. presl “Zarzamora” realizados en Universidad Agraria la Molina los presentamos a continuación.

Tabla 5: Resultados de Marcha Fitoquímica

Reactivo	Identificación	Metabolito Secundario
Ninhidrina	++	Aminoácidos
Gelatina	++	Taninos
Tricloruro Férrico	+++	Taninos
Shinoda	+++	Flavonoides
Liebermann Burchard	+	Esteroides y triterpenos
Borntrager	+++	Antraquinonas
Kedde	++	Carotenoides
Mayer	+	Alcaloides
Wagner	+	Alcaloides
Rosenheim	++	Leucoantocianinas

Leyenda: +++: *abundante* ++: *poco* +: *muy poco* -: *ausente*



Observaciones:

Aminoácidos: Reactivo Ninhidrina; reacción positiva hay un viraje a un color violeta tenue, indicándonos la presencia de poca cantidad.

Taninos: Reacción de Gelatina; reacción positiva se observa un ligero precipitado blanquecino, lo cual nos indica presencia de poca cantidad.

Flavonoides: Reactivo Shinoda; reacción positiva se observa coloración verde oscuro, indicando su presencia en cantidad abundante

Esteroides y triterpenos: Liebermann Burchard; reacción positiva vira hacia un color anaranjado tenue, indica presencia en muy poca cantidad

Antraquinonas: Borntrager; reacción positiva viraje de la reacción a un color anaranjado, presenta abundante cantidad.

Carotenoides: Kedde; reacción positiva viraje a un color violeta, presencia de poca cantidad

Alcaloides: Mayer; reacción positiva se forma un ligero precipitado blanquecino, presencia de muy poca cantidad.

Alcaloides: Wagner; reacción positiva precipitado de color marrón tenue, presencia de muy poca cantidad.

Leucoantocianinas: Rosenheim; reacción positiva viraje a un color rosado tenue, presencia de muy poca cantidad.

4.1.3 Ensayo del efecto antioxidante del extracto etanólico de *Rubus robustus* C. presl “Zarzamora”

Tabla 6: Porcentaje de efecto antioxidante de Rubus robustus C presl. Frente Al reactivo 2, 2 difenil-1-picrilhidracilo DPPH

Grupos de Investigación	Concentración del extracto (g/100mL)	Efecto antioxidante (%)
Problema I	1.25	-33.24
Problema II	2.50	26.21
Problema III	5	60.40
Problema I V	10	77.21

Fuente: Elaboración Propia

El efecto antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Rubus robustus* C. presl “Zarzamora” se observa que se incrementa de acuerdo al incremento en la concentración

del extracto. A la concentración del 10g/100mL de extracto el efecto antioxidante es de 77.21%, en contraste con la concentración de 1.25 g/100mL no posee efecto antioxidante y fue significativo respecto al grupo control ($p < 0.05$) Según se aprecia en la tabla 6 y figura 3.

Tabla 7: Medias para la determinación del efecto antioxidante de *Rubus robustus C. presl.*

<i>Grupos de investigación</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	3	2.106	0.702	0
Problema I	3	2.806	0.935	0.000325
Problema II	3	1.554	0.518	3.9E-05
Problema III	3	0.834	0.278	0.000175
Problema I V	3	0.48	0.16	6.1E-05

Fuente: autor. Elaboración Propia

Mediante tabla 7 se puede observar que existe variabilidad entre las medias de todos los grupos ($p < 0.05$), es necesario analizar las tablas 8 y 9 para ver el nivel de significancia entre grupos.

Tabla 8: Análisis de Varianza para la determinación del efecto antioxidante

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.18135467	4	0.295338667	2459.79	6.46828E-15	3.478049691
Dentro de los grupos	0.00120067	10	0.000120067			
Total	1.18255533	14				

Fuente: autor. Elaboración Propia

La variable concentración del extracto etanólico de las hojas de *Rubus robustus C. presl* produce efectos significativos en la variable efecto antioxidante ($p < 0.05$), observando

mediante ello que al menos un grupo el promedio de respuestas es distinto para el 95% de confiabilidad.

Tabla 9: Prueba de Tukey para la determinación la actividad Antioxidante

	Control	Problema I	Problema II	Problema III	Problema IV
Control		-0.233	0.184	0.424	0.542
Problema I			0.417	0.657	0.775
Problema II				0.24	0.358
Problema III					0.137
Problema IV					

Fuente: autor. Elaboración Propia

HSD (Diferencia Honestamente significativa) = 0.031

Multiplicador = 4.910

MSe (Cuadrado del error medio)= 0.0001

n (número de elementos en cada grupo)= 3

En la tabla 9 se aprecia la comparación de varianza entre grupos, prueba de Tukey, en éstas se observa la significancia que existe entre las respuestas de todos los grupos, confirmando de esta manera la significancia estadística para el efecto antioxidante ($p < 0.05$).

Tabla 10: Determinación del IC50 para actividad antioxidante del extracto de hojas de Rubus robustus C. presl. "Zarzamora"

Concentración	Efecto Antioxidante (%)	IC50 (g/100 mL)
1.25%	-33.24	
2.5%	26.21	3,0 g/100mL
5%	60.40	
10%	77.21	

Fuente: autor. Elaboración propia

Se determina la concentración inhibitoria máxima media (IC50) para el extracto etanólico de hojas de zarzamora obteniéndose un valor de 3.0.

4.1.3 Ensayo de la actividad citotóxica del extracto etanólico de *Rubus robustus* C. presl “Zarzamora”

La actividad citotóxica del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. presl “Zarzamora” incrementa conforme se incrementa la concentración, esto se expresa mediante la inhibición en el crecimiento de radícula e hipocótilo de las semillas de lechuga en germinación. A la concentración del 100 mg/mL, inhibe su crecimiento en 93.06% para radícula (figura 4) y 91.38% para hipocótilo (figura 5).

Tabla 11: Comparación de Medias entre grupos para la actividad Citotóxica

RESUMEN					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
Control T (mm)	5	72	14.4	0.3	
Problema T1 (mm)	5	5	1	0	
Problema T2 (mm)	5	10	2	0	
Problema T3 (mm)	5	23	4.6	0.3	
Problema T4 (mm)	5	43	8.6	0.3	
Problema T5 (mm)	5	55	11	0	
Problema T6 (mm)	5	54	10.8	0.2	
Problema T7 (mm)	5	64	12.8	0.7	

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 11 se observa variabilidad de medias para el efecto citotóxico ($p > 0.05$), mas no se tiene información para saber si estas variabilidades nos dan resultados significativos, se analiza las tablas 12 y 13.

Tabla 12: Análisis de varianza para la determinación de la actividad citotóxica

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	887.9	7	126.8428	563.746	0.00	2.312741187
Dentro de los grupos	7.2	32	0.225			
Total	895.1	39				

Fuente: Elaboración propia

La concentración del extracto etanólico del extracto etanólico de las hojas de *Rubus robustus* C. presl resulta significativa para la variable actividad citotóxica, pues en al menos un grupo el promedio de respuestas es diferente para el 95% de confiabilidad.

Tabla 13: Prueba de Tukey para la determinación la actividad Citotóxica

	Control T (mm)	Problema T1 (mm)	Problema T2 (mm)	Problema T3 (mm)	Problema T4 (mm)	Problema T5 (mm)	Problema T6 (mm)	Problema T7 (mm)
Control (mm)		13.4	12.4	9.8	5.8	3.4	3.6	1.6
Problema T1 (mm)			-1	-3.6	-7.6	-10	-9.8	-11.8
Problema T2 (mm)				-2.6	-6.6	-9	-8.8	-10.8
Problema T3 (mm)					-4	-6.4	-6.2	-8.2
Problema T4 (mm)						-2.4	-2.2	-4.2
Problema T5 (mm)							0.2	-1.8
Problema T6 (mm)								-2
Problema T7 (mm)								

Leyenda: Comparación entre grupos de acuerdo a la diferencia estadística que posee entre grupos a diferente concentración

HSD (Diferencia Honestamente significativa = 0.959

Multiplicador = 4.520

MSe (Cuadrado del error medio)= 0.225

n (número de elementos en cada grupo)= 5

Se compara la varianza entre grupos (tabla 13), para la actividad citotóxica de *Rubus robustus* C. presl, se aprecia la significancia estadística entre todos los grupos, excepto cuando se compara el grupo problema T5 con el grupo problema T6. confirmando de esta manera la significancia estadística para el efecto antioxidante.

4.2 Prueba de Hipótesis

4.2.1 Hipótesis General

H1: El extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus C. presl.* (Zarzamora) tiene efecto antioxidante y citotóxico.

H0: El extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus C. presl.* (Zarzamora) no tiene efecto antioxidante y citotóxico.

Análisis de aceptación de la hipótesis general en respuesta a las pruebas estadísticas de las hipótesis específicas

Hipótesis General	Criterio de aceptación estadística
El extracto etanólico de hojas de <i>Rubus robustus C. presl.</i> (Zarzamora) tiene efecto antioxidante y citotóxico.	Se acepta

Tabla 14: Coeficiente de correlación de Pearson para demostrar el efecto antioxidante para demostrar la Hipótesis general.

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
1	,999 ^a	,999	,998	,01557

a. Predictores: (Constante), R2

b. Variable dependiente: R1

El coeficiente de correlación de Pearson es 0.999 con relación en R1 (observancia 1) y R2 (observancia 2) podemos afirmar la actividad antioxidante con respecto al R1 Y R2 es positiva demostrando la Hipótesis General y construyendo una constante $y = a + bx$ donde la constante es 0.004 y R2 es 1,003 esto nos indica es un modelo predictivo y la correlación nos indica una prueba de hipótesis.

Tabla 15: Coeficiente de correlación de Pearson para demostrar el efecto antioxidante para demostrar que existe correlación lineal entre los valores de concentración y efecto antioxidante.

RESUMEN DEL MODELO^B

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
1	,999 ^a	,999	,998	,01543

a. Predictores: (Constante), R3

b. Variable dependiente: R1

El coeficiente de correlación de Pearson es 0.999 con relación en R1 (observancia 1) y R3(observancia 3) podemos afirmar la actividad antioxidante con respecto al R1 Y R3. Demostrando de esta manera el efecto antioxidante del extracto.

Tabla 16: Resumen de modelo y estimaciones de parámetro para la demostración del efecto antioxidante

Variable dependiente: R1

Ecuación	R cuadrado	Resumen del modelo				Estimaciones de parámetro	
		F	gl1	gl2	Sig.	Constante	b1
Lineal	,999	1427,665	1	2	,001	,004	1,003
Crecimiento	,962	50,322	1	2	,019	-1,960	2,158
Exponencial	,962	50,322	1	2	,019	,141	2,158

La variable independiente es R2.

Mediante la tabla 16 podemos afirmar que existe correlación lineal entre la respuesta del efecto antioxidante y la concentración de las muestras. Queda demostrado que el efecto antioxidante se incrementa en forma proporcional ($p < 0.05$).

Tabla 17: Coeficiente de correlación de Pearson para demostrar la actividad citotóxica.

Resumen del modelo^b

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
1	,167 ^a	,028	-,296	,62361

a. Predictores: (Constante), Hipocótilo

b. Variable dependiente: Radícula

La asociación entre el crecimiento de la Radícula e Hipocótilo nos indican si es toxico para las semillas de lechuga en germinación. Demostrado mediante una relación nos muestran una correlación de Pearson de 0.167 en una muestra a 10 mg.

Tabla 18: Resumen de modelo y estimaciones de residuo para la demostración de la actividad citotóxica

Estadísticas de residuos ^a					
	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Desviación	N
Valor pronosticado	4,5000	4,6667	4,6000	,09129	5
Residuo	-,66667	,50000	,00000	,54006	5
Desv. Valor pronosticado	-1,095	,730	,000	1,000	5
Desv. Residuo	-1,069	,802	,000	,866	5

a. Variable dependiente: Radícula

En las tablas 14, 15 y 16 nos demuestran el efecto antioxidante del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. presl ($p < 0.05$); la figura 3 nos da evidencia que el grupo trabajado a una concentración de 10g/100 mL tiene mayor efecto comparado con los demás grupos. Las tablas 17 y 18 nos comprueban que realmente existe un efecto citotóxico ($p < 0.05$), este efecto se corrobora con la figura 4 en la cual se puede evidenciar mayor inhibición del efecto a una concentración de 100 mg/mL. Por lo tanto, se acepta la hipótesis H1.

4.2.1 Hipótesis Específica

Hipótesis Específica	Criterio de aceptación estadística
La concentración del extracto etanólico de hojas de <i>Rubus robustus</i> C. Presl. (Zarzamora) que presenta mayor efecto antioxidante es 10g/100mL.	Se acepta
La concentración del extracto etanólico de hojas de <i>Rubus robustus</i> C. Presl. (Zarzamora) que presenta mayor actividad citotóxica es 100 mg/mL.	Se acepta

H1: La concentración del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. Presl. (Zarzamora) que presenta mayor efecto antioxidante es 10g/100mL.

H0: La concentración del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. Presl. (Zarzamora) que presenta mayor efecto antioxidante no es 10g/100mL.

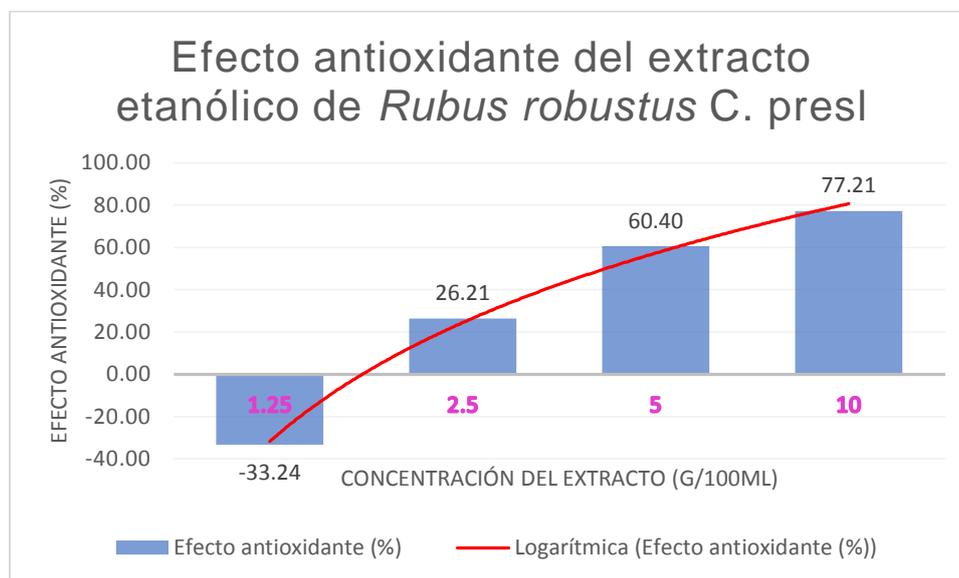


Figura 3: porcentaje de efecto antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Rubus robustus* C. presl. Fuente: autor. Elaboración propia.

Tabla 19: Porcentaje de efecto citotóxico

Muestras (mg/mL)	100mg	30mg	10mg	3mg	1mg	0.3mg	0.1mg
Inhibición del crecimiento Radícula (%)	93.06	86.11	68.06	40.28	23.61	25.00	11.11
Inhibición del crecimiento Hipocótilo (%)	91.38	81.03	60.34	53.45	41.38	39.66	13.79

En la tabla 6, 7, 9 y 10, al igual que en la figura 3 se aprecia que las muestras a una concentración de 10 g/100 mL tiene mayor efecto comparado con las otras concentraciones del extracto trabajadas, alcanzando un efecto antioxidante de 77.21%. Por otro lado, en la tabla 19, figura 4 y figura 5 se observa claramente la actividad citotóxica con mayor

porcentaje a una concentración de 100 mg/mL, la cual alcanza en inhibir 93.06% en la radícula y 91,38% en el hipocótilo. Por lo tanto, se acepta la hipótesis H1.

H2: La concentración del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. Presl. (Zarzamora) que presenta mayor actividad citotóxica es de 100 mg/mL.

H0: La concentración del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. Presl. (Zarzamora) que presenta mayor actividad citotóxica no es de 100 mg/mL.

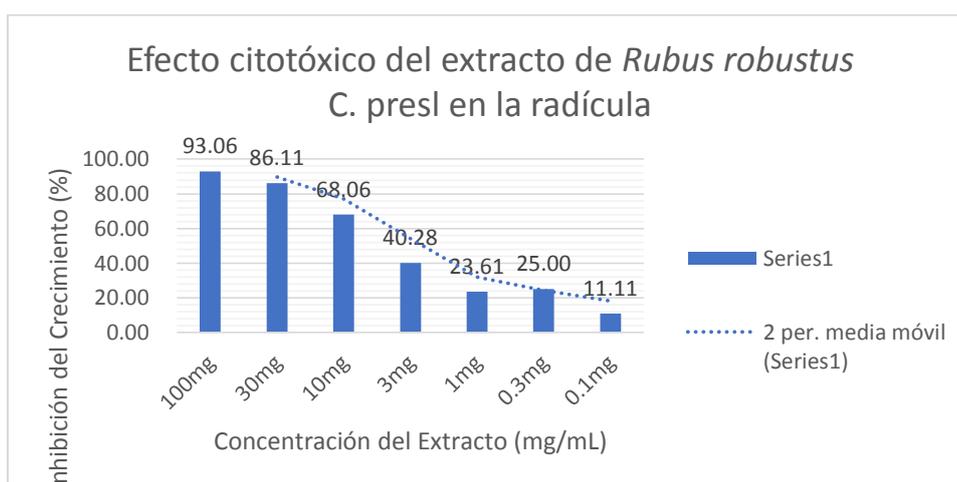


Figura 4: porcentaje de efecto citotóxico del extracto etanólico de las hojas de *Rubus robustus* C. presl en radícula de semillas de lechuga. Fuente: autor. Elaboración propia

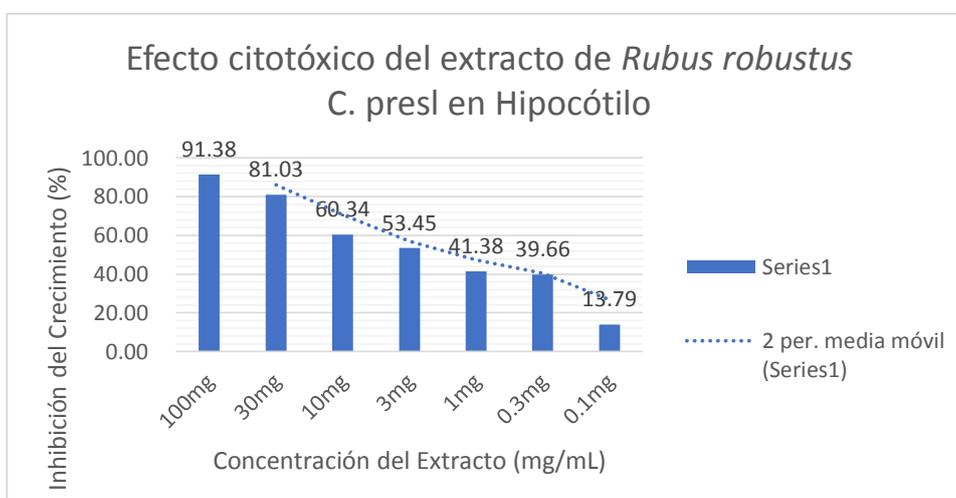


Figura 5: porcentaje de efecto citotóxico del extracto etanólico de las hojas de *Rubus robustus* C. presl en hipocótilo de semillas de lechuga. Fuente: autor. Elaboración propia

En la tabla 11,12, 13, figura 4 y 5 se observa la variabilidad de resultados para actividad citotóxica, donde se puede observar que resulta muy significativo ($p < 0.05$). Por lo tanto, se acepta la hipótesis H2.

4.3 Discusión de Resultados

El efecto antioxidante se determinó mediante el método 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH). Este método consiste en que el reactivo en su estructura posee un electrón desapareado, el cual le da aspecto de color azul violeta, este radical al interactuar con grupos químicos con propiedades antioxidantes, cambia su aspecto a color amarillo pálido. Esta medición se realizó a 517 nm de longitud de onda, y la actividad antioxidante se determina mediante la diferencia de absorbancias. En la figura 3 se puede observar que la actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de Zarzamora es directamente proporcional a la concentración utilizada para las pruebas, determinándose un coeficiente de correlación de Pearson de 0,999, lo que demuestra el incremento de su efecto de acuerdo a la concentración. Su efecto antioxidante se debe posiblemente gracias a la presencia de flavonoides como las antocianinas, aunque se requiere un estudio profundo para determinar específicamente cuales de ellas le da esa propiedad antioxidante.

Se obtiene un valor correspondiente a la prueba F de 2459,79 y el P valor correspondiente a esta prueba estadística es de 0,0. Como el nivel de significancia es de 0,05 y el valor de P es menor a este valor, se rechaza la H_0 y se acepta con la H_a , la cual nos dice que en al menos un grupo el promedio de respuestas es distinto con 95% de confiabilidad. Mediante la prueba de Tukey obtenemos la HSD de 0,031; se observa la diferencia entre todos los grupos, como estas diferencias son mayores en valor absoluto que la HSD, entonces podemos decir que existe diferencia significativa entre todos los grupos para un 95% de confiabilidad.

También nos resultó interesante determinar si el extracto etanólico de zarzamora posee un efecto tóxico frente a semillas de lechuga. El método consistió en evaluar el porcentaje de inhibición en la germinación y elongación de la radícula y del hipocotilo de las semillas de lechuga. Es muy importante conocer que, durante el proceso de germinación en los primeros días de crecimiento, la planta tiene muchos procesos fisiológicos en la cual la

presencia de una toxina interfiere en el desarrollo de la planta. Mediante esta prueba se logra también conocer la supervivencia y desarrollo de la planta a través del crecimiento o inhibición de sus radículas e Hipocótilos, en este trabajo se puede evidenciar notablemente la inhibición en el crecimiento de las radículas, llegando hasta inhibir el crecimiento hasta en 93,6% en la radícula y 91.38% en el hipocótilo en el grupo al que se administró mayor concentración del extracto (100mg/mL). También se puede evidenciar que la actividad tóxica del extracto en estudio frente a semillas de lechuga en germinación, en el grupo aplicado a mayor concentración produce necrosis a las radículas de todas las semillas en germinación; de manera similar sucede con los hipocotilos de lechuga en germinación.

Se obtiene un valor correspondiente a la prueba “F” de 563,75 y el “P” valor correspondiente a esta prueba estadística es de 0,0. Como el nivel de significancia es de 0,05 y el valor de “P” es menor a este valor, se rechaza la H_0 y se acepta con la H_a , la cual interpretamos que alguna de las medias de las distribuciones de la variable Crecimiento en todos y cada uno de los grupos independientes es diferente, para un 95% de confiabilidad. Mediante la prueba de Tukey obtenemos la HSD de 0,959; se observa la diferencia entre todos los grupos, como estas diferencias son mayores en valor absoluto que la HSD en todos los grupos excepto en un punto, entonces podemos decir que existe diferencia significativa entre todos los grupos para un 95% de confiabilidad excepto entre el grupo de 0,1 mg/mL comparado con el grupo de 0,3 mg/mL.

También se realizó estudios preliminares. Para el análisis de solubilidad se observa que el extracto seco de las hojas de *Rubus robustus* C. presl posee diferentes solubilidades, para este ensayo se observa que nuestro extracto se distribuye mejor en el solvente metanol, pues se considera que los analitos presentes en el extracto tienen similar polaridad que el metanol.

En la marcha fitoquímica realizada a través de la fuente de referencia Olga Lock se pudo identificar grupos constituyentes del extracto etanólico de las hojas de *Rubus robustus* C. presl, los principales y de mayor interés del trabajo resultó los flavonoides y alcaloides, por un lado, los primeros le confieren un efecto protector frente a radicales libres y los segundos una actividad tóxica frente a los organismos externos.

La determinación de los diferentes grupos constituyentes, se realizó en diferentes fracciones: Fracción A (Etanólico), se determinó aminoácidos, taninos y flavonoides observando mayor contenido de estos últimos mediante la prueba de Shinoda. Fracción B (Insoluble), se determina esteroides, triterpenos y antraquinonas, en esta fracción se puede observar mayor contenido de triterpenos, escasa presencia de antraquinonas y nula en esteroides. Fracción C (Clorofórmica), se determina regular contenido de triterpenos, alcaloides, leucoantocianinas, carotenoides, poca cantidad de esteroides y abundante cantidad de flavonoides. Los flavonoides se pueden evidenciar mediante la prueba Shinoda a través del viraje de la reacción a un color Anaranjado a violeta. Se evidencia mayor presencia de flavonoides, éstos compuestos fenólicos cumplen funciones de reducción de radicales libres en el organismo.

La reacción de Shinoda consiste en agregar un trocito de magnesio y 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado. Esta reacción se observó inmediatamente una coloración violeta, debido a la presencia del grupo Benzopirona. También se puede apreciar presencia de taninos mediante la reacción positiva de tricloruro férrico y gelatina, el primero nos resulta un color marrón y el segundo nos da un precipitado gelatinoso; presencia de aminoácidos mediante el reactivo Ninhidrina, esta vira a un color azul.

Se puede también observar los fenoles de los flavonoides mediante un barrido espectral ultravioleta visible (Figura 6). Estos presentan 2 bandas de máxima absorción características, la primera con una absorbancia máxima en un rango entre 240 y 285 nm indicando la presencia del grupo benzoil; la segunda banda con una absorbancia máxima en un rango entre 300 y 350 nm, indicando la presencia del segundo anillo Cinamoil.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se determinó que el extracto etanólico de *Rubus robustus C. Presl.* Tiene efecto antioxidante y también citotóxico.

La actividad antioxidante del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus C. Presl.* (Zarzamora) por el método DPPH, es directamente proporcional a la concentración, encontrando un coeficiente de correlación de Pearson de 0,999, lo que demuestra el incremento de su efecto de acuerdo al incremento de su concentración y se puede determinar que la concentración con mayor efecto antioxidante fue de 10g/100mL.

El efecto citotóxico del extracto etanólico de las hojas de *Rubus robustus C. Presl.* (Zarzamora), presenta actividad alelopática a 100 mg, 30 mg y 10 mg de extracto seco, llegando a inhibir al crecimiento de radículas e hipocótilos del proceso de germinación de las semillas de lechuga. Se demuestra que la concentración con mayor efecto citotóxico que resultó fue la planteada en la hipótesis 100mg/mL, esta concentración inhibió el crecimiento en 93.6% en radícula y 91.38% en hipocótilo.

5.2 Recomendaciones

Realizar ensayos para determinar con mayor precisión los componentes encargados de la actividad antioxidante.

Es necesario hacer pruebas de toxicidad aguda, crónica y sub.cronica a fin de evaluar posibles efectos adversos o no deseados

Realizar ensayos in vivo de protección frente al estrés oxidativo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Campbell, C. (1999). Campbell, C., (1999). Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. Mexico. *Revista American Journal of Botany.*, pp. 81-97 DOI 10.2307 / 2656957.
- Cruz, M. (2011). Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl (zarzamora). *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 42(4), 66-71. Recuperado en 15 de mayo 2019, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952011000400007&lng=es&tlng=es.
- Cruzado, E. (2019). Determinación de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de la Zarzamora (*Rubus fruticosus*) del Distrito de Las Pirias, Jaén, Cajamarca. *Repositorio de la Universidad Nacional de Jaén*, 23-40 <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3068/1/BQ34.pdf>.
- García, M. (2017). Protección antioxidante de zarzamora para disminuir daño muscular en atletas de elite. Barcelona. *Revista de Psicología del Deporte*, 26 (2), pp. 156-164.
- Garro, A. (2015.). *Actividad antioxidante y citotóxica de extractos de Pilea dauciodora Wedd (Urticaceae)*. Colombia: *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(1), 88-97. Recuperado en 04 de marzo de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962015000100008&lng=es&tlng=es.
- Gerónimo, V. (2019). Contenido De Compuestos Fenólicos Y Actividad Antioxidante Del Fruto De *Rubus floribundus* Kunth “Zarzamora” En Diferentes Estadios De Maduración. *Repositorio de la Universidad Cesar Vallejo*, 18-22.
- Gil, M. (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gaceta Médica de Bilbao* 106 (3), 106-113 .
- Gutierrez, V. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133. Recuperado en 22 de febrero de 2020, de

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572002000200009&lng=es&tlng=es.

- Hersh, M. (2014). Efecto Antibacteriano y Antifúngico comparativo de los extractos acuosos del Zea Mays L. (maíz morado), Rubus glaucus (mora andina); Opuntia soherensii (ayrampo) y Diseño de un gel de limpieza cutánea. *Repositorio de la Universidad Nacional de Trujillo*, pp. 15-24.
- Ibañez, A. (2011). Caracterización de la Mora Silvestre (Rubus spp.) en la Sierra Norte y Nororiente de Puebla, y Sierra Centro de Veracruz. México. *Universidad Autónoma de Chapingo.*, pp. 45-67.
- Lock, O. (2016). *Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales*. Lima - Tercera edición, revisada y ampliada.: Departamento de Ciencias de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Maldonado, G. (2010). G. Maldonado. 2010. Evaluación De Las Propiedades Físicoquímicas Y Funcionales De Jugo Obtenido Mediante Tratamiento Enzimático En Zarzamora Comercial (Rubus Spp) Del Estado De Michoacán. *Universidad Guanajuato. México.*, pp. 851-863.
- Navarrete, M. (2017). Factores asociados al sedentarismo en jóvenes estudiantes de educación superior. *Horizonte Médico (Lima)*, 19(1), 46-52. <https://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2019.v19n1.08>.
- OMS. (2018). *La OMS alerta de que el sedentarismo pone en peligro a una cuarta parte de la población adulta en el mundo*. Washington: REUTERS.
- Oszmiański, J. (2015). Determination of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Leaves from Wild Rubus L. Species. Journal MOLECULES. Polonia. *PUBMED*, P. 36-53.
- Peñarrieta, M. (2014). PHENOLIC COMPOUNDS IN FOOD. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81. Recuperado en 22 de octubre de 2019, de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602014000200006&lng=es&tlng=es.

- Perez. (2012). Silva (2012). Zarzamoras Silvestres: Plantas Mexicanas Con Potencial Antimicrobiano. (Mexico). *Participación de la mujer en la Ciencia.* , pp. 21-29.
- Perez, T. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1), Recuperado en 10 de julio de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002003000100007&lng=es&tlng=es.
- Rojas, N. (2012). Evaluación de fenólicos totales y capacidad antioxidante en la pulpa concentrada de Zarzamora (*Rubus* sp), en dos estadios de madurez. *Repositorio Institucional*, 35-50.
- Rojas, V. (2004). Therapeutic Constituents and Actions of Rubus Species. *Facultad de Farmacia y Ciencias Biomédicas, Universidad de Portsmouth, Portsmouth, PO1 2DT, Reino Unido.*, P: 32-46.
- Villena, J. (2017). Prevalencia de sobrepeso y obesidad en el Perú. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 63(4), 593-598. Recuperado en 01 de junio de 2019, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-51322017000400012&lng=es&tlng=es.
- Zuloeta, M. (2017). Zuloeta. 2017. Efecto De La Temperatura En La Calidad Fisicoquímica De Los Frutos De Zarzamora (*Rubus robustus* C. Presl). . *Repositorio de Universidad Nacional De Cajamarca.*, pp. 4-20.

Anexos

Anexo A: Matriz de consistencia

Problema General	Objetivo General	Hipótesis General	Operacionalización de Variables		
			V1: Variable Independiente	Dimensión	Indicadores
¿Tendrá actividad antioxidante y citotóxica el extracto etanólico de hojas de <i>Rubus robustus</i> C. presl (Zarzamora)?	Evaluar la actividad antioxidante y citotóxica del extracto etanólico de hojas de <i>Rubus robustus</i> C. presl. (Zarzamora).	El extracto etanólico de hojas de <i>Rubus robustus</i> C. presl. (Zarzamora) tiene efecto antioxidante y citotóxico.	Concentración del Extracto etanólico	Metabolitos secundarios	Absorbancias
Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas	V2: Variable Dependiente		
¿Cuál es la concentración del extracto etanólico de hojas de <i>Rubus robustus</i> C. Presl (Zarzamora) con mayor efecto antioxidante?	Determinar la concentración del extracto etanólico de hojas de <i>Rubus robustus</i> C. Presl. (Zarzamora) que presenta mayor efecto antioxidante.	La concentración del extracto etanólico de hojas de <i>Rubus robustus</i> C. Presl. (Zarzamora) que presenta mayor efecto antioxidante es 10g/100mL.	Actividad Antioxidante Efecto citotóxico	Capacidad Antioxidante Capacidad Tóxica	Efecto antioxidante % de inhibición
¿Qué concentración del extracto etanólico de hojas de <i>Rubus robustus</i> C. Presl (Zarzamora) presentará mayor actividad citotóxica?	Evaluar la concentración del extracto etanólico de hojas de <i>Rubus robustus</i> C. Presl. (Zarzamora) que presenta mayor efecto citotóxico.	La concentración del extracto etanólico de hojas de <i>Rubus robustus</i> C. Presl. (Zarzamora) que presenta mayor actividad citotóxica es de 100 mg/mL.			

Anexo B: Instrumento

Instrumento de recolección de datos para Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Rubus robustus* C. presl.

FRACCIÓN	REACTIVO	METABOLITO	PRECIPITADO Y/O COLOR	RESULTADO
A	Ninhidrina	Aminoácidos		
	Gelatina	Taninos		
	Tricloruro Férrico	Taninos		
	Shinoda	Flavonoides		
B	Liebermann Burchard	Esteroides		
		Triterpenos		
	Borntragern	Antraquinonas		
C	Kedde	Carotenoides		
	Liebermann Burchard	Esteroides		
		Triterpenos		
	Mayer	Alcaloides		
	Wagner	Alcaloides		
D	Shinoda	Flavonoides		
	Rosenheim	Leucoantocianinas		

Análisis de marcha fitoquímica de extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. presl

Instrumento de recolección de datos para efecto antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Rubus robustus* C. presl.

Concentración	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3
10%			
5%			
2.50%			
1.25%			

Instrumento de recolección de datos para actividad citotóxica

	Radícula (mm)	Observación	Hipocótilo (mm)	Observación
Control 1				
100mg				
30mg				
10mg				
3mg				
1mg				
0.3 mg				
0.1mg				

Instrumento de recolección de datos para prueba de solubilidad

SOLVENTE	SOLUBILIDAD
Agua	
Etanol	
Metanol	
Cloroformo	
Acetato de etilo	
Hexano	
N-butanol	

Anexo C: Consolidado*Data Consolidado De Resultados para efecto antioxidante*

Concentración	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Efecto antioxidante
1.25%	0.934	0.918	0.954	-33.24
2.5%	0.513	0.525	0.516	26.21
5%	0.273	0.268	0.293	60.40
10%	0.169	0.155	0.156	77.21
Control	0.702	0.702	0.702	-

Fuente: autor. Elaboración Propia

Data Consolidado De Resultados para efecto tóxico

	Radícula	%Inhibición R	Hipocótilo	%Inhibición H
Control 1	15	-	12	-
	15	-	10	-
	14	-	12	-
	14	-	12	-
	14	-	12	-
100mg	1	93.1	1	91.4
	1	93.1	1	91.4
	1	93.1	1	91.4
	1	93.1	1	91.4
	1	93.1	1	91.4
30mg	2	86.1	3	74.1
	2	86.1	2	82.8
	2	86.1	2	82.8
	2	86.1	2	82.8
	2	86.1	2	82.8
10mg	5	65.3	5	56.9
	4	72.2	5	56.9
	4	72.2	4	65.5
	5	65.3	5	56.9
	5	65.3	4	65.5
3mg	9	37.5	6	48.3
	9	37.5	5	56.9
	9	37.5	5	56.9
	8	44.4	6	48.3
	8	44.4	5	56.9
1mg	11	23.6	7	39.7
	11	23.6	8	31.0
	11	23.6	6	48.3
	11	23.6	6	48.3
	11	23.6	7	39.7
0.3 mg	10	30.6	7	39.7
	11	23.6	6	48.3
	11	23.6	6	48.3
	11	23.6	8	31.0
	11	23.6	8	31.0
0.1mg	13	9.7	10	13.8
	14	2.8	10	13.8
	12	16.7	10	13.8
	12	16.7	9	22.4
	13	9.7	11	5.2

Fuente: autor. Elaboración Propia

Anexo D: Cronograma Del Programa Experimental

<i>Actividad Experimental</i>	Número de días				
	1-5	6-15	16-18	19	20 - 23
Recolección y secado de muestra de la planta	X				
Preparación del extracto		X			
Prueba de solubilidad y marcha fitoquímica			X		
Ensayo del efecto antioxidante y antioxidante				X	
Ensayo de la actividad citotóxica					X

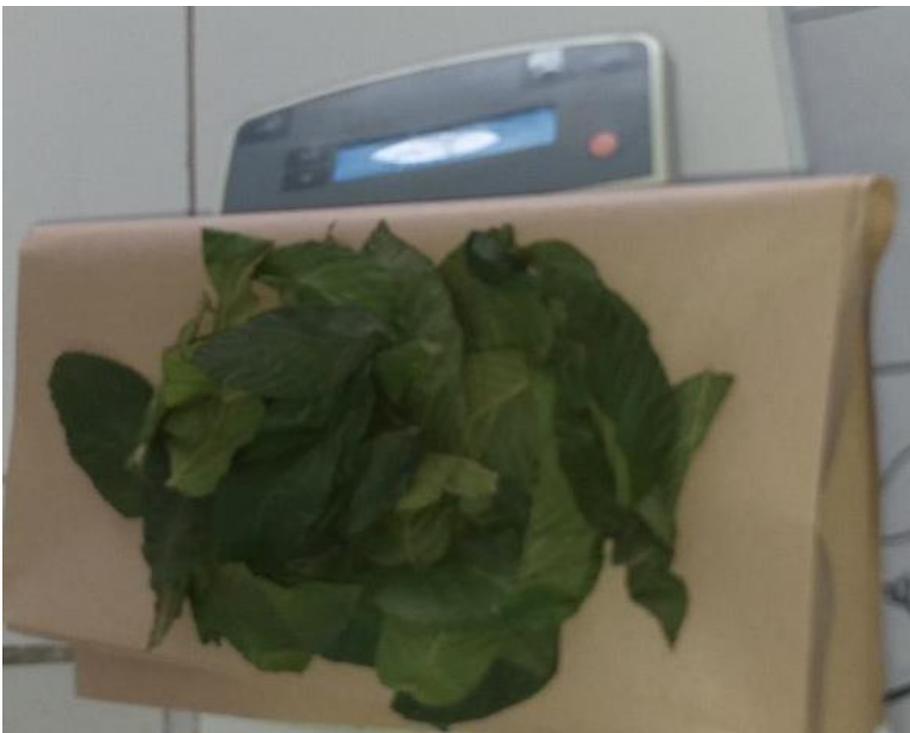
Ensayo de la actividad antioxidante	Número de minutos				
	0 - 30	31 -90	91 -110	111 -140	141 -180
Dilución del extracto	X				
Tratamiento de las muestras		X			
Centrifugación			X		
Incubación				X	
Lectura en espectrofotómetro					X

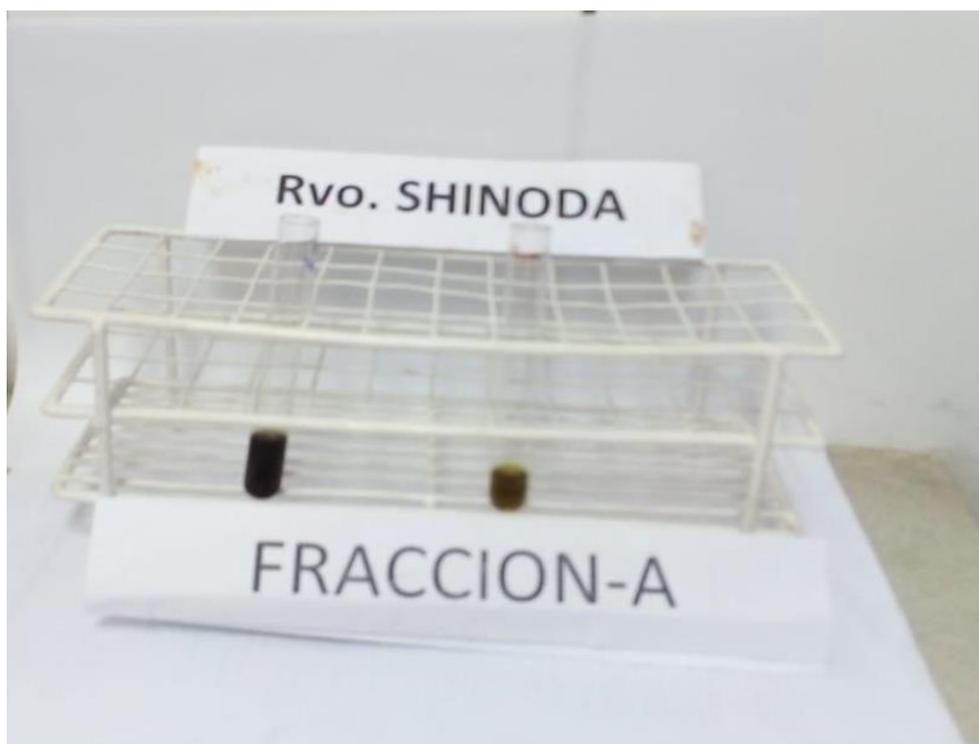
<i>Ensayo de la actividad citotóxica</i>	Número de horas					
	1	2 - 25	26 -27	28 -30	31 - 102	103 -105
Selección aleatoria de semillas de lechuga	X					
Pre germinación		X				
Dilución del Extracto			X			
Preparación de las muestras				X		
Incubación de las muestras					X	
Medición de radícula e hipocótilo						X

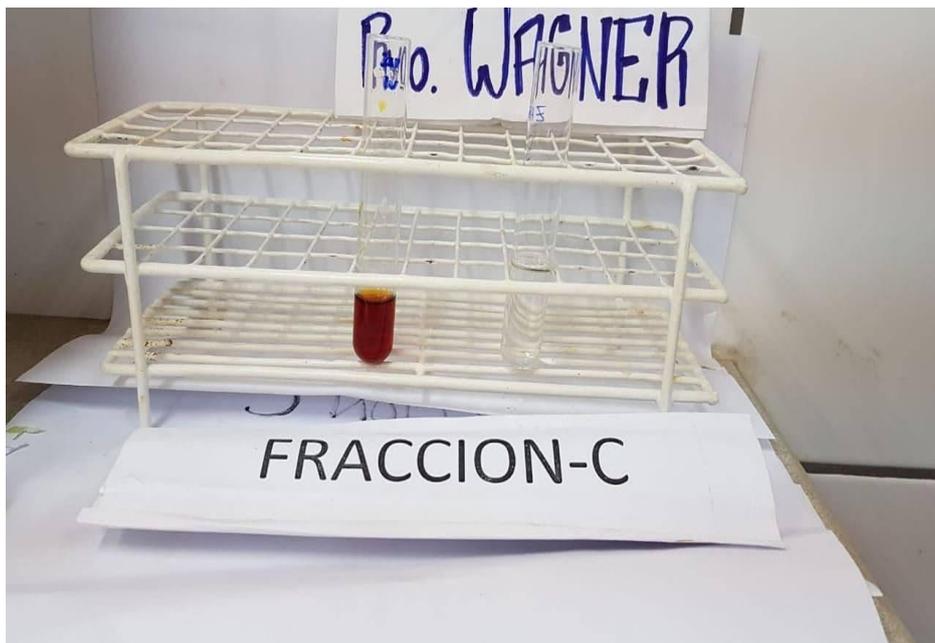
Anexo E: Testimonios Fotográficos

Recolección de la muestra









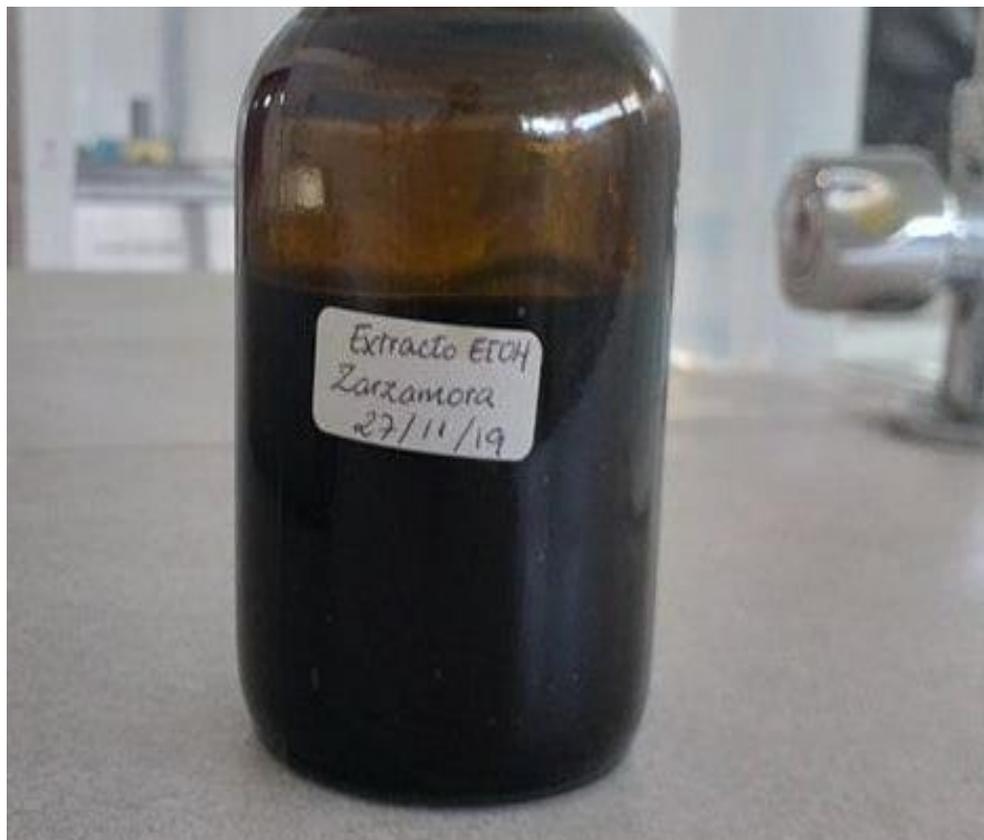
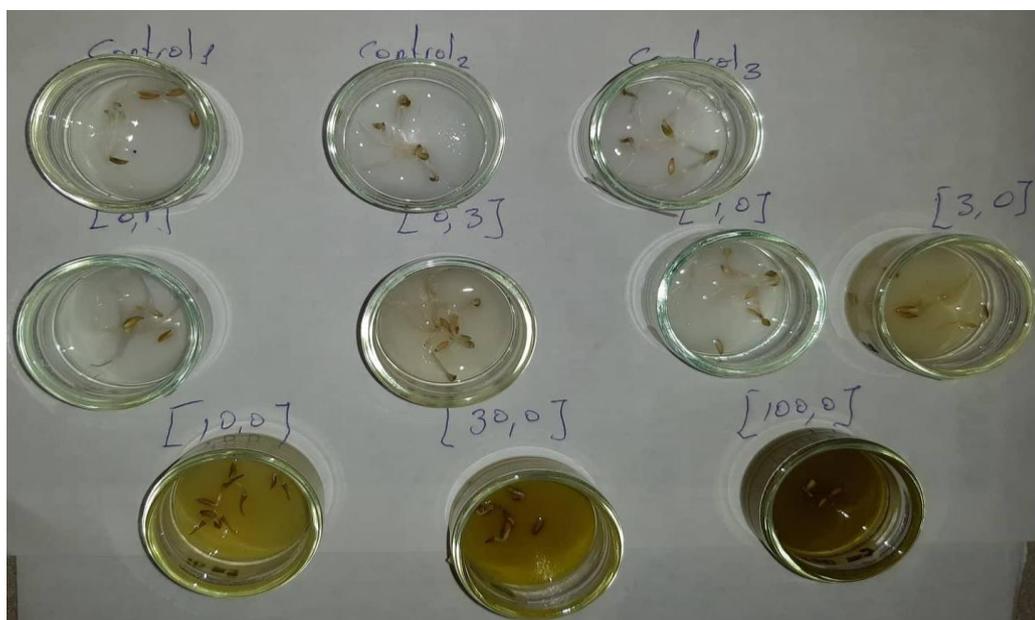




Figura 16: Dilución del extracto etanólico de hojas de *Rubus robustus* C. presl. Fuente: autor.



Clasificación Taxonómica de la Zarzamora.



VICERRECTORADO DE
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

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



100 años
Museo de
Historia
Natural
UNMSM
Celebrando el centenario

“Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad”

CONSTANCIA N° 187-USM-2019

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 (rama fértil) recibida de **Normalinda Correa Yajahuanca, y José Luis Collavino Cajahuamán**; estudiante de la Universidad Interamericana para el Desarrollo; ha sido estudiada y clasificada como: ***Rubus robustus C. Presl.*** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ROSIDAE

ORDEN: ROSALES

FAMILIA: ROSACEAE

GENERO: *Rubus*

ESPECIE: *Rubus robustus C. Presl.*

Nombre vulgar: “Zarzamora”
Determinado por Mag. Asunción A. Cano y Paúl Gonzales

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

Lima, 30 de mayo de 2019



MUSEO DE HISTORIA NATURAL
Herbario San Marcos - USM
JEFE



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

ACE/ylr

Anexo F: Juicio De Expertos

FICHA DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO POR JUICIO DE EXPERTOS

I. DATOS GENERALES

- 1.1 Apellidos y nombres del experto: VILCA TORRES MARIANEA
 1.2 Grado académico: Exp. Farmacia Hospitalaria
 1.3 Cargo e institución donde labora: DF - Asistencial
 1.4 Título de la Investigación: Evaluación de la actividad Antioxig. Citotóxica del extracto etimológico de Rubus Rubus
 1.5 Autor del instrumento: Normalinda Conza Yajahuana
 1.6 Nombre del instrumento: Hoja de Rubus Rubus

INDICADORES	CRITERIOS CUALITATIVOS/CUANTITATIVOS	Deficiente 0-20%	Regular 21-40%	Buena 41-60%	Muy Buena 61-80%	Excelente 81-100%
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje apropiado.					✓
2. OBJETIVIDAD	Está expresado en conductas observables.				✓	
3. ACTUALIDAD	Adecuado al alcance de ciencia y tecnología.					✓
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.					✓
5. SUFICIENCIA	Comprende los aspectos de cantidad y calidad.					✓
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para valorar aspectos del estudio.					✓
7. CONSISTENCIA	Basados en aspectos Teóricos-Científicos y del tema de estudio.					✓
8. COHERENCIA	Entre los índices, indicadores, dimensiones y variables.					✓
9. METODOLOGIA	La estrategia responde al propósito del estudio.					✓
10. CONVENIENCIA	Genera nuevas pautas en la investigación y construcción de teorías.					✓
SUB TOTAL						
TOTAL						

VALORACION CUANTITATIVA (Total x 0.20): 20

VALORACION CUALITATIVA:

OPINIÓN DE APLICABILIDAD:

Lugar y fecha: 18-03-20

Firma y Pos firma del experto

DNI: 28303957

FICHA DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO POR JUICIO DE EXPERTOS

I. DATOS GENERALES

- 1.1 Apellidos y nombres del experto: MATTA MINAYA, SILVIA AMPARO
 1.2 Grado académico: ESP. FARMACIA HOSPITALARIA
 1.3 Cargo e institución donde labora: D. FARMACÉUTICO ASISTENCIAL - Hospital Virgen Llanco Herrera
 1.4 Título de la Investigación: Evaluación de Actividad Antioxidante y Citotoxicidad del Extracto Etanólico de Hojas de *Acacia Roburifolia* C. Presl. (Ceanothaceae)
 1.5 Autor del instrumento:
 1.6 Nombre del instrumento:

INDICADORES	CRITERIOS CUALITATIVOS/CUANTITATIVOS	Deficiente 0-20%	Regular 21-40%	Bueno 41-60%	Muy Bueno 61-80%	Excelente 81-100%
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje apropiado.					100%
2. OBJETIVIDAD	Está expresado en conductas observables.					100%
3. ACTUALIDAD	Adecuado al alcance de ciencia y tecnología.					100%
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.					100%
5. SUFICIENCIA	Comprende los aspectos de cantidad y calidad.					100%
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para valorar aspectos del estudio.					100%
7. CONSISTENCIA	Basados en aspectos Teóricos-Científicos y del tema de estudio.					100%
8. COHERENCIA	Entre los índices, indicadores, dimensiones y variables.					100%
9. METODOLOGIA	La estrategia responde al propósito del estudio.					100%
10. CONVENIENCIA	Genera nuevas pautas en la investigación y construcción de teorías.					100%
SUB TOTAL						
TOTAL						

VALORACION CUANTITATIVA (Total x 0.20): 20

VALORACION CUALITATIVA:

OPINIÓN DE APLICABILIDAD:

Lugar y fecha: LIMA, 22-04-2020

Silvia Amparo Matta Minaya

Firma y Pos firma del experto

DNI: 1.002.48.716

FICHA DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO POR JUICIO DE EXPERTOS

I. DATOS GENERALES

- 1.1 Apellidos y nombres del experto: Silva Rodriguez Paula
 1.2 Grado académico: ESP Farmacia Hospitalaria
 1.3 Cargo e institución donde labora: C.F. Asistencial - Almagro Hospital Victoria Larco H.
 1.4 Título de la Investigación: Evaluación de actividad antioxidante y citotóxica del extracto etanólico de hojas de Rubus lobatus (C. Presl.)
 1.5 Autor del instrumento: Correa y otros
 1.6 Nombre del instrumento: Juicio de Expertos

INDICADORES	CRITERIOS CUALITATIVOS/CUANTITATIVOS	Deficiente 0-20%	Regular 21-40%	Bueno 41-60%	Muy Bueno 61-80%	Excelente 81-100%
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje apropiado.					100%
2. OBJETIVIDAD	Está expresado en conductas observables.					100%
3. ACTUALIDAD	Adecuado al alcance de ciencia y tecnología.					100%
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.					100%
5. SUFICIENCIA	Comprende los aspectos de cantidad y calidad.					100%
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para valorar aspectos del estudio.					100%
7. CONSISTENCIA	Basados en aspectos Teóricos-Científicos y del tema de estudio.					100%
8. COHERENCIA	Entre los índices, indicadores, dimensiones y variables.					100%
9. METODOLOGIA	La estrategia responde al propósito del estudio.					100%
10. CONVENIENCIA	Genera nuevas pautas en la investigación y construcción de teorías.					100%
SUB TOTAL						100%
TOTAL						100%

VALORACION CUANTITATIVA (Total x 0.20): 100%
 VALORACION CUALITATIVA: EXCELENTE
 OPINIÓN DE APLICABILIDAD: APLICA

Lugar y fecha: LIMA 15-03-20

[Firma]
 Firma y Pos firma del experto
 DNI: 2.574.2490