



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA**



**Efecto antioxidante *in vitro* del extracto acuoso de *Averrhoa*  
*carambola* L. sobre la concentración de malondialdehído en  
eritrocitos humanos intoxicados con fluoruro de sodio.**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADA EN:  
BIOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. Ciencias Biológicas Jimena Beatriz Jiménez Salcedo**

**Lambayeque – Perú  
2018**

**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA**

**Efecto antioxidante *in vitro* del extracto acuoso de *Averrhoa*  
*carambola* L. sobre la concentración de malondialdehído en  
eritrocitos humanos intoxicados con fluoruro de sodio.**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL  
DE LICENCIADA EN:  
BIOLOGÍA**

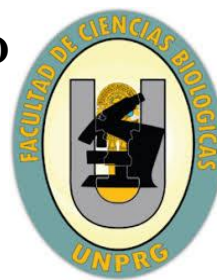
**PRESENTADO POR:**

**Bach. Ciencias Biológicas Jimena Beatriz Jiménez Salcedo**

**Lambayeque – Perú  
2018**



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA**



**Efecto antioxidante *in vitro* del extracto acuoso de *Averrhoa carambola* L. sobre la concentración de malondialdehído en eritrocitos humanos intoxicados con fluoruro de sodio.**

**Aprobado por:**

**Dr. Pedro Jorge Chimoy Effio**

\_\_\_\_\_  
**Presidente**

**MSc. José Teodoro Reupo Periche**

\_\_\_\_\_  
**Secretario**

**Lic. Julio César Silva Estela**

\_\_\_\_\_  
**Vocal**

**Dra. Ana María del Socorro Vásquez del Castillo**

\_\_\_\_\_  
**Asesora**

**Lambayeque – Perú**  
**2018**

## DEDICATORIA

A mis padres, César P. Jiménez Rivera y Marlene Salcedo Díaz por su sacrificio y esfuerzo por brindarme los recursos necesarios para darme una carrera, por creer en mi capacidad y sobre todo por su apoyo incondicional y paciencia.

A mis hermanas Romina y Stefanny por sus palabras de aliento para seguir adelante y perseverar en el desarrollo de este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica y creyeron en mí en todo momento.

A mi hermana Stefanny por su apoyo y contribución para que esta tesis llegue a su culminación.

A mi hermana Romina por sus sugerencias y observaciones, siempre inteligentes y oportunas.

Al profesor Guillermo Delgado Paredes por facilitarme el uso de los instrumentos y materiales de laboratorio, a Cecilia por su amabilidad y cooperación que, de forma altruista y desinteresada, han apoyado el desarrollo de esta investigación.

Al profesor Fupuy Chung Jorge por su apoyo y orientación en el desarrollo estadístico de esta investigación.

## CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.. .....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	xiv
I. MARCO TEÓRICO.....	17
1.1 Antecedentes de la investigación.....	17
1.2 Base teórica.....	20
1.2.1 <i>Averrhoa carambola</i> L. ....	20
1.2.2 Principios activos del fruto de <i>Averrhoa carambola</i> L. ....	20
1.2.3 Peroxidación lipídica.....	21
1.2.4 Ensayo TBARS.....	23
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.1 Material.....	25
2.1.1 Material biológico.....	25
2.1.2 Población y muestra.....	25
2.2 Métodos.....	25
2.2.1 Diseño de investigación .....	25
2.2.2 Obtención del extracto acuoso y preparación de las concentraciones de <i>Averrhoa carambola</i> L. ....	26
A. Obtención del extracto acuoso de <i>Averrhoa carambola</i> L. ....	26
B. Preparación de las concentraciones del extracto acuoso de <i>Averrhoa</i> <i>carambola</i> L. ....	27

2.2.3	Obtención de muestras sanguíneas.....	28
2.2.4	Incubación de eritrocitos.....	30
2.2.5	Obtención de fracción membranal.....	32
2.2.6	Determinación del malondialdehído.....	33
	A. Preparación de reactivos y muestra.....	33
	B. Preparación de la curva estándar .....	34
	C. Protocolo de ensayo.....	34
2.2.7	Análisis estadísticos de datos .....	36
III.	RESULTADOS.....	37
IV.	DISCUSIÓN.....	42
V.	CONCLUSIÓN.....	45
VI.	RECOMENDACIONES.....	46
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
VIII.	ANEXOS.....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Concentraciones en partes por millón (ppm) del extracto acuoso de <i>A. carambola L.</i> .....	28
<b>Tabla 2.</b> Preparación de MDA estándar.....	34
<b>Tabla 3.</b> Prueba t-student para muestras relacionadas entre los eritrocitos humanos intoxicados con 25 ppm de fluoruro de sodio (NaF) y los Grupos experimentales tratados con extracto acuoso de <i>A. carambola L.</i> a concentraciones de 1, 2.5 y 5 ppm.....	38
<b>Tabla 4.</b> Análisis de varianza de la concentración de MDA en $\mu\text{M}$ de los Grupos experimentales tratados con extracto acuoso de <i>Averrhoa carambola L.</i> a 1, 2.5 y 5 ppm.....	40
<b>Tabla 5.</b> Prueba de Tukey de la concentración de MDA en $\mu\text{M}$ de los Grupos experimentales tratados con extracto acuoso de <i>Averrhoa carambola L.</i> a 1, 2.5 y 5 ppm .....	41
<b>Tabla 6.</b> Taxonomía de <i>Averrhoa carambola L.</i> .....	50
<b>Tabla 7.</b> Cantidades empleadas para la preparación de la solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS; NaCl al 0.9% en 0.01 M de buffer de fosfatos pH 7.0).....	56
<b>Tabla 8.</b> Cantidades empleadas para la preparación del amortiguador hipotónico de fosfatos (5P8; 5 mM de buffer de fosfatos pH 8).....	57
<b>Tabla 9.</b> Concentraciones en partes por millón (ppm) de fluoruro de sodio.....	59
<b>Tabla 10.</b> Análisis de varianza de la concentración de MDA $\mu\text{M}$ del Grupo control positivo a concentraciones de 5, 10 y 25 ppm.....	60
<b>Tabla 11.</b> Comparaciones múltiples por el método de Tukey de la concentración de MDA en $\mu\text{M}$ de los Grupos experimentales tratados con extracto acuoso de <i>A. carambola L.</i> a concentraciones de 1, 2.5 y 5 ppm .....	61



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la peroxidación lipídica. R• Radical libre, ROO• Radical peroxilo, ROOH hidroperóxido, AGPI Ácido Graso Poliinsaturado. Tomado de Londoño 2011.....	22
<b>Figura 2.</b> Aducto MDA-TBA. Tomado de Cell Biolabs, INC.....	23
<b>Figura 3.</b> Obtención del extracto acuoso de <i>A. carambola</i> L. a. Fruto maduro de <i>A. carambola</i> L. b. Cortado y pesado c. Triturado d. Filtrado e. Extracto crudo de <i>A. carambola</i> L.....	27
<b>Figura 4.</b> Preparación de las concentraciones del extracto acuoso de <i>A. carambola</i> L. a. Obtención del extracto seco b y c. A partir de la solución madre verter las cantidades calculadas para obtener las concentraciones 1, 2.5 y ppm y completar con agua destilada d. Almacenamiento de las concentraciones en frascos de vidrio de color ámbar.....	28
<b>Figura 5.</b> Obtención de muestras sanguíneas. a. Muestras sanguíneas después del proceso de centrifugación b. Eliminación de plasma y capa leucocitaria de cada muestra c. Obtención de eritrocitos d. Eritrocitos re suspendidos PBS 7.....	29
<b>Figura 6.</b> Incubación de eritrocitos. a. Tubos con 0.5 mL de paquete eritrocitario + 3 volúmenes de PBS pH 7 incubados por 10 minutos a 37 °C b. A cada tubo se agregó 10 µl. de paquete eritrocitario de la muestra respectiva + 10 µl. de las concentraciones correspondientes de NaF y extracto acuoso de <i>Averrhoa carambola</i> L. c,d,e,f y g. Incubación de las muestras por 3 horas a 37° C.....	31
<b>Figura 7.</b> Obtención de fracción membranal. a y b. Lisado de eritrocitos con un amortiguador hipotónico de fosfatos pH 8 c. Incubación de eritrocitos lisados por 15 minutos a 4 °C d. Proceso de centrifugación de eritrocitos lisados a 6 000 rpm por 20 minutos.....	32
<b>Figura 8.</b> Componentes del kit colorimétrico OxiSelect™ TBARS assay kit (MDA Quantitation), CellBiolabs, Inc.....	33
<b>Figura 9.</b> Determinación de Malondialdehído a. Incubación de muestras estándar y desconocidas a 95 °C durante 60 minutos b. Muestras estándar en baño de hielo por 5 minutos c. Tubos de muestra estándar antes de ser centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos e. Lectura de absorbancia de MDA a 532 nm.....	35
<b>Figura 10.</b> Curva de calibración de malondialdehído (MDA).....	37

<b>Figura 11.</b> Gráfico de barras de las medias de MDA en $\mu\text{M}$ de las concentraciones de 5, 10 y 25 ppm NaF y del Grupo control negativo.....	39
<b>Figura 12.</b> Gráfico de barras de las medias de MDA en $\mu\text{M}$ entre el Grupo control positivo con los Grupos experimentales.....	41
<b>Figura 13.</b> Fruto de <i>Averrhoa carambola</i> L. Tomado de Flor de Planta 2016.....	50
<b>Figura 14.</b> Planta de <i>Averrhoa carambola</i> L. Tomado de Jardineriaon 2016.....	50
<b>Figura 15.</b> Preparación de PBS pH 7 y 5P8 pH 8 a. Sales inorgánicas: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (izquierda), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (intermedio) y NaCl (derecha) b. Pesado de las sales c. Vertiendo las sales en un beaker de 1000 mL d. Disolución de las sales en un agitador magnético f. Ajustando el pH del PBS pH =7 y 5P8 pH= 8 g. Almacenamiento del PBS y 5P8 en botellas de plástico.....	55
<b>Figura 16.</b> Preparación de las concentraciones de Fluoruro de sodio. a. Agregar 0.28 g NaF y completar con agua destilada hasta 1000 mL para obtener la solución madre b. Disolución del NaF empleando un agitador magnético c ,d, e y f. A partir de la solución madre se obtiene las concentraciones de 5, 10 y 25 ppm de NaF en 100 mL de agua destilada, los cuales fueron almacenados en un matraz aforado de 100 mL respectivamente para su posterior uso.....	58

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Averrhoa carambola</i> L.....	50
<b>Anexo 2.</b> Diagrama de obtención del extracto acuoso de <i>Averrhoa carambola</i> L.....	51
<b>Anexo 3.</b> Consentimiento informado para extracción de sangre.....	52
<b>Anexo 4.</b> Flujograma del protocolo de ensayo para la cuantificación de malondialdehído.....	54
<b>Anexo 5.</b> Preparación de solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS; NaCl al 0.9% en 0.01 M de buffer de fosfatos pH 7.0) y amortiguador hipotónico de fosfatos (5P8; 5 mM de buffer de fosfatos pH 8).....	55
<b>Anexo 6.</b> Tabla 7.....	56
<b>Anexo 7.</b> Tabla 8.....	57
<b>Anexo 8.</b> Preparación de concentraciones de Fluoruro de sodio (NaF) a concentraciones de 5, 10 y 25 ppm.....	58
<b>Anexo 9.</b> Tabla 9.....	59
<b>Anexo 10.</b> Tabla 10.....	60
<b>Anexo 11.</b> Tabla 11.....	61

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto antioxidante *in vitro* del extracto acuoso de *Averrhoa carambola* L. sobre la concentración de malondialdehído (MDA) en eritrocitos humanos intoxicados con fluoruro de sodio (NaF). Para este propósito, los eritrocitos humanos se incubaron a concentraciones de 25 ppm de NaF suplementado a concentraciones de 1, 2.5 y 5 ppm de extracto acuoso de *A. carambola* L. respectivamente. Los resultados demostraron que los eritrocitos incubados a concentraciones crecientes de 5, 10 y 25 ppm de NaF tenían una mayor concentración de MDA. La presencia de extracto acuoso de *A. carambola* L. revirtió parcialmente los efectos tóxicos de NaF en los eritrocitos, demostrando así su efecto antioxidante; manifestando una reducción significativa sobre la concentración del MDA. Se observó una mayor disminución de la concentración de MDA conforme se incrementaba la concentración del extracto acuoso de *A. carambola* L. siendo la concentración de 5 ppm de extracto acuoso de *A. carambola* L. la que causó una mayor disminución de MDA, alcanzando un promedio de 0,641  $\mu$ M con respecto a la concentración de 1 ppm que tuvo una menor disminución en la concentración de MDA con un promedio de 0,788  $\mu$ M.

**Palabras clave:** efecto antioxidante, extracto acuoso, *Averrhoa carambola* L., MDA, NaF, estrés oxidativo.

## ABSTRACT

The objective of this work was to determine the *in vitro* antioxidant effect of aqueous extract of *Averrhoa carambola* L. on the concentration of malondialdehyde (MDA) in human erythrocytes intoxicated with sodium fluoride (NaF). For this purpose, the human erythrocytes were incubated to concentrations of 25 ppm of NaF supplemented at concentrations of 1, 2.5 and 5 ppm of aqueous extract of *A. carambola* L. respectively. The results showed that erythrocytes incubated at increasing concentrations of 5, 10 and 25 ppm of NaF had a higher concentration of MDA. The presence of aqueous extract of *A. carambola* L. partially reversed the toxic effects of NaF in erythrocytes, demonstrating its antioxidant effect; manifesting a significant reduction in the concentration of MDA.

A greater decrease in the concentration of MDA was observed as the concentration of the aqueous extract of *A. carambola* L. increased, with the concentration of 5 ppm of aqueous extract of *A. carambola* L. causing a greater decrease of MDA, reaching an average of 0,641  $\mu\text{M}$  with respect to the concentration of 1 ppm that had a smaller decrease in the concentration of MDA with an average of 0,788  $\mu\text{M}$ .

**Key words:** antioxidant effect, aqueous extract, *Averrhoa carambola* L., MDA, NaF, oxidative stress.

## INTRODUCCIÓN

La fluorosis es una condición de intoxicación en los seres humanos por fluoruro (aguda o crónica), constituyendo un serio problema de salud pública en algunas partes del mundo en donde existen altas concentraciones de fluoruros en el agua cuya procedencia es natural; como en India, Pakistán, Oeste de África, Tailandia, China, Sudáfrica, entre otros (Beltrán, 2012), o de procedencia artificial, siendo el fluoruro de sodio (NaF) la principal fuente de fluoruro en el agua para consumo humano o en los alimentos, los cuales pueden aportar más de 1 ppm (partes por millón) de flúor (F), siendo la dosis recomendada por la OMS de 1 ppm (Gutiérrez et al., 2011), cuyo uso sigue vigente en la promoción de la salud para la disminución de la prevalencia e incidencia de caries a nivel mundial (Gutiérrez, & Morales, 2006).

En la situación antes mencionada, la intoxicación por fluoruro puede causar alteraciones en los sistemas músculo esquelético, nervioso, digestivo y hematopoyético; cuya exposición en cantidades superiores a 1 ppm de NaF produce en los eritrocitos, tanto *in vivo* como *in vitro*, diversas alteraciones metabólicas (Gutiérrez et al., 2011).

Los eritrocitos son utilizados como modelo celular en las investigaciones de estrés oxidativo, debido a que su membrana y enzimas antioxidantes que posee, son sensibles a la oxidación por los radicales libres; siendo el malondialdehído (MDA) uno de los productos finales de degradación que se forman en la peroxidación lipídica (PL) de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de las membranas celulares, molécula ampliamente utilizada como marcador de daño oxidativo de lípidos (Alvarado et al., 2005).

El estrés oxidativo caracterizado por la producción excesiva de radicales libres derivados del oxígeno (RLO) es uno de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el daño celular por flúor, por su alta reactividad química, alterando las principales macromoléculas de la célula, provocando trastornos generales en el metabolismo intermedio, lo que genera una variedad de cambios fisiológicos (anisocitosis, alteración de la permeabilidad de la membrana

celular) y bioquímicos (inhibición de enzimas asociadas con la producción de energía, el transporte membranar) los cuales ocasionan el deterioro y muerte celular (Gutiérrez et al., 2011).

Para combatir el estrés oxidativo se dispone de algunos compuestos producidos por las células (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa), o de manera exógena obtenidos a partir de nutrientes o suplementos con alto nivel de antioxidantes. Estos compuestos inhiben y neutralizan los RLO, induciendo la prevención y reparación de los daños causados a nivel celular. Por lo tanto, estos compuestos reducen y previenen el cáncer, las enfermedades degenerativas, entre otros (Londoño, 2011).

En este sentido, numerosos estudios reportaron la utilidad de la pulpa de tamarindo, semillas de *Moringa oleifera*, extractos de corteza de *Terminalia arjuna*, la proteína 43 kD aislada de *Cajanus indicus*, quercetina y curcumina, entre otros, en la reducción del estrés oxidativo inducido por el fluoruro de sodio y mejoras en las funciones del hígado, riñones y eritrocitos (Vasant, & Narasimhacharya, 2014).

Así mismo se tiene conocimiento que *Averrhoa carambola L.* una fruta de la gran variedad que se consumen en el Perú, presenta capacidad antioxidante, debido a la presencia de principios activos con un alto contenido de compuestos fenólicos, y en menor proporción vitamina C, vitamina A, vitamina E y flavonoides que (Saghir, Sadikun, Khaw, & Murugaiyah, 2013) que actúan inhibiendo y neutralizando los RLO, acción que podría ser importante para la protección e incremento de la resistencia de los eritrocitos al estrés oxidativo inducido por el fluoruro de sodio.

Por lo anteriormente expuesto se formuló la siguiente pregunta: ¿Tiene efecto antioxidante *in vitro* el extracto acuoso de *Averrhoa carambola L.* sobre la concentración de malondialdehído en eritrocitos humanos intoxicados con fluoruro de sodio?

Considerando que el extracto acuoso de *Averrhoa carambola* L. tiene efecto antioxidante *in vitro* sobre la concentración de malondialdehído en eritrocitos humanos intoxicados con fluoruro de sodio.

Se planteó la presente investigación con el objetivo de determinar el efecto antioxidante *in vitro* del extracto acuoso de *Averrhoa carambola* L. sobre la concentración de malondialdehído en eritrocitos humanos intoxicados con fluoruro de sodio.



## I. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes de la investigación

Lim, & Lee (2013), investigaron la capacidad y el contenido antioxidante de la fruta verde y madura de *Averrhoa carambola* L., reportando que la capacidad antioxidante del fruto aumentó significativamente con la maduración y que la cáscara de la fruta de *A. carambola* L. madura contenía mayor polifenoles, flavanoles y contenido de ácido ascórbico que la cáscara de fruta de *A. carambola* L. verde. Además, las capacidades antioxidantes de la cáscara fueron mayores que la pulpa. Sobre la base de estos resultados consideraron a la fruta *A. carambola* L. madura como fuente potencial de antioxidantes naturales.

Saghir, Sadikun, Khaw, & Murugaiyah (2013), proporcionaron un resumen sobre estudios recientes de las actividades farmacológicas y los estudios clínicos sobre *A. carambola* L. Las investigaciones farmacológicas determinaron la capacidad de actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antifúngicas, antitumorales y antiulcerosas. Además, indicaron que la planta posee efectos hipocolesterolémicos, hipoglucémicos, hipotensores, nefrotóxicos, neurotóxicos, inotrópicos negativos y cronotrópicos. Las investigaciones fitoquímicas demostraron la presencia de saponinas, taninos, alcaloides y flavonoides.

See Wan, Ramasamy & Rahmat (2013), determinaron y compararon la composición nutricional, el contenido fenólico total, el flavonoide total, la capacidad antioxidante y las vitaminas antioxidantes de *Averrhoa bilimbi* y carambola *Averrhoa carambola* L. El contenido fenólico total fue mayor en *A. carambola* L. aunque *A. bilimbi* produjo más flavonoide total. Los contenidos de vitaminas A, C y E de *A. bilimbi* también fueron más altos que la *A. carambola* L. La actividad antioxidante y depuradora según lo determinado por el ensayo de blanqueo de  $\beta$ -caroteno de *A. carambola* L. fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores a *A.*

*bilimbi*. Estos resultados sugirieron que la carambola era un alimento antioxidante natural potente y que la contribución de los compuestos fenólicos a su capacidad antioxidante era mayor que la de las vitaminas antioxidantes.

Noor, & Noriham (2014), evaluaron la actividad antioxidante, el contenido total de flavonoides y el contenido fenólico total de los extractos de frutas de dos tipos de *A. carambola* L. y dos tipos de bilimbí, indicando que los cuatro tipos de frutos de Oxalidaceae utilizados en este estudio tienen el potencial como antioxidante natural, debido a la presencia de compuestos fenólicos en las frutas.

Singh, Sharma, & Goyal (2014), concluyeron que el extracto etanólico del fruto de *A. carambola* L. tiene un papel profiláctico contra la carcinogénesis hepática inducido por dietilnitrosamina / tetracloruro de carbono (DENA / CCl<sub>4</sub>) en ratones suizos albinos; poniendo en manifiesto una reducción significativa de la peroxidación lipídica, junto con una elevación en las actividades de los antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa), antioxidante no enzimático (glutatión reducido), y proteínas totales.

Singh, Sharma, & Goyal (2014), en un estudio posterior investigaron la capacidad del extracto etanólico del fruto de *A. carambola* L. para reducir el estrés oxidativo inducido por dietilnitrosamina / tetracloruro de carbono (DENA / CCl<sub>4</sub>) y hepato-carcinogénesis en ratones albinos suizos, cuya administración de extracto de fruta con el tratamiento con DENA / CCl<sub>4</sub> redujo significativamente la peroxidación de lípidos y aumentó las actividades de glutatión reducido, catalasa y superóxido dismutasa en ratones.

Vasant, & Narasimhacharya (2014), reportaron que el fruto de *Averrhoa carambola* L. en polvo, en la dieta de ratas albinas intoxicados con diferentes dosis de fluoruro de sodio, redujo significativamente la peroxidación lipídica del tejido hepático y renal, siendo 10 g / 100 g la dosis más potente en la mejora de las alteraciones metabólicas inducidas por fluoruro en comparación con 2,5 y 5 g / 100 g de dosis; lo que puso de manifiesto las propiedades antihiperlipidémicas y antiaterogénicas del fruto de *A. carambola* L.

Tanzia (2015), determinó que el extracto metanólico del fruto de *A. carambola* L. posee propiedades antioxidantes, confirmando la presencia de alcaloides, flavonoides, fenólicos, carbohidratos, saponinas, taninos en el extracto metanólico de *A. carambola* L. como indicadores de la actividad antioxidante.

Pitroda, & Sachdeva (2016), proporcionaron evidencia experimental de que el extracto hidroalcohólico de *A. carambola* L. posee propiedades antioxidantes que protegen al corazón contra el infarto de miocardio (IM) inducido por isoproterenol (ISO) en ratas, disminuyendo los niveles de las enzimas séricas de biomarcadores cardíacos troponina-T cardíaca (cTn-T), la creatinina quinasa (CK-MB) y la lactato dehidrogenasa 1 (LDH1) aumentando los niveles de las enzimas antioxidantes glutatión (GSH), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD); y del malondialdehído (MDA) en homogeneizado de tejido cardíaco.

Pham et al., (2017), investigaron los efectos beneficiosos del extracto acuoso del fruto de *A. carambola* L. sobre la hiperglucemia, la hiperlipidemia y la lesión renal en ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina (STZ). Los resultados indicaron una disminución significativa en la hiperglucemia, la hiperlipidemia, e inhibió la progresión de la nefropatía diabética (DN),

y las expresiones de proteínas relacionadas tales como el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) y el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1).

## **1.2 Base teórica**

### **1.2.1 *Averrhoa carambola* L.**

La *Averrhoa carambola* L. o “carambola” es una planta originaria de Asia que se ha aclimatado a muchos países tropicales, perteneciente a la familia de las oxalidáceas, en el Perú se extiende debajo de los 1 200 m.s.n.m, de la costa a la Amazonía. La planta es de crecimiento lento, presenta tallo múltiple con tronco corto y crece de 6 a 9 m de altura. Presenta inflorescencias cortas, axilares con pétalos purpúreos o violáceos (Anexo 1).

Los frutos son bayas gruesas indehiscentes de 5 a 8 cm, azucarada y ácida, de color verde oscuro cuando no están maduras; pero las frutas se vuelven de color amarillo cuando están completamente maduras. Usualmente son carnosas con 5 crestas longitudinales o ángulos (Muthu, Lee, Phua, & Bhore, 2016).

Desde tiempos inmemoriales, todo el árbol de carambola se usa como medicina tradicional. Las propiedades medicinales incluyen actividades antiinflamatorias, analgésicas, hipotensoras, antihelmínticas, antioxidantes, antiulcerosas, hipocolesterolémicas e hipolipidémicas, antimicrobianas y antitumorales (Hitesh, & Tejpal, 2016).

### **1.2.2 Principios activos del fruto de *Averrhoa carambola* L.**

Los estudios fitoquímicos de Saghir, Sadikun, Khaw, & Murugaiyah (2013) han demostrado que el fruto de carambola es una rica fuente de antioxidantes naturales como compuestos fenólicos ( $1296.25 \pm 14.74$  mg GAE/100 g peso seco), como vitamina C ( $120.74 \pm 0.46$  mg/100 g peso seco), vitamina A ( $27.61 \pm 0.90$  mg/100 g peso seco), vitamina E ( $7.34 \pm 0.01$  mg/100 g peso seco) y flavonoides ( $66.64 \pm 13.41$  mg rutina/100 g peso seco) que participan en la inhibición y neutralización de radicales libres derivados de oxígeno (RLO).

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas: lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperoxidos orgánicos. Asociado a esto, se ha visto que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2; al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa y superóxido dismutasa (Escamilla, Cuevas & Guevara, 2009).

Las vitaminas C y E, así como la A, clasifican como antioxidantes interruptores, porque actúan interrumpiendo la reacción en cadena de formación de radicales libres. El mecanismo de acción de la vitamina C la sitúa en un nivel antioxidante de alta jerarquía, pues incluye la inhibición de la formación de radicales superóxidos, además, es el agente que reduce los radicales fenoxilo formados durante la actividad vitamínica E, restableciéndola (Benítez, 2006).

### **1.2.3 Peroxidación lipídica**

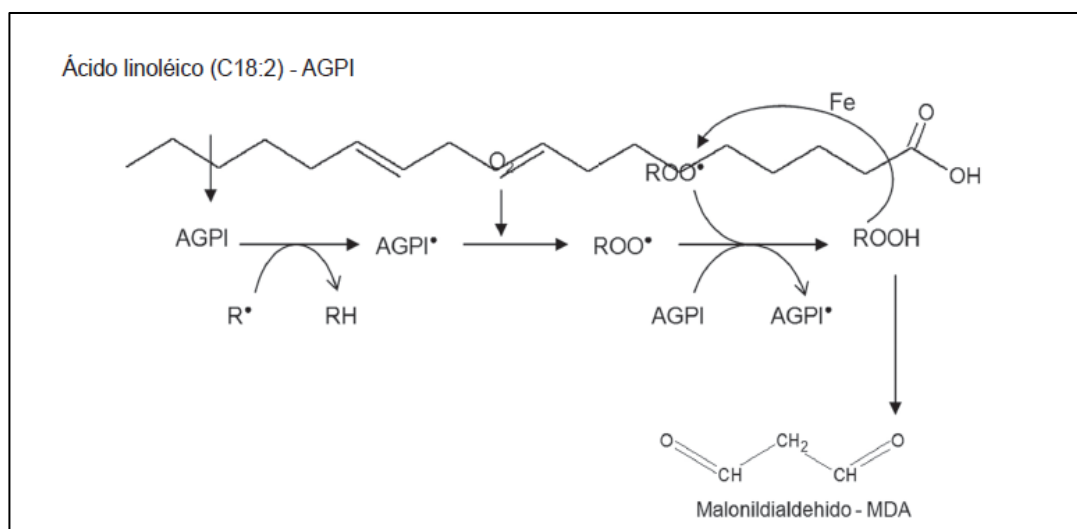
Es un proceso de oxidación de ácidos grasos polinsaturados (PUFAs o AGPI), se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina, propagándose de esta manera hasta la formación de numerosos subproductos, como el malondialdehído (MDA), cuya determinación en tejidos, plasma u orina es uno de los métodos de evaluar el estrés oxidativo (Londoño, 2011).

Debido a la susceptibilidad conferida por su estructura química (enlaces dobles cis separados por un metileno alílico), los PUFAs son blancos sensibles de los radicales libres, pudiendo producir lesiones en las membranas celulares y lipoproteínas. El daño que puede producir en las membranas celulares es la alteración de su permeabilidad conduciendo al edema y la muerte celular y en las lipoproteínas puede generar la oxidación de la LDL, génesis de la placa ateromatosa (Londoño, 2011).

En Londoño (2011), se describe las etapas que cursan en el proceso de peroxidación lipídica, las cuales son: iniciación, propagación - rompimiento, y terminación (Figura 1).

En la iniciación, el radical libre ataca al sustrato oxidable (biomolécula), generando el radical alquilo que reacciona rápidamente con oxígeno para producir un radical más reactivo llamado peroxilo.

Seguido de una etapa rápida de propagación y rompimiento, en la cual se da la reacción en cadena o peroxidación lipídica propiamente dicha, siendo los radicales peroxilo los propagadores de la reacción en cadena, pudiendo oxidar otros lípidos u moléculas susceptibles produciendo hidroperóxidos, los cuales, en presencia de metales de transición como hierro o cobre, se degradan para producir un amplio rango de compuestos entre alcoholes, aldehídos, alquil formiatos, cetonas y RL incluyendo radical alcóxido. Los aldehídos más importantes producidos son los 4 hidroxialquenos (principalmente 4-hidroxinonenal y 4-hidroxihexanal) y MDA. Y finalmente seguido de una etapa de terminación en la cual se genera la combinación de radicales para formar productos no radicalarios.

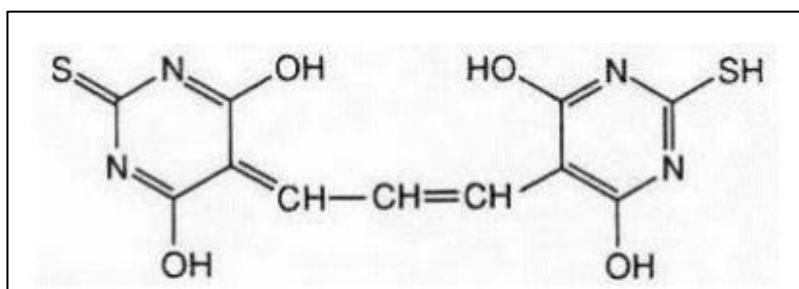


**Figura 1.** Representación esquemática de la peroxidación lipídica.  $R^\bullet$  Radical libre,  $ROO^\bullet$  Radical peroxilo,  $ROOH$  hidroperóxido, AGPI Ácido Graso Poliinsaturado. Tomado de Londoño 2011.

### 1.2.4 Ensayo TBARS

Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) es un ensayo establecido para detectar y controlar la peroxidación lipídica. El protocolo rápido y fácil ha sido modificado por los investigadores en la evaluación de medicamentos, alimentos, así como muestras de tejidos humanos y animales. El MDA forma un aducto 1: 2 con ácido tiobarbitúrico (Figura 2). El aducto MDA-TBA formado a partir de la reacción de MDA en muestras con TBA se puede medir colorimétricamente o fluorométricamente. Los niveles de TBARS se determinan a partir de un estándar de equivalencia de malondialdehído ["OxiSelect™ TBARS Assay Kit (MDA Quantitation)", n.d.].

El Ensayo TBARS ha proporcionado información relevante sobre la actividad de radicales libres en estados de enfermedad y la medición de muchas características antioxidantes de compuestos. Aunque la especificidad de TBARS hacia compuestos distintos de MDA ha sido controvertida, el ensayo continúa siendo el más utilizado para el control de la peroxidación lipídica. El Kit OxiSelect™ TBARS Assay ofrece un sistema simple, reproducible y consistente para la detección de peroxidación lipídica en orina, plasma, suero, lisados y homogeneizados tisulares. Este kit incluye un estándar de MDA para usar como control positivo, proporcionando reactivos suficientes para realizar 200 pruebas que incluyen curva estándar y muestras desconocidas ["OxiSelect™ TBARS Assay Kit (MDA Quantitation)", n.d.].



**Figura 2.** Aducto MDA-TBA. Tomado de Cell Biolabs, INC.

Los valores disponibles en la literatura de concentraciones medias de MDA en personas aparentemente sanas son muy variables. Uno realizado por Bermúdez et al. (2000) reportaron una concentración media de 1,87  $\mu\text{M}$ . realizado a 15 personas. Gutiérrez et al., (2009) establecen una concentración media de 3,69  $\mu\text{M}$  realizado a 34 personas (25-40 años de edad). Una explicación a la diferencia en los valores medios y a la alta dispersión de resultados es la variabilidad interindividual indicativa del diferente contenido en sistemas antioxidantes debido entre otros factores a la edad, sexo, dieta, estrés, herencia, hábito de fumar o no, etc., pero también a variables metodológicas como a la utilización de diferentes derivados del MDA, problemas relacionados con el muestreo y a las limitaciones propias de cada método (Melgarejo, Balanza, Torrez, Quisberth & Suzaño, 2017).



## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Material biológico

El material biológico estuvo constituido por frutos de *Averrhoa carambola* L. “carambola” maduras, obtenidas en la sección de frutas del mercado Modelo de Chiclayo del departamento de Lambayeque.

#### 2.1.2 Población y muestra

La población la conformaron los eritrocitos humanos.

La muestra estuvo constituida por 05 muestras de eritrocitos humanos los cuales fueron incubados a concentración de 25 ppm de fluoruro de sodio suplementado con 1, 2.5 y 5 ppm de extracto acuoso de *A. carambola* L. respectivamente y sometidos a un tiempo de exposición de 3 horas, considerándose dos repeticiones, obteniéndose un total de 30 unidades experimentales.

05 eritrocitos humanos x 3cc x 1 tiempo específico = 15 muestras

15 muestras x 2 repeticiones = 30 Unidades experimentales

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Diseño de Investigación

Se utilizó el diseño experimental de estímulo creciente, en el cual los grupos experimentales fueron los eritrocitos humanos incubados a concentración de 25 ppm de fluoruro de sodio los que fueron enfrentados con el estímulo de 1, 2.5 y 5 ppm de extracto acuoso del fruto de *A. carambola* L. en un determinado tiempo (3 horas).

Los eritrocitos humanos se dividieron en los siguientes grupos de estudio:

**Grupo I: Control negativo.-** Eritrocitos incubados sin: fluoruro de sodio y extracto acuoso de *A. carambola* L.

**Grupo II: Control positivo.-** Eritrocitos incubados con concentraciones crecientes de 5, 10 y 25 ppm de fluoruro de sodio.

**Grupo III: Grupo experimental .-** Eritrocitos incubados a 25 ppm de fluoruro de sodio suplementado con 1, 2.5 y 5 ppm de extracto acuoso de *A. carambola L.* respectivamente.

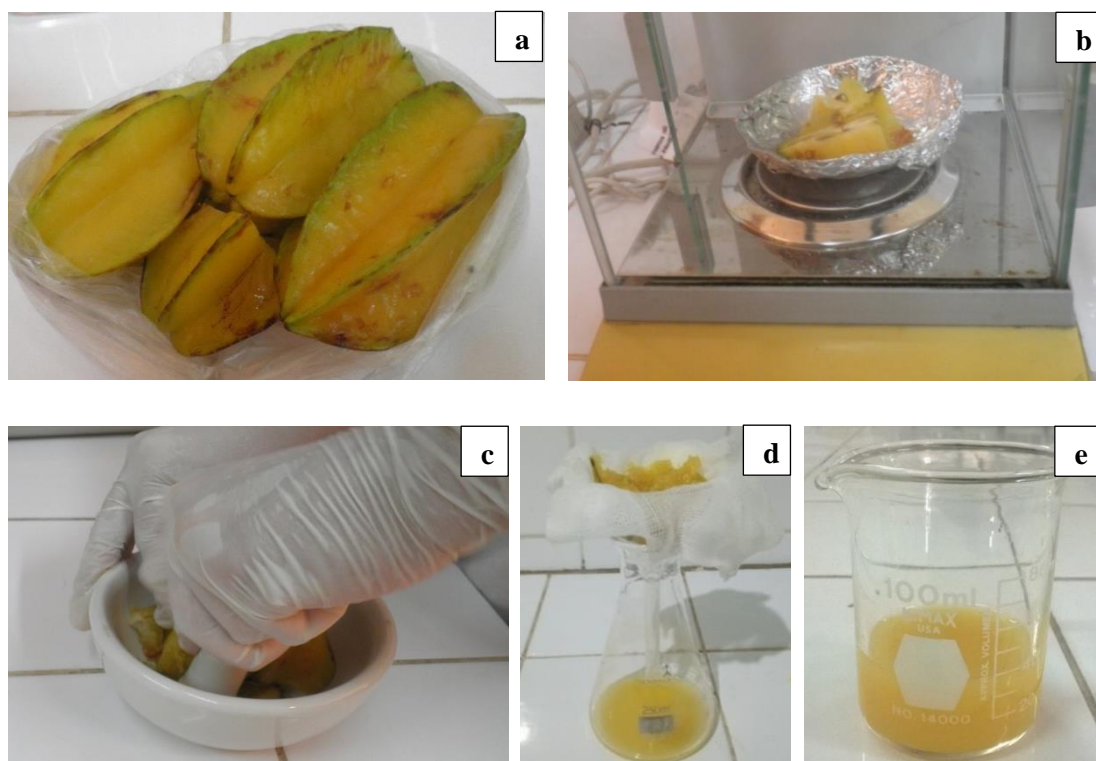
### **2.2.2 Obtención del extracto acuoso y preparación de las concentraciones de *Averrhoa carambola L.***

Los frutos de *A. carambola L.* maduras fueron adquiridas en el mercado Modelo de Chiclayo, para luego proceder a preparar el extracto acuoso siguiendo el método de Castillo, Castillo, & Huamán (2013) y de Oliveira (2014).

#### **A. Obtención del extracto acuoso de *Averrhoa carambola L.***

Se procedió a seleccionar los frutos que presentaron buen estado y a descartar los que presentaron signos de alteración o deterioro como ruptura u oscurecimiento. Posteriormente los frutos se lavaron en forma manual, con agua potable y bajo fricción, con el fin de eliminar los residuos de tierra existentes. Luego se cortó la fruta con un cuchillo de acero inoxidable estéril en pequeños pedazos para obtener mediante el pesado 50 g de fruto fresco, los cuales se trituraron haciendo uso de un mortero de porcelana estéril. Posteriormente el triturado se filtró con la ayuda de un embudo y gasa estéril, dejándolo reposar en un beaker de 100 mL por 20 minutos aproximadamente. El sobrenadante resultante se rescató y constituyó el extracto crudo de *A. carambola L.*

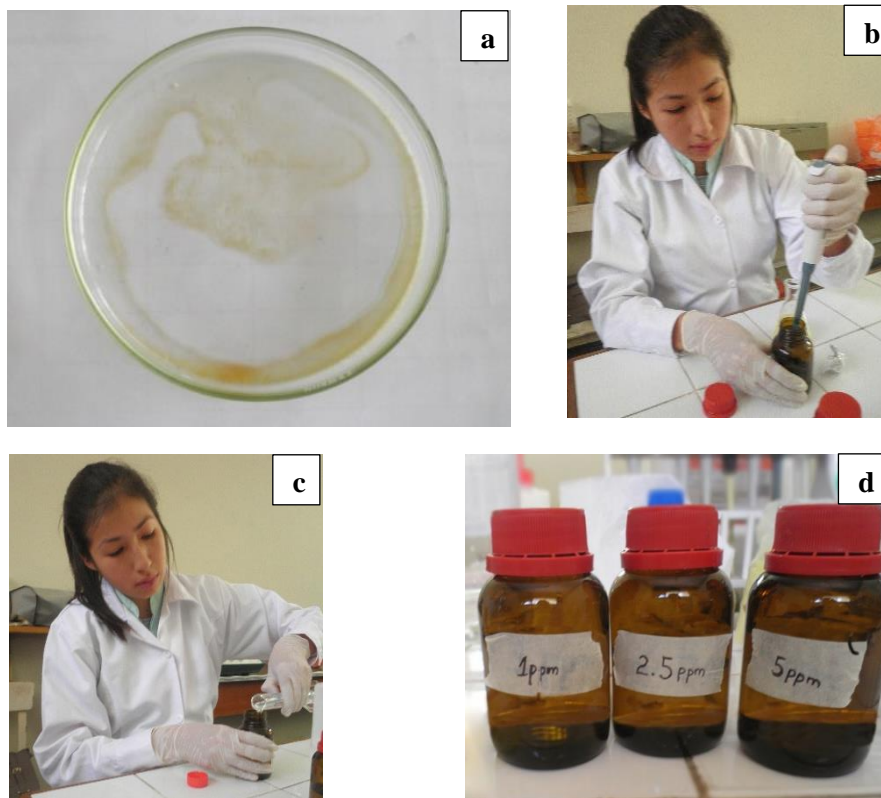
Se tomó 1 mL del extracto crudo *A. carambola L.*, se llevó al horno a 90°C por 20 minutos sobre una placa Petri hasta su solidificación para la obtención del extracto seco y se pesó en una balanza analítica para cuantificar la concentración en mg/mL (Anexo 2).



**Figura 3.** Obtención del extracto acuoso de *A. carambola* L.. a. Fruto maduro de *A. carambola* L. b. Cortado y pesado c. Triturado d. Filtrado e. Extracto crudo de *A. carambola* L.

### **B. Preparación de las concentraciones del extracto acuoso de *Averrhoa carambola* L.**

A partir de la concentración calculada (solución madre), se realizaron las concentraciones de 1, 2.5 y 5 ppm de *A. carambola* L. completando la solución con agua destilada, equivalentes a cada uno de los tratamientos de la investigación (Tabla 1), los cuales se almacenaron en frascos de vidrio de color ámbar hasta su utilización (Figura 4).



**Figura 4.** Preparación de las concentraciones del extracto acuoso de *A. carambola L.* a. Obtención del extracto seco b y c. A partir de la solución madre verter las cantidades calculadas para obtener las concentraciones 1, 2.5 y 5 ppm y completar con agua destilada d. Almacenamiento de las concentraciones en frascos de vidrio de color ámbar.

**Tabla 1**

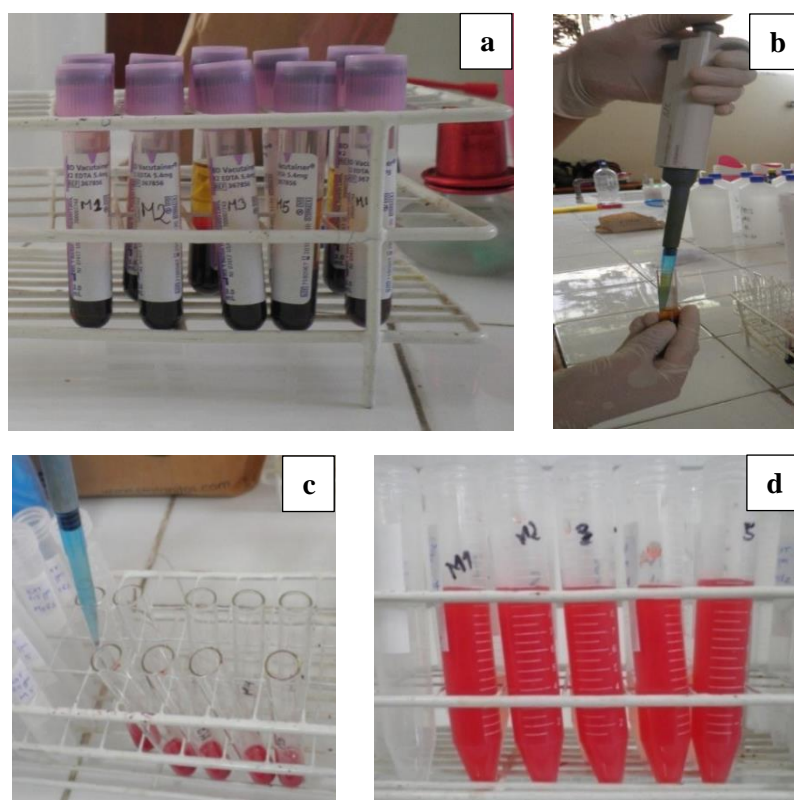
*Concentraciones en partes por millón (ppm) del extracto acuoso de A. carambola L.*

Concentración en ppm	Volumen ( $\mu$ L) de extracto acuoso	Volumen ( $\mu$ L) de agua destilada
1.0	1.0	4999.0
2.5	2.5	4997.5
5.0	5.0	4995.0

### 2.2.3 Obtención de muestras sanguíneas

Siguiendo el método de Gutiérrez et al., (2011), se obtuvieron las muestras sanguíneas (10 mL) después de firmar un acuerdo de consentimiento informado (Anexo 3), se tomó una sola muestra de sangre de individuos aparentemente sanos ( $n = 5$ ), mediante la técnica de venopunción, utilizando el sistema de vacío en tubos con anticoagulante EDTA. Estas fueron

centrifugadas a 2000 rpm x 15 minutos para así eliminar el plasma y la capa leucocitaria, y obtener los eritrocitos, estos fueron lavados 3 veces con 3 volúmenes de solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS; NaCl al 0.9% en 0.01 M de buffer de fosfatos pH 7, véase Anexo 5 y 6), por cada lavado cada muestra se centrifugó a 5000 rpm x 3 minutos, después de los lavados los eritrocitos fueron re suspendidos en PBS pH 7 para obtener una suspensión de eritrocitos de 50% de acuerdo con la técnica descrita, los cuales fueron utilizados para la incubación (Figura 5).



**Figura 5.** Obtención de muestras sanguíneas. a. Muestras sanguíneas después del proceso de centrifugación b. Eliminación de plasma y capa leucocitaria de cada muestra c. Preparación de una suspensión eritrocitaria al 50% d. Eritrocitos re suspendidos PBS pH 7.

#### 2.2.4 Incubación de eritrocitos

Los eritrocitos fueron incubados de acuerdo al método empleado por Gutiérrez et al., (2011 y 2013).

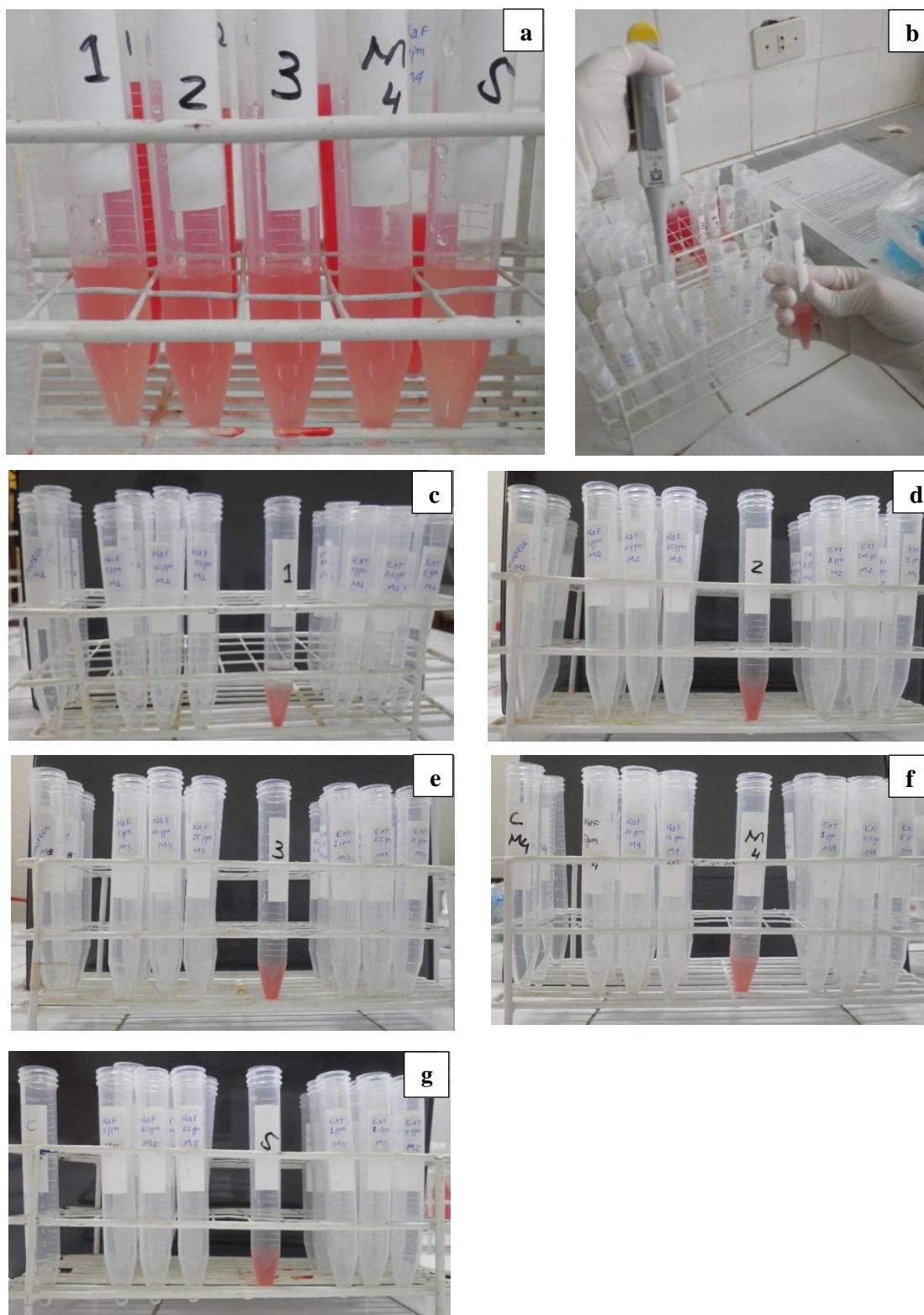
Se procedió como sigue: Por cada muestra se empleó un tubo de ensayo, en cada tubo se colocó 0.5 mL de paquete eritrocitario, luego se agregaron 3 volúmenes de PBS pH 7 y se incubaron por 10 minutos a 37° C, considerándose este tiempo como condiciones basales.

Al término de la incubación, se dividieron en los siguientes grupos de estudio: Grupo control positivo: Por cada muestra se utilizaron 3 tubos, se agregó a cada tubo de ensayo 200 µL. de paquete eritrocitario de la muestra respectiva y luego se añadió 40 µL. de las concentraciones correspondientes a 5, 10, 25 ppm de fluoruro de sodio (Anexo 8 y 9).

Grupo control negativo: se incubaron eritrocitos en las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente, pero sin la presencia del NaF y de extracto acuoso de *A. carambola L.* Para el Grupo experimental: Por cada muestra se utilizaron 3 tubos, se agregó a cada tubo de ensayo 200 µL. de paquete eritrocitario de la muestra respectiva y luego se añadió 40 µL. de las concentraciones correspondientes a 25 ppm de fluoruro de sodio suplementado con 40 µL. de 1, 2.5 y 5 ppm extracto acuoso de *A. carambola L.* respectivamente.

Luego se incubaron las muestras por 3 horas a 37° C; al finalizar fueron lavados 3 veces con PBS pH 7, como se describió anteriormente. El paquete eritrocitario resultante fue usado para la obtención de la fracción membranal.

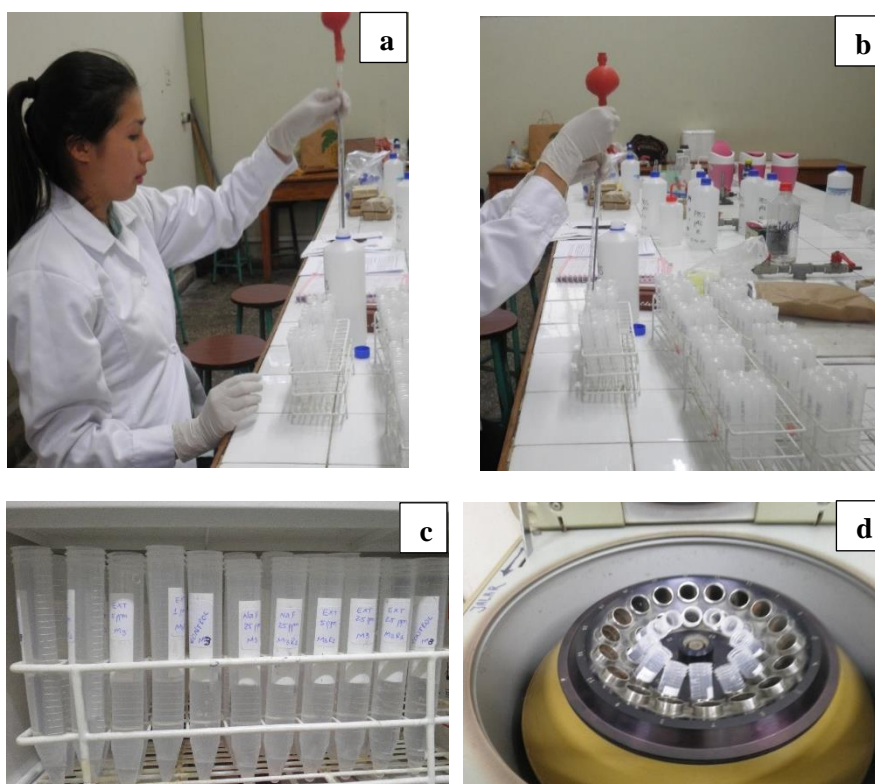




### 2.2.5 Obtención de fracción membranal

Acto seguido los eritrocitos fueron lisados de acuerdo con la técnica reportada por Gutiérrez et al., (2009).

Para la lisis se utilizó un amortiguador hipotónico de fosfatos (5P8; 5 mM de buffer de fosfatos pH 8, véase Anexo 5 y 7) y se procedió de la siguiente manera: Se cogió 1 volumen de paquete de eritrocitos de cada uno de los tubos de eritrocitos incubados de cada grupo de estudio y se vertieron en nuevos tubos respectivamente, luego se le agregaron 5 volúmenes de solución 5P8 y se agitó suavemente, dejando reposar por 15 minutos a 4°C. Luego el producto de la incubación se centrifugó a 6 000 rpm x 20 minutos. El sobrenadante se separó del sedimento. El sedimento fue recuperado considerándose la fracción membranal, el cual fue lavado 2 veces más con 5P8 y centrifugado a 6 000 rpm x20 minutos, para luego ser re suspendido en 250  $\mu$ L de PBS pH 7 hasta su utilización.



**Figura 7.** Obtención de fracción membranal. a y b. Lisado de eritrocitos con un amortiguador hipotónico de fosfatos pH 8 c. Incubación de eritrocitos lisados por 15 minutos a 4 °C d. Proceso de centrifugación de eritrocitos lisados a 6 000 rpm por 20 minutos.



### 2.2.6 Determinación del malondialdehído

La concentración del malondialdehído en membranas de eritrocitos se determinó usando el kit comercial colorimétrico OxiSelect™ TBARS assay kit (MDA Quantitation), CellBiolabs, Inc, siguiendo el protocolo del fabricante. La determinación de malondialdehído se basó en la detección espectrofotométrica a 532 nm utilizando un espectrofotómetro Jenway 6300, cuya concentración del malondialdehído se expresó en unidades de  $\mu\text{M}$ .



**Figura 8.** Componentes del kit colorimétrico OxiSelect™ TBARS assay kit (MDA Quantitation), CellBiolabs, Inc.

#### A. Preparación de reactivos

1. Diluyente ácido 1X TBA: Se diluyó el diluyente 2X TBA 1: 2 con agua destilada.
2. Solución de Lisis SDS: Se dejó reposar la solución a 37 ° C para disolver los cristales de SDS.
3. Reactivo Acido tiobarbitúrico (TBA): Se preparó el reactivo TBA justo antes del uso. Se pesó 117 mg de TBA y se agregó 22.5 ml de 1X TBA Diluyente ácido al reactivo de TBA, se mezcló vigorosamente hasta que el polvo se disolvió. Luego, se ajustó el pH de la solución a pH 3.5 con la solución de hidróxido de sodio.

### B. Preparación de la curva estándar

Se preparó una serie de diluciones de MDA estándar en el rango de concentración de 125  $\mu\text{M}$  - 0  $\mu\text{M}$  diluyendo el MDA estándar en agua destilada (Tabla 2). Los estándares se realizaron por duplicado.

**Tabla 2**  
*Preparación de MDA estándar*

Tubos	MDA estándar ( $\mu\text{L}$ )	Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )	MDA estándar ( $\mu\text{M}$ )
1	125 $\mu\text{L}$	875 $\mu\text{L}$	125
2	250 $\mu\text{L}$ del tubo N° 1	250 $\mu\text{L}$	62.5
3	250 $\mu\text{L}$ del tubo N° 2	250 $\mu\text{L}$	31.25
4	250 $\mu\text{L}$ del tubo N° 3	250 $\mu\text{L}$	15.63
5	250 $\mu\text{L}$ del tubo N° 4	250 $\mu\text{L}$	7.81
6	250 $\mu\text{L}$ del tubo N° 5	250 $\mu\text{L}$	3.91
7	250 $\mu\text{L}$ del tubo N° 6	250 $\mu\text{L}$	1.95
8	250 $\mu\text{L}$ del tubo N° 7	250 $\mu\text{L}$	0.98
9	0 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	0.0

### C. Protocolo de ensayo

1. En un tubo de ensayo estéril se agregó 100  $\mu\text{L}$  de cada tubo que contiene la fracción membranal de cada grupo de estudio (muestras desconocidas) y 100  $\mu\text{L}$  de MDA estándar preparados para la curva estándar.
2. Se agregó 100  $\mu\text{L}$  de la Solución de Lisis (SDS) tanto a las muestras desconocidas como a los MDA estándar. Luego se mezcló e incubó las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Se agregó 250  $\mu\text{L}$  de reactivo TBA a cada muestra desconocida y estándar.

4. Luego se tapó cada tubo y se incubó a 95 °C durante 60 minutos.
5. Se retiró los tubos y se dejó enfriar a temperatura ambiente en un baño de hielo durante 5 minutos.
6. Posteriormente se procedió a centrifugar todos los tubos a 3000 rpm durante 15 minutos.
7. Medida espectrofotométrica: Se transfirió 200  $\mu$ L de los MDA estándar y muestras desconocidas a una cubeta y se llevó al espectrofotómetro.
8. Finalmente se leyó la absorbancia a 532 nm.



**Figura 9.** Determinación de Malondialdehído. a. Incubación de muestras estándar y desconocidas a 95 °C durante 60 minutos b. Muestras estándar en baño de hielo por 5 minutos c. Tubos de muestra estándar antes de ser centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos e. Lectura de absorbancia de MDA a 532 nm.

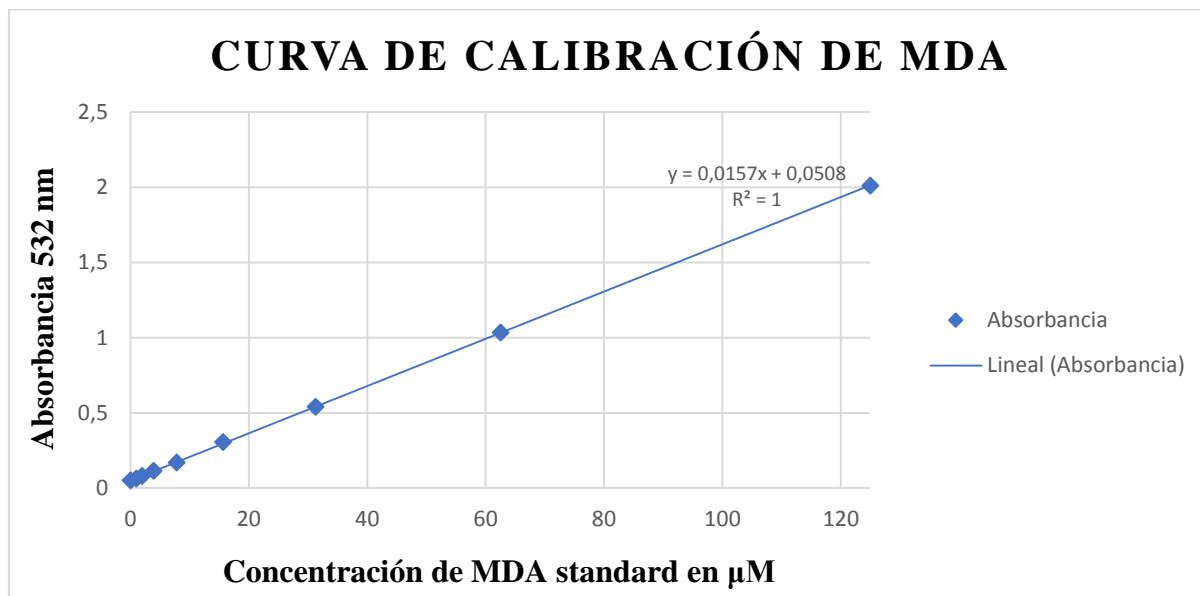
### **2.2.7 Análisis estadísticos de datos**

Se utilizó el programa de Microsoft Excel 2016 para la generación de la curva de calibración y el programa estadístico SPSS versión 23 para el análisis estadístico en donde se realizó la comparación entre los valores de los grupos de estudio: Grupo control negativo, Grupo control positivo a concentraciones de 5, 10 y 25 ppm de NaF y Grupo experimental tratados con extracto acuoso de *Averrhoa carambola L.* a concentraciones de 1, 2.5 y 5 ppm, empleando la prueba t-student para muestras relacionadas y el test de ANOVA de un factor, así como las comparaciones múltiples entre los grupos mediante la prueba de Tukey, con la finalidad de determinar qué grupos en específico presentaron diferencias significativas.

### III. RESULTADOS

El objetivo de la investigación fue determinar el efecto antioxidante *in vitro* del extracto acuoso de *Averrhoa carambola L.* a 1, 2.5 y 5 ppm sobre 05 muestras de eritrocitos humanos intoxicados con fluoruro de sodio, lo cual se evidenció por la concentración de malondialdehído (MDA).

Se elaboró una curva de calibración con diluciones de concentraciones conocidas de MDA estándar en el rango de 125  $\mu\text{M}$  - 0  $\mu\text{M}$  siguiendo el protocolo del kit, midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro a 532 nm, y se graficó la absorbancia vs la concentración de MDA estándar, con el fin de determinar la concentración de MDA en  $\mu\text{M}$  de las diferentes muestras de cada grupo de estudio de la investigación: Grupo control negativo, Grupo control positivo y Grupo experimental tratados con extracto acuoso de *A. carambola L.* (Figura 10).



**Figura 10.** Curva de calibración de malondialdehído (MDA) estándar en el rango de concentraciones de 125  $\mu\text{M}$  - 0  $\mu\text{M}$ .

Según la prueba t-student para muestras relacionadas, se observó que existen diferencias significativas en el antes y después del estímulo entre los eritrocitos humanos intoxicados con fluoruro de sodio (NaF) y los Grupos experimentales tratados con extracto acuoso de *A. carambola L.* a concentraciones de 1, 2.5 y 5 ppm, rechazando la hipótesis nula de igualdad de

medias, con un nivel de significancia  $P < 0.05$  ( $P = 0,000$ ) en todas las muestras emparejadas, lo que demuestra que las concentraciones del extracto acuoso de *Averrhoa carambola L.* influyeron significativamente en los eritrocitos intoxicados con NaF (Tabla 3).

### Hipótesis:

**H<sub>0</sub>**= Las medias en la concentración de MDA son iguales antes y después del tratamiento

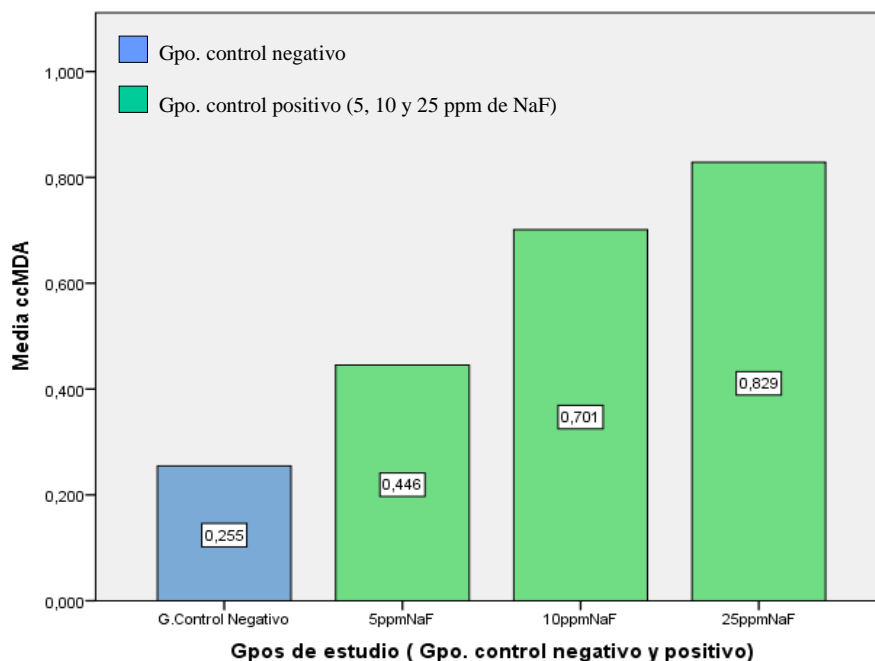
**H<sub>1</sub>**= No todas las medias en la concentración de MDA son iguales antes y después del tratamiento

**Tabla 3**

*Prueba t-student para muestras relacionadas entre los eritrocitos humanos intoxicados con 25 ppm de fluoruro de sodio (NaF) y los Grupos experimentales tratados con extracto acuoso de A. carambola L. a concentraciones de 1, 2.5 y 5 ppm.*

Prueba de muestras emparejadas				
		t	gl	Sig. (bilateral)
Par 1	25ppmNaF - 1ppmEA	9,982	9	,000
Par 2	25ppmNaF - 2.5ppmEA	109,119	9	,000
Par 3	25ppmNaF - 5ppmEA	8,868	9	,000

La figura 11 muestra que el Grupo control positivo expuesto a concentraciones crecientes de 5, 10 y 25 ppm de NaF en comparación con el Grupo control negativo presentó un aumento estadísticamente significativo en la concentración de MDA según el análisis estadístico ANOVA siendo las diferencias de medias significativa a  $P = 0,000$ ;  $P < 0,05$  véase Anexo 10. La concentración media de MDA del Grupo control negativo fue de  $0,255 \mu\text{M}$ , mientras que las concentraciones medias del Grupo control positivo para las concentraciones a 5, 10 y 25 ppm de NaF fue de  $0,446 \mu\text{M}$ ,  $0,701 \mu\text{M}$  de MDA y  $0,829 \mu\text{M}$  respectivamente.



**Figura 11.** Medias de MDA en  $\mu\text{M}$  de las concentraciones de 5, 10 y 25 ppm NaF y del Grupo control negativo.

Según el análisis estadístico ANOVA, se observó que los Grupos experimentales tratados con extracto acuoso de *Averrhoa carambola L.* a concentraciones de 1, 2.5 y 5 ppm presentan un nivel de significancia  $P < 0.05$ , rechazando la hipótesis nula de igualdad de medias, por lo tanto, indica que no todas las medias comparadas son iguales, lo que demuestra que las concentraciones de extracto acuoso de *A. carambola L.* influyeron significativamente sobre la concentración del MDA en eritrocitos intoxicados con NaF ( $F = 4,091$ ;  $P = 0,028$ ;  $P < 0,05$ ; véase Tabla 4 y Anexo 11).

### Hipótesis:

**H<sub>0</sub>**= 1 ppm = 2.5 ppm = 5 ppm

**H<sub>1</sub>**= No todas las medias tratadas con extracto acuoso de *A. carambola L.* son iguales

**Tabla 4**

*Análisis de varianza de la concentración de MDA en  $\mu\text{M}$  de los Grupos experimentales tratados con extracto acuoso de *Averrhoa carambola* L. a 1, 2.5 y 5 ppm.*

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,126	2	,063	4,091	,028
Dentro de grupos	,417	27	,015		
Total	,544	29			

Según la prueba de Tukey, los eritrocitos incubados a concentración de 25 ppm de NaF enfrentados con el estímulo a concentraciones de 1, 2.5 y 5 ppm de extracto acuoso de *A. carambola* L. respectivamente, produjeron una disminución estadísticamente significativa en la concentración de MDA (Tabla 5).

La concentración de MDA en  $\mu\text{M}$  en la membrana de eritrocitos humanos tratados con el extracto acuoso de *A. carambola* L. a 1, 2.5 y 5 ppm, demostró estadísticamente que el Grupo experimental de 2.5 y 5 ppm forma un grupo homogéneo cuyas medias no difieren significativamente ( $P=0,081$ ) en la concentración de MDA. Al igual que con el Grupo experimental 1 y 2.5 ppm cuyas medias tampoco presentan diferencias significativas ( $P=0,912$ ) en la concentración de MDA. Sin embargo, se observa que existe diferencias significativas en las medias entre el Grupo experimental 1 ppm y 5 ppm, cuyas diferencias significativas se corroboran en el cuadro de comparaciones múltiples con un valor de  $P = 0,034$  (Anexo 11).

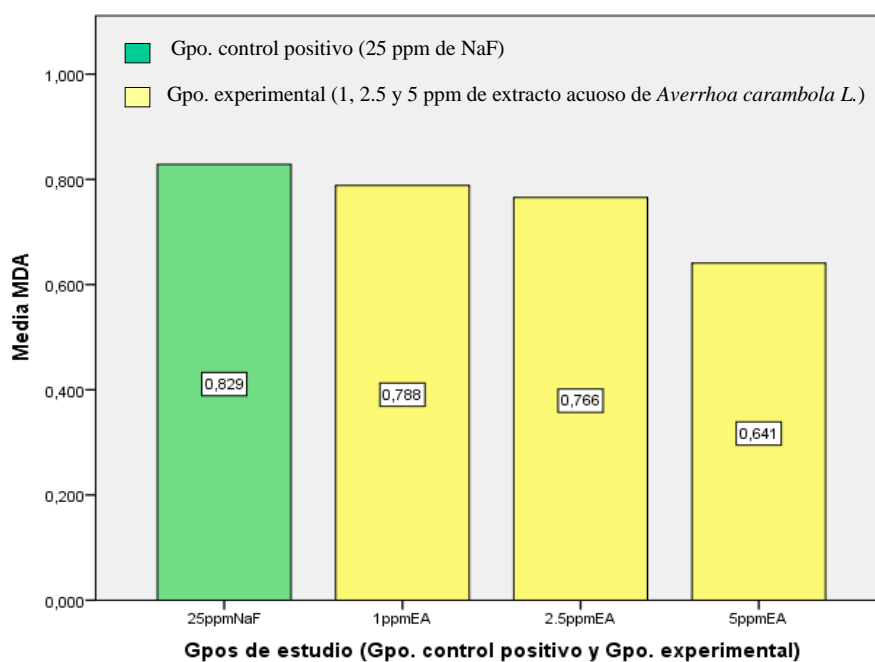


**Tabla 5**

*Prueba de Tukey de la concentración de MDA en  $\mu\text{M}$  de los Grupos experimentales tratados con extracto acuoso de *Averrhoa carambola* L. a 1, 2.5 y 5 ppm.*

MDA			
HSD Tukey <sup>a,b</sup>			
G.EXPERIMENTALES	N	Subconjunto	
		1	2
5ppmEA	10	,641	
2.5ppmEA	10	,766	,766
1ppmEA	10		,788
Sig.		,081	,912

Estos resultados indican que hubo una mayor disminución de la concentración de MDA conforme se incrementaba la concentración del extracto acuoso de *Averrhoa carambola* L. teniendo en cuenta las medias de las concentraciones de MDA, siendo la concentración de 5 ppm de extracto acuoso de *A. carambola* L. la que tuvo una mayor disminución, alcanzando una media de 0,641  $\mu\text{M}$ , con respecto a la concentración de 1 ppm de extracto acuoso de *A. carambola* L. que tuvo una menor disminución sobre la concentración de MDA con una media de 0,788  $\mu\text{M}$ . (Figura 12).



**Figura 12.** Medias de MDA en  $\mu\text{M}$  entre el Grupo control positivo con los Grupos experimentales.

#### IV. DISCUSIÓN

En el presente estudio la exposición de los eritrocitos a concentraciones de 5, 10 y 25 ppm de NaF dio como resultado un incremento en la concentración de MDA, obteniendo concentraciones medias de 0,446  $\mu\text{M}$ , 0,701  $\mu\text{M}$  de MDA y 0,829  $\mu\text{M}$  respectivamente, en comparación con la concentración media de MDA del Grupo control que fue de 0,255  $\mu\text{M}$ , lo que indica estrés oxidativo por fluoruro, confirmando hallazgos anteriores de la investigación realizada por Gutiérrez et al., (2013) reportando que la concentración media de MDA para 7 ppm NaF fue de 0,389  $\mu\text{M}$ , y que la concentración media de MDA a 100 ppm de NaF alcanzó 0,823  $\mu\text{M}$  en comparación con la media de MDA del Grupo control que fue de 0,093  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, los resultados obtenidos en la presente investigación discrepan de los resultados reportados por Gutiérrez et al., (2013), esta divergencia en concreto, se debe al diferente contenido de los sistemas antioxidantes de cada individuo, debido a factores como la edad, el tipo de alimentación, los hábitos, entre otros; además de la utilización de diferentes derivados del MDA en la estandarización del método (Melgarejo, Balanza, Torrez, Quisberth & Suzaño, 2017).

El daño *in vitro* en las membranas de los eritrocitos se previno parcialmente por el efecto antioxidante del extracto acuoso de *Averrhoa carambola L.* En este sentido Lim, & Lee (2013), Saghir, Sadikun, Khaw, & Murugaiyah (2013), See Wan, Ramasamy & Rahmat (2013), Noor, & Noriham (2014) y Tanzania (2015) demostraron que este efecto se debe a la capacidad antioxidante inherente de la fruta, debido a la presencia de principios activos tales como compuestos fenólicos, vitamina A, vitamina C, vitamina E, flavonoides y otros constituyentes fitoquímicos presentes en el fruto, en donde la contribución de los compuestos fenólicos a su capacidad antioxidante es mayor que la de las vitaminas antioxidantes; inhibiendo y neutralizando los RLO como los peróxidos e hidroperóxidos.

El efecto antioxidante en la presente investigación se evidenció en los eritrocitos expuestos a concentración de 25 ppm de NaF tratados a concentraciones de 1, 2.5 y 5 ppm de extracto acuoso de *Averrhoa carambola* L. respectivamente, manifestando una disminución estadísticamente significativa en la concentración de MDA.

Los resultados demuestran que el extracto acuoso de *A. carambola* L. produce una disminución “dosis dependiente” sobre la concentración de MDA, es decir, que la disminución es mayor conforme se incrementa la cantidad de extracto acuoso de *A. carambola* L. al medio de incubación, esto se explica debido a la relación directamente proporcional entre la concentración del extracto y la concentración de principios activos presentes (a mayor cantidad de extracto acuoso de *A. carambola* L., mayor cantidad de principios activos tales como compuestos fenólicos, vitamina A, vitamina C, vitamina E, flavonoides, entre otros); siendo 5 ppm de extracto acuoso de *A. carambola* L. la más potente para mejorar las alteraciones metabólicas inducidas por NaF en comparación con 1 y 2.5 ppm de extracto; una observación similar a la investigación de Vasant, & Narasimhacharya (2014) quienes reportaron que la inclusión de *A. carambola* L. en polvo en la dieta de ratas intoxicadas con NaF, redujo significativamente la concentración de MDA del tejido hepático y renal de una manera dependiente de la dosis, siendo 10 g/100 g la dosis más potente en comparación con 2,5 y 5 g / 100g de dosis.

Existen investigaciones *in vivo*, sobre el uso y los efectos antioxidante, hepatoprotector, hiperlipidemia, hiperglucemia, entre otros; del fruto de *A. carambola* L. empleando extractos hidroalcohólico, etanólico, metanólico y acuoso, en tejido cardíaco, hepático, renal, entre otros; pero ningún estudio que determine el efecto antioxidante del extracto acuoso de *A. carambola* L. en eritrocitos intoxicados por NaF, por lo que el empleo de extracto acuoso de *A. carambola*

*L.* puede ser una gran alternativa para la protección e incremento de la resistencia de los eritrocitos al estrés oxidativo intoxicados por NaF reduciendo el padecimiento de alteraciones metabólicas y en la población en general, para la promoción y/o conservación de su estado de salud y bienestar.

## CONCLUSIÓN

- El extracto acuoso *in vitro* de *Averrhoa carambola L.* tiene efecto antioxidante sobre la concentración de malondialdehído en eritrocitos humanos intoxicados con fluoruro de sodio, siendo la concentración de 5 ppm de extracto acuoso de *A. carambola L.* la dosis más potente.

## RECOMENDACIONES

- Realizar estudios *in vitro* con otros tipos de extractos con la finalidad de determinar si el efecto antioxidante es mayor o menor que el extracto acuoso de *Averrhoa carambola L.*
- Realizar estudios *in vivo* para determinar el efecto antioxidante del extracto acuoso de *A. carambola L.* sobre la concentración de malondialdehído en eritrocitos.
- Difundir las propiedades nutricionales del fruto de *A. carambola L.* para que los consumidores en general se beneficien de dichas propiedades.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, C., Álvarez, P., Guayerbas, N., Puerto, M., Jiménez, L., & de la Fuente, M. (2005). El daño peroxidativo en leucocitos peritoneales de ratones viejos disminuye si se suplementa la dieta con galletas enriquecidas con antioxidantes. Relación con la supervivencia. *Revista Española De Geriatria Y Gerontología: Órgano Oficial De La Sociedad Española De Geriatria Y Gerontología*, 40(6), 352.
- Beltrán, M. (2012). Investigar las consecuencias del efecto acumulativo del flúor, una necesidad imperante de la profesión odontológica. *Revista Colombiana De Investigación En Odontología*, 3(7).
- Benítez, D. (2006). Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed*, 25(2).
- Castillo, K., Castillo, E., & Huamán, J. (2013). Efecto de la *Averrhoa carambola* L. o “carambola” vs. gemfibrozilo sobre el perfil lipídico en *Rattus rattus* var *albinus*. *Acta Médica Peruana*, 30(3).
- Escamilla, C., Cuevas, E., & Guevara, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista De La Facultad De Medicina UNAM*, 52(2).
- Gutiérrez, J., & Morales, J. (2006). La ingesta de fluoruro de sodio produce estrés oxidativo en la mucosa bucal de la rata. *Revista Mexicana De Ciencias Farmacéuticas*, 37(3), 12.
- Gutiérrez, J., Cruz, L., Chima, M., García, L., & Pérez, J. (2009). Efecto de la ingestión de fluoruro de sodio en la concentración de malondialdehído y la actividad de enzimas antioxidantes en el eritrocito de rata. *Revista De Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 14(2), 71-72,76.
- Gutiérrez, J., Hernández, S., Carmona, R., Cruz, J., Olivares, A., & Lozada, I. et al. (2011). Efecto del fluoruro de sodio sobre enzimas antioxidantes en el eritrocito humano. *Revista Latinoamericana De Patología Clínica Y Medicina De Laboratorio*, 58(4), 216,219.
- Gutiérrez, J., García, L., Morales, J., Hernández, S., Ramírez, S., Núñez, N., & Madrigal, E. (2013). In Vitro Effect of Sodium Fluoride on Malondialdehyde Concentration and on

- Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase in Human Erythrocytes. *The Scientific World Journal*, 36(2), 2.
- Hitesh, K., & Tejpal, A. (2016). Starfruit: A fruit for healthy life. *Journal Of Pharmacognosy And Phytochemistry*, 5(3).
- Lim, Y., & Lee, S. (2013). In vitro Antioxidant Capacities of Star Fruit (*Averrhoa carambola*), an Underutilised Tropical Fruit. *Journal Of Biology*, 1(1).
- Londoño, J. (2011). *Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad* (pp. 145-147). Colombia. Recuperado en: <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/3/9.%20129-162.pdf>
- Melgarejo, I., Balanza, E., Torrez, L., Quisberth, S., & Suzaño, P. (2017). Concentración de malondialdehído en sujetos que residen a gran altitud: estudio exploratorio. *Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Pública*, 34(4), 679-680.
- Muthu, N., Lee, S., Phua, K., & Bhore, S. (2016). Nutritional, Medicinal and Toxicological Attributes of Star-Fruits (*Averrhoa carambola* L.): A Review. *National Center For Biotechnology Information*, 12(12).
- Noor, A., & Noriham, A. (2014). Antioxidant activity and bioactive components of *Oxalidaceae* fruit extracts. *The Malaysian Journal Of Analytical Sciences*, 18(1).
- Oliveira, G. (2014). *Capacidad antioxidante de Averrhoa carambola L. (carambola) frente a sistemas generadores de radicales libres* (Magister). Universidad Nacional Mayor De San Marcos
- OxiSelect™ TBARS Assay Kit (MDA Quantitation)*. Recuperado 3 enero 2018, de [https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-330-tbars-assay-kit\\_3.pdf](https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-330-tbars-assay-kit_3.pdf)
- Pham, H., Huang, W., Han, C., Li, J., Xie, Q., & We, J. et al. (2017). Effects of *Averrhoa carambola* L. (*Oxalidaceae*) juice mediated on hyperglycemia, hyperlipidemia, and its influence on regulatory protein expression in the injured kidneys of streptozotocin-induced diabetic mice. *American Journal of Translational Research*, 9(1).



- Pitroda, K., & Sachdeva, P. (2016). Evaluation Of Cardio Protective Effect Of *Averrhoa Carambola* Fruit In Isoproterenol Induced Myocardial Infarction In Rats. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, 7(7).
- Saghir, S., Sadikun, A., Khaw, K., & Murugaiyah, V. (2013). Star fruit (*Averrhoa carambola* L.): From traditional uses to pharmacological activities. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 12(3).
- See Wan, Y., Ramasamy, R., & Rahmat, A. (2013). A Comparative Assessment of Nutritional Composition, Total Phenolic, Total Flavonoid, Antioxidant Capacity, and Antioxidant Vitamins of Two Types of Malaysian Underutilized Fruits (*Averrhoa Bilimbi* and *Averrhoa Carambola*). *International Journal Of Food Properties*, 16(6).
- Singh, R., Sharma, J., & Goyal, PK. (2014a). Prophylactic Role of *Averrhoa carambola* (Star Fruit) Extract against Chemically Induced Hepatocellular Carcinoma in Swiss Albino Mice. *Advances In Pharmacological Sciences*.
- Singh, R., Sharma, J., & Goyal, P. (2014b). Chemopreventive and Antioxidative Effects of *Averrhoa carambola* (Star fruit) Extract against Diethylnitrosamine Induced Hepatocarcinogenesis. *Journal Of Cancer Biology And Treatment*, 1(3).
- Tanzia, A. (2015). *Evaluation of the antioxidant and in vitro cytotoxic activity of Averrhoa carambola, Aegle marmelos and Spondias pinnata leaf extracts* (Magister). BRAC University.
- Vasant, R., & Narasimhacharya, A. (2014). Antidotal activity of *Averrhoa carambola* (Star fruit) on fluoride induced toxicity in rats. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(2).

## ANEXOS

### Anexo 1. Clasificación taxonómica de *Averrhoa carambola* L.

**Tabla 6**

*Taxonomía de Averrhoa carambola* L.

	<b>Taxonomía</b>
<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Tracheophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Oxalidales
<b>Familia</b>	Oxalidaceae
<b>Genero</b>	<i>Averrhoa</i>
<b>Especie</b>	<i>Averrhoa carambola</i> L.

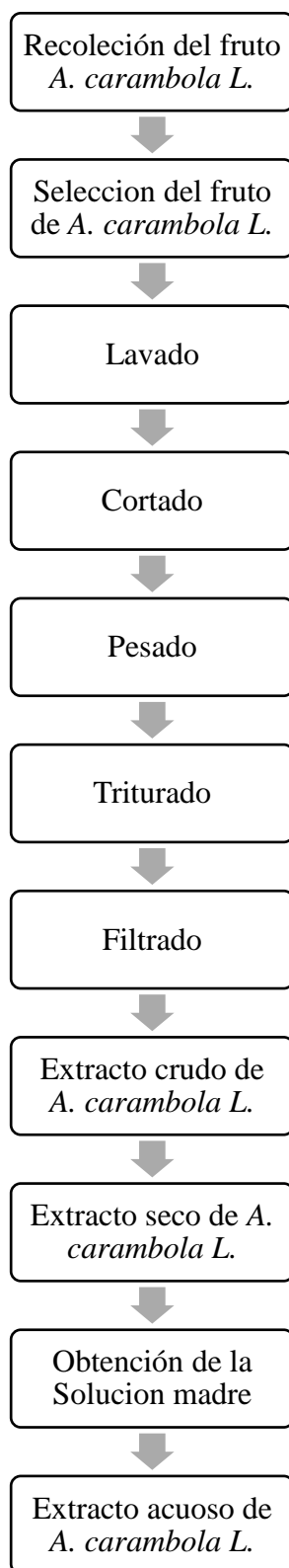
*Nota.* Tomado de Integrated Taxonomic Information System 2011.



**Figura 13.** Fruto de *Averrhoa carambola* L. Tomado de Flor de Planta 2016.



**Figura 14.** Planta de *Averrhoa carambola* L. Tomado de Jardineriaon 2016.

**Anexo 2.** Flujograma de obtención del extracto acuoso de *Averrhoa carambola L.*

### Anexo 3. Consentimiento informado para extracción de sangre

Fecha: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2017

Yo, \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ años de edad, identificado (a) con DNI N° \_\_\_\_\_, declaro que la Srta. Bachiller en Ciencias Biológicas Jimena B. Jiménez Salcedo me ha informado de manera precisa, clara y sencilla de los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre. He leído esta información que me ha entregado y que se reproduce a continuación:

#### INTRODUCCIÓN

Se solicita su participación en la toma de muestra de su sangre para la obtención de los eritrocitos, células que serán útiles para el desarrollo de la investigación, como indicadores de la peroxidación lipídica (mecanismo de daño celular que altera la permeabilidad de las membranas, conduciendo a la muerte celular), en la cual se aplicará diferentes tratamientos de extracto acuoso del fruto de *Averrhoa carambola* L. “carambola” con el fin de determinar el efecto antioxidante (útil en la eliminación de toxinas del cuerpo, con capacidad de neutralizar los radicales libres).

Este documento se le proporcionará para darle la información suficiente para que usted pueda entender los posibles riesgos y beneficios derivados de su participación en este proyecto y decida si desea participar o no en el mismo, ya que la participación es absolutamente voluntaria.

#### NATURALEZA Y OBJETIVO DEL PROYECTO

Los eritrocitos son utilizados como modelo celular en las investigaciones de estrés oxidativo (mecanismo fisiopatológico involucrado en el daño celular, que produce una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales ocasionan el deterioro y muerte celular), debido a que su membrana y enzimas antioxidantes son sensibles a la oxidación por los radicales libres derivados del oxígeno (RLO), moléculas inestables, extraordinariamente reactivas, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente con la diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos; éstas moléculas son elaboradas continuamente como un producto del metabolismo normal, al elevarse o disminuir las concentraciones de éstos puede acarrear importantes alteraciones funcionales; siendo el malondialdehído (MDA) un producto natural de la peroxidación lipídica (PL) de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de las membranas celulares. La peroxidación lipídica es un mecanismo de lesión celular tanto en plantas como en animales y se utiliza como indicador del estrés oxidativo en células y tejidos.

A pesar de que el análisis fitoquímico y las propiedades medicinales del fruto de *A. carambola* L. está bien documentado, no existen muchos estudios del papel del fruto en casos de eritrocitos humanos intoxicados con fluoruro de sodio, razón por la que se pretende determinar el efecto antioxidante *in vitro* del fruto de *A. carambola* L. sobre la concentración de malondialdehído en eritrocitos humanos intoxicados con fluoruro de sodio, cuya capacidad antioxidante podría ser importante para la protección e incremento de la resistencia de los eritrocitos al estrés oxidativo en personas intoxicadas por fluoruro de sodio reduciendo el

padecimiento de alteraciones metabólicas; y en la población en general, para la promoción y/o conservación de su salud.

#### TOMA DE MUESTRA

La toma de muestras de sangre se realizará en personas aparentemente sanas, se recomienda estar en ayuno mínimo de 8 horas con el fin de medir los niveles de malondialdehído de las membranas de los eritrocitos inducidos con fluoruro de sodio, sin las interferencias que provoca la ingesta de alimentos, siendo los lípidos uno de los parámetros que pueden variar después de comer; ésta se extraerá mediante la técnica de punción venosa (en el antebrazo), y será recolectada en tubos con anticoagulante EDTA.

#### RIESGOS

Los riesgos, aunque mínimos pueden ser: sangrado excesivo, mareos o desmayos como consecuencia del estrés en el proceso de la toma de muestras, presencia de hematoma que se resolverá sin tratamiento en las siguientes dos semanas. En ocasiones será necesario reintentar puncionar más de una vez debido a la dificultad para ubicar la vena. La cantidad total de sangre requerida no excederá los 15 mL y no representa riesgo para su salud, puesto que el volumen de sangre extraído se repondrá a las pocas horas, con la ingesta de líquidos.

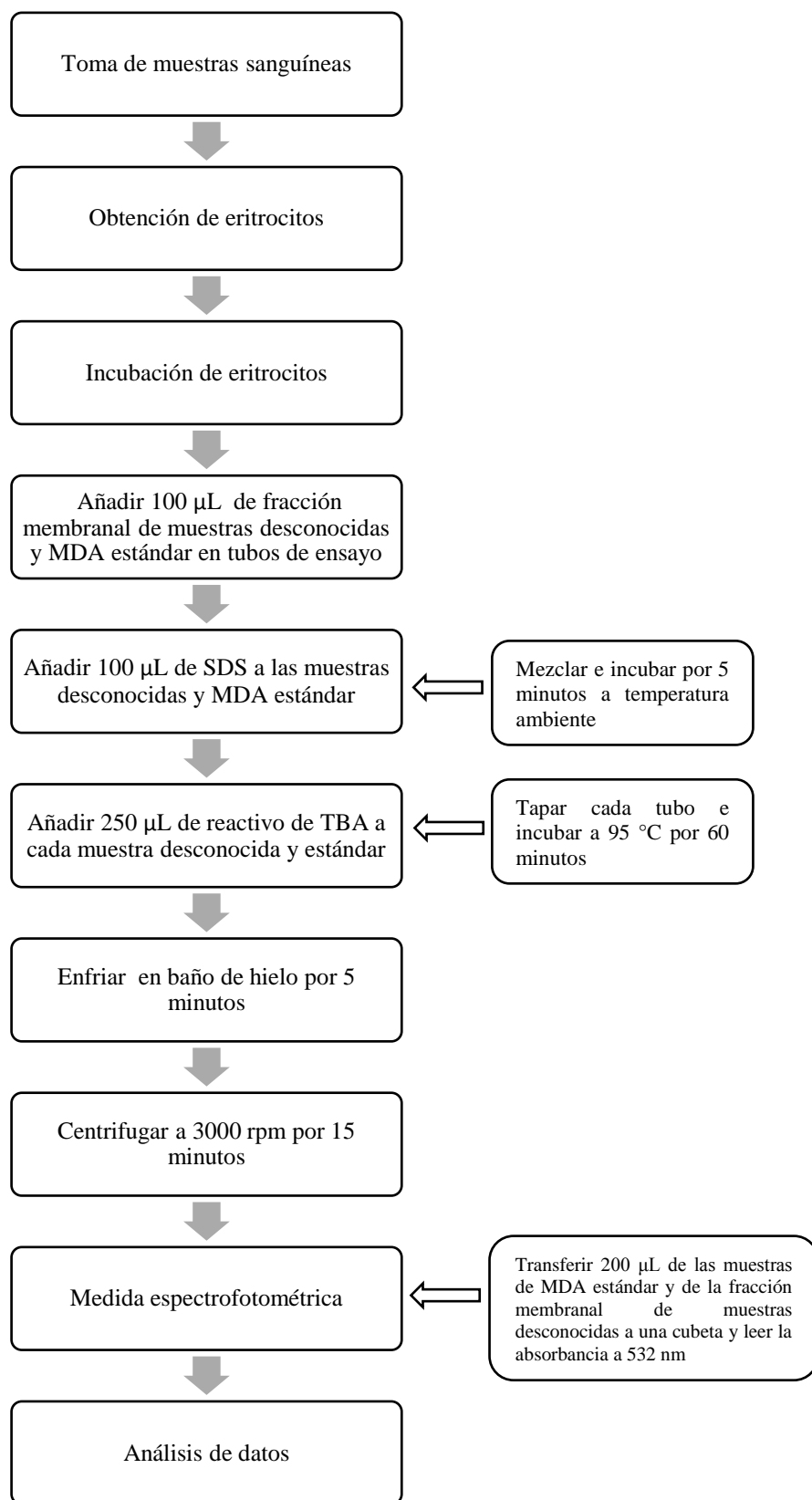
#### BENEFICIOS

La extracción de sangre es de carácter altruista, por lo que Ud. no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de otras, pueden ayudar a la presente investigación a determinar el efecto antioxidante *in vitro* de la “carambola”.

Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho(a) con la información recibida. Comprendiendo el alcance de los riesgos, firmo este consentimiento por mi libre voluntad sin haber estado sujeto(a) a ningún tipo de presión o coacción para hacerlo, por lo anterior es mi decisión AUTORIZAR a la Bachiller en Biología Jimena B. Jiménez Salcedo para la correspondiente toma de muestra.

Lambayeque, ..... diciembre del 2017

Firma \_\_\_\_\_  
 Nombres y Apellidos:  
 D.N.I:

**Anexo 4.** Flujograma del protocolo de ensayo para la cuantificación de malondialdehído

**Anexo 5.** Preparación de solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS; NaCl al 0.9% en 0.01 M de buffer de fosfatos pH 7.0) y amortiguador hipotónico de fosfatos (5P8; 5 mM de buffer de fosfatos pH 8).



**Figura 15.** Preparación de PBS pH 7 y 5P8 pH 8 a. Sales inorgánicas:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (izquierda),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (intermedio) y  $\text{NaCl}$  (derecha) b. Pesado de las sales c. Vertiendo las sales en un beaker de 1000 mL d. Disolución de las sales en un agitador magnético f. Ajustando el pH del PBS pH =7 y 5P8 pH= 8 g. Almacenamiento del PBS y 5P8 en botellas de plástico.

**Anexo 6.****Tabla 7**

*Cantidades empleadas para la preparación de la solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS; NaCl al 0.9% en 0.01 M de buffer de fosfatos pH 7.0).*

<b>Sales inorgánicas</b>	<b>Gramos (g)</b>	<b>Agua destilada</b>
<b>Na H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O</b>	0.94 g	
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O</b>	1.43 g	1000 mL
<b>NaCl al 0.9%</b>	8.7 g	
<b>pH = 7.0</b>		

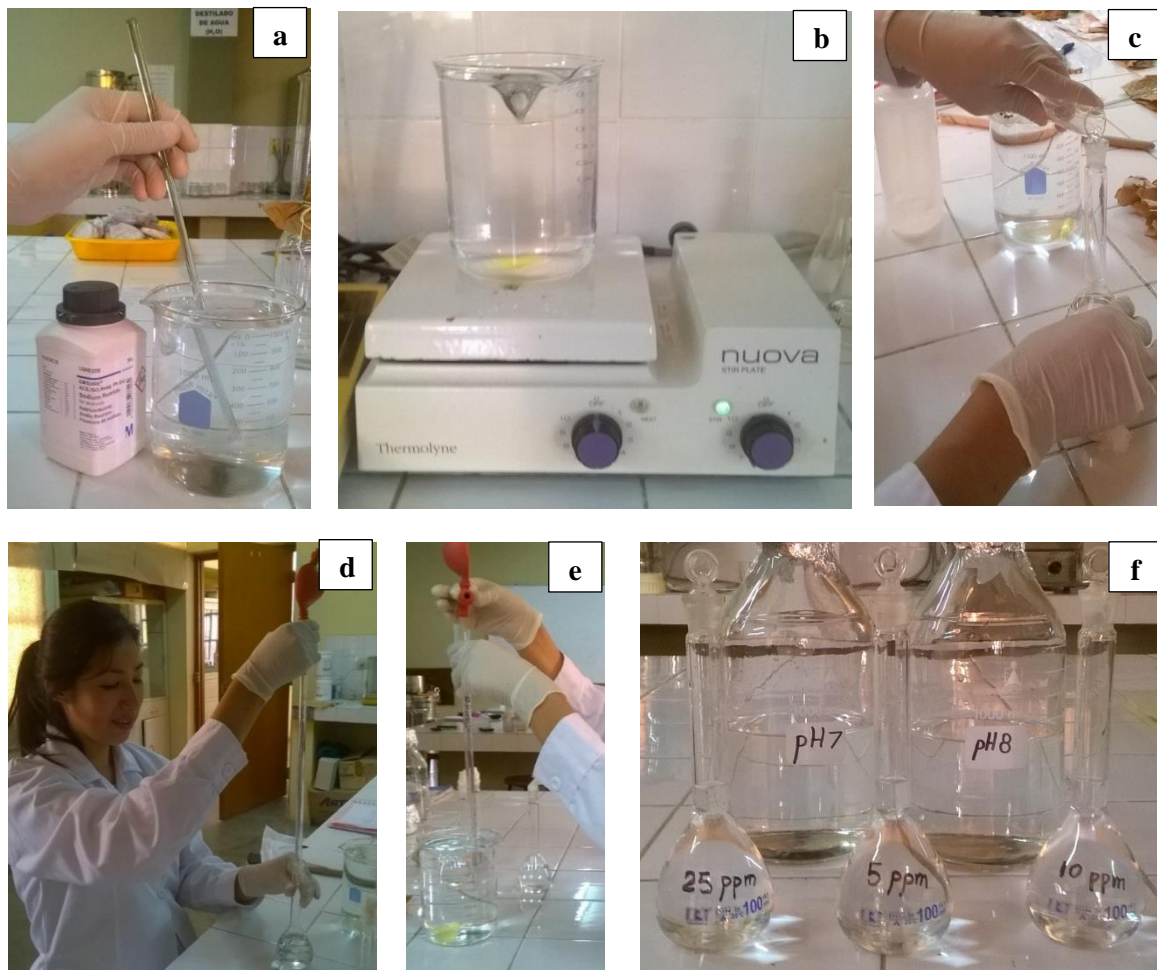


**Anexo 7.****Tabla 8**

Cantidades empleadas para la preparación del *amortiguador hipotónico de fosfatos (5P8; 5 mM de buffer de fosfatos pH 8)*.

Sales inorgánicas	Gramos (g)	Agua destilada
<b>Na H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O</b>	0.11 g	
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O</b>	1.43 g	1000 mL
<b>pH = 8.0</b>		

**Anexo 8.** Preparación de concentraciones de Fluoruro de sodio (NaF) a concentración de 5, 10 y 25 ppm.



**Figura 16.** Preparación de las concentraciones de Fluoruro de sodio. a. Agregar 0.28 g NaF y completar con agua destilada hasta 1000 mL para obtener la solución madre b. Disolución del NaF empleando un agitador magnético c, d, e y f. A partir de la solución madre se obtiene las concentraciones de 5, 10 y 25 ppm de NaF en 100 mL de agua destilada, los cuales fueron almacenados en un matraz aforado de 100 mL respectivamente para su posterior uso.

**Anexo 9.****Tabla 9***Concentraciones en partes por millón (ppm) de fluoruro de sodio.*

<b>Concentración en ppm</b>	<b>Volumen (mL) de NaF en 100 mL de agua destilada</b>
<b>5</b>	4
<b>10</b>	8
<b>25</b>	20

**Anexo 10.****Tabla 10**

*Análisis de varianza de la concentración de MDA  $\mu\text{M}$  del Grupo control positivo a concentraciones de 5, 10 y 25 ppm.*

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,761	2	,381	28,670	,000
Dentro de grupos	,358	27	,013		
Total	1,120	29			

**Anexo 11.****Tabla 11**

*Comparaciones múltiples por el método de Tukey de la concentración de MDA en  $\mu\text{M}$  de los Grupos experimentales tratados con extracto acuoso de A. carambola L. a concentraciones de 1, 2.5 y 5 ppm.*

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: MDA						
HSD Tukey						
(I) G. EXPERIME NTALES	(J) G.EXPERIM ENTALES	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1ppmEA	2.5ppmEA	,02280	,055595	,912	-,11504	,16064
	5ppmEA	,14770*	,055595	<b>,034</b>	,00986	,28554
2.5ppmEA	1ppmEA	-,02280	,055595	,912	-,16064	,11504
	5ppmEA	,12490	,055595	,081	-,01294	,26274
5ppmEA	1ppmEA	-,14770*	,055595	<b>,034</b>	-,28554	-,00986
	2.5ppmEA	-,12490	,055595	,081	-,26274	,01294