

**Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en Radicales Libres en
Biomedicina**

**Evaluación de la capacidad antioxidante de tres productos
elaborados en base a la secreción pedial de *Helix aspersa* Müller**

Amelia Cristina Herrera Briceño
Bióloga

Director de Tesis: Dr. Eduardo Lissi Gervaso.

2013

Dedicado a mi familia, a mis amigos, a mis “conciudadanos ejemplares”
por su paciencia de oriental, y su apoyo sinigual,

Amhelix

Valparaíso, Enero, 2013.

Un especial agradecimiento al Dr. Eduardo Lissi, de la Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile por su “reguía”, al Dr. Gonzalo Buono-Core y Brunella Moggia Costa del Instituto de Química de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, por Alantoína, Ácido gálico, suministrados; al Laboratorio Externo de Control de Calidad (QUIFAC) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, por Ácido glicólico suministrado; a la Dra. Caroline Weinstein, Miguel Ángel Fuentes y Ricardo Ceriani del Laboratorio de Química Fisiológica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, por el acceso a Appliskan; al Dr. Carlos Felipe Henríquez Roldán, Centro de Estudios Estadísticos de la Universidad de Valparaíso, CEE-UV, por su apoyo estadístico; a Tamara Barahona, del Departamento de Ciencias del Ambiente, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile por su amistad y las discusiones metodológicas, a Cristóbal Valdés, a Luisa García, y a Carlos Jara por su cooperación en los análisis, y a todas aquellas personas que han aportado al desarrollo de este interesante estudio, en especial, al Dr. José María Prieto García, del Centro para Farmacognosia y Fitoterapia, del Departamento de Biología y Química Farmacéutica, Escuela de Farmacia de la Escuela Universitaria de Londres, Inglaterra, por su apoyo bibliográfico y de su experiencia sobre polifenoles.

Índice de contenido

ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	11
SUMMARY.....	12
I INTRODUCCIÓN.....	13
1.1) <i>Helix aspersa</i> Müller, Caracol de tierra:.....	13
2.1) Propiedades del caracol:.....	19
Tabla 1: Contenido Nutricional de alimentos animales, comparativo entre carne de caracol, vacuno, pollo, pescado y ostra.....	19
3.1) Radicales Libres:.....	21
Tabla 2. Radicales Libres, oxidantes no radicales, y especies reactivas de tiol no radicales (Jones, 2008).....	21
Figura 1: Esquema de las reacciones de radicales libres en los sistemas biológicos (Boveris, 2005).....	23
4.1) Estrés oxidativo:.....	25
Figura 2: Dos mecanismos de estrés oxidativo (Jones, 2008).....	26
5.1) Antioxidantes:.....	28
Tabla 3. Métodos para estimar especies reactivas de oxígeno, defensas antioxidantes, daño oxidativo y mecanismos de reparación.....	31
II HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	34
III OBJETIVOS.....	34
1.3) OBJETIVO GENERAL:.....	34
2.3) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	34
IV MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
1.4) Muestras a analizar para DPPH y Folin-Ciocalteu:.....	35
2.4) Reactivos Análisis Capacidad Antioxidante y Fenoles:.....	37
3.4) Equipos:.....	37
4.4) Análisis Estadístico de los datos:.....	37
5.4) Método de Folin-Ciocalteu, determinación del contenido de grupos fenólicos totales:.....	38
6.4) Capacidad antioxidante mediante el método DPPH:.....	39
V RESULTADOS.....	40
1.5) Método de Folin-Ciocalteu, determinación del contenido de grupos fenólicos totales:.....	40
Gráfico 1: Contenido total de Grupos fenólicos en Materias primas.....	40
Gráfico 2: Contenido total de Grupos fenólicos de los tres productos con secreción pedial, experimental y teórico.....	40
2.5) Capacidad antioxidante mediante el método DPPH:.....	42
Gráfico 3: Capacidad antioxidante total de Materias primas, por medio de DPPH.....	42
Gráfico 4: Capacidad antioxidante total de los tres productos con secreción pedial, por medio de DPPH, experimental y teórico.....	42
Tabla 4: Porcentaje de Contribución Contenido Fenólico Total y Capacidad Antioxidante de los tres Productos (Melihel, Amelixel e Hiperjarabe).....	44
VI DISCUSIÓN.....	45
VII CONCLUSIONES.....	47
VIII PROYECCIONES.....	48
MISCELÁNEOS.....	49
Figura 3: Productos estudiados con baba de caracol:.....	50

Tabla 5: Contenido fenólico total Folin y capacidad antioxidante por medio de DPPH de las materias primas de los tres productos con secreción pedial.....	51
Tabla 6: Contenido fenólico total Folin y capacidad antioxidante por medio de DPPH de los tres productos con secreción pedial (valores experimentales)....	51
Tabla 7: Contenido fenólico total Folin y capacidad antioxidante por medio de DPPH de los tres productos con secreción pedial (valores teóricos).....	51
IX BIBLIOGRAFÍA.....	52

ABREVIATURAS

A : aceite

ABAP : $C_8H_{18}N_6 \cdot 2ClH$, 2,2'-azobis(2-metilpropionamida)dihidrocloruro

Abs : absorbancia

ABTS : ácido 2,2 azino bis(3-etilbenzo tiazolin-6 sulfónico), agente oxidante

ADN : ácido desoxirribonucleico, genética

aprox : aproximadamente

ATP : adenosín tri fosfato

B : baba de caracol, secreción pedial de *Helix aspersa* Müller

CAT : catalasa, enzima antioxidante

CH₃OH : metanol

Cit P-450 : citocromo P-450

CuSO₄·5H₂O : sulfato de cobre pentahidratado

cm : centímetro (10^{-2} m)

DPPH : 1,1-difenil-2-picrilhidracilo

ELISA : ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, en inglés

Eq : equivalente

ERNs : especies reactivas de nitrógeno

EROs : especies reactivas de oxígeno

Fe : fierro

G : gel

g : gramo

GC : cromatografía de gases, en inglés

GC-MS : cromatografía de gases – espectrometría de masas, en inglés

Gpx : glutatión peroxidasa

GR : glutatión reductasa

GSH-Px : glutatión peroxidasa

GSH-T : glutatión transferasa

GST : glutatión transferasa

G6PDH : glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

H : Hiperjarabe (extracto vegetal)

h luz / día : hora de luz por día

HO· : radical hidroxilo

HPLC : cromatografía líquida de alto desempeño, en inglés

H₂O : agua

H₂O₂ : peróxido de hidrógeno

J : jarabe

Kcal : kilocaloría

Kg : kilogramo

KNaC₄H₄O₆·4H₂O : tartrato sódico potásico

L : litro

MDA : malondialdehído

mg : milígramo

mL : mililitro

mm : milímetro

min : minuto

NaCl : cloruro sódico

NADPH : nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido)

NADPH ox : enzima oxidasa de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NaH₂PO₄·H₂O : fosfato monosódico hidratado

NaOH : hidróxido de sodio

Na₂HPO₄ : fosfato disódico anhidro

Na₂CO₃ : carbonato de sodio

nm : nanómetro

NO : óxido nítrico

N. de la A. : nota de la autora

OGG1 : 8-oxoguanina glicosilasa, enzima reparadora de ADN dañado por especies reactivas de oxígeno

OH : hidroxilo, grupo fenólico antioxidante

8-oxoGua : 7,8-dihidro-8-oxoguanina, base oxidada mutagénica

ONOOH : ácido peroxinitroso

ONOO⁻ : anión peroxinitrito

O₂ : oxígeno

⁻O₂ : radical anión superóxido

P : preservantes

pH : potencial de hidrogeniones

ppm: partes por millón = mg / L

p / v : peso / volumen (proporción)

R : romero/manzanilla (extracto vegetal)

RL : radical libre

RSE : resonancia de espín electrónico

s : segundo

Se-Gpx : glutatión peroxidasa dependiente de selenio

SH : grupo tiol

SOD : superóxido dismutasa

t : tiempo

TBARS : especies reactivas al ácido barbitúrico, en inglés

Tx : Trolox :C₁₄H₁₈O₄, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

UQH· : radical semiquinona

uM : micromolar

UV : ultravioleta

Vis : luz

v / v : volumen / volumen (proporción)

% : porcentaje

% HR : porcentaje de humedad relativa

°C : temperatura en grados Celsius

RESUMEN

El caracol terrestre común es un gasterópodo con concha de calcio en espiral, cuerpo prolongado y tentáculos cefálicos. Para desplazarse requiere de la secreción de un mucus o baba, que al solidificar le sirve como un soporte que lo aísla del ambiente desfavorable (operculación). El caracol y su secreción de mucus tienen aplicación desde tiempos inmemoriales en la medicina popular. La utilización de la secreción pedial del caracol en cosmética, dermatología y medicina ha ido, desde entonces, en constante aumento. Sin estudios formales previos publicados, podría poseer propiedad antioxidante, por lo que se evalúa, en este estudio, la capacidad antioxidante de tres productos elaborados con secreción pedial por medio de la técnica DPPH y contenido fenólico por medio de Folin-Ciocalteu.

La protección antioxidante en los sistemas biológicos involucra a una gran variedad de componentes químicos de origen endógeno (que viene genéticamente incorporado) y exógeno (del ambiente adquirido), que interaccionan mediante efectos sinérgicos y complementarios, siendo un mecanismo muy flexible y eficiente.

En el caso de los compuestos de interés de la secreción pedial de *Helix aspersa* Müller, servirían para atenuar la acción perjudicial de los radicales libres sobre la piel expuesta al medio, como también en el caso de una tos con producción de moco por la irritación de un resfrío o bronquitis, por el contenido de Alantoína, Ácido Glicólico, Ácido Glucurónico (datos no publicado), y la enzima SOD, que favorecería la protección ante radicales libres del tipo $\cdot\text{O}_2$, tanto en *Helix aspersa*, como en humanos, en los productos elaborados e incluidos en este estudio: Melihel, Amelxil e Hiperjarabe.

Brieva *et al.* (2008) cometen un error al confirmar que la baba de caracol contiene Glutación transferasa, ya que se encuentra en las vísceras del animal, por lo que utilizan el organismo completo para generar el producto probado en la regeneración epidérmica humana, ya que no se encontró Selenio en muestra de baba sola (datos no publicados).

La Capacidad Antioxidante de Hiperjarabe > Amelxil > Melihel en el método DPPH, y en el cálculo teórico Melihel > Hiperjarabe > Amelxil. En el contenido fenólico (Folin), Hiperjarabe > Amelxil > Melihel, y en el cálculo teórico Hiperjarabe > Amelxil > Melihel.

Los polifenoles de la baba se complementan con los polifenoles agregados con las materias primas vegetales, como aceite, extracto alcohólico de romero/manzanilla, jarabe (de miel de abejas) y el extracto Hiperjarabe (plantas medicinales mucolíticas).

Melihel y Amelxil son buenos productos con alta capacidad antioxidante. Sus materias primas no son tóxicas y la baba o secreción pedial de caracol es potenciada biológicamente de acuerdo a la edad de los caracoles y su dieta alimenticia para aumentar la cantidad de alantoína, ácido glicólico, ácido glucurónico, y posiblemente, su contenido antioxidante. No se practica maltrato animal. Melihel y Amelxil podrían clasificarse como "artesanales".

Sería necesario practicar un nuevo análisis para determinar el tipo de antioxidantes contenido en la secreción pedial de caracol (qué tipo de polifenoles se encuentran).

Palabras Claves: caracol de tierra, secreción pedial, capacidad antioxidante.

SUMMARY

The common snail is a gastropod with calcium shell in a spiral shape, extended body and cephalic tentacles. To move itself requires the secretion of mucus or slime, which to solidify serves as a support which isolates the unfavourable environment (capping). The snail and its mucus secretion are employed from immemorial time in folk medicine. The use of snail secretion pedial in cosmetics, dermatology and medicine has been, since then, constantly increasing. However, no formal studies have been previously published regarding their antioxidant capacity. So, it is evaluated in this study, the antioxidant capacity of three products made pedial secretion through DPPH technique and phenolic content by Folin-Ciocalteu.

Antioxidant protection in biological systems involves a variety of chemical compounds of endogenous origin (which is genetically incorporated) and exogenous (acquired from the environment), which interact with and complementary synergy, being a very flexible and efficient mechanism.

In the case of compounds of interest of *Helix aspersa* Müller pedial secretion, serve to attenuate the harmful action of free radicals on the skin exposed to the environment, as in the case of a cough with mucus production by irritation a cold or bronchitis, for the content of Allantoin, Glycolic Acid, Glucuronic Acid (unpublished data), and SOD enzyme, which favor the protection against free radical $\cdot\text{O}_2$, both in *Helix aspersa*, as in humans, in the products developed and included in this study: Melihel, Amelixil e Hiperjarabe.

Brieva et al. (2008) make a mistake by confirming that the snail contains Glutathione transferase, and found in the viscera of the animal, so the whole organism used to produce the product tested in human epidermal regeneration, and that was not found Selenium in slime snail sample alone (unpublished data).

The antioxidant capacity of Hiperjarabe> Amelixil> Melihel in DPPH method, and the theoretical calculation Melihel> Hiperjarabe> Amelixil. In the phenolic content (Folin) Hiperjarabe> Amelixil> Melihel, and in the theoretical calculation Hiperjarabe> Amelixil> Melihel.

The polyphenols from slime snail are supplemented with polyphenols added plant materials such as oil, alcohol extract of rosemary/chamomile, syrup (with honey bee) and the extract Hiperjarabe (medicinal plants mucolytic).

Melihel and Amelixil are good products with high antioxidant capacity. Its raw materials are nontoxic and slime or snail secretion is enhanced biologically according to the age of the snails and their diet to increase the amount of Allantoin, Glycolic Acid, Glucuronic Acid, and possibly its antioxidant content. Animal abuse is not practiced. Melihel and Amelixil could be classified as "craft" (hand-made products).

It would be necessary to perform further analysis to determine the type of antioxidants contained in the slime snail (what type of polyphenol found).

Keywords: land snail, pedial secretion, antioxidant capacity.

I INTRODUCCIÓN

1.1) *Helix aspersa* Müller, Caracol de tierra:

El caracol de jardín *Helix aspersa* Müller es un invertebrado perteneciente al Phylum Mollusca (*mollus*, del latino "blando"), Clase Gastropoda (que se arrastra gracias a un aparato motor situado debajo del vientre), Subclase Pulmonata (respiración aérea por pulmones en vez de branquias), Orden Stylommatophore (dotados de centros nerviosos especiales en cuatro tentáculos retráctiles que salen del extremo de la cabeza), Familia Helicoidal (concha en espiral, univalva), Género *Helix*, Especie *aspersa* (según Müller, su determinante), Nombre Común caracol de jardín, caracol Petit - gris, caracol Chagriné, caracol Cagonille, caracol Zigrinata.

Se piensa que el grupo Moluscos aparece hace ya unos 500 millones de años, y en particular los helícidos, ya se consumían por el hombre hace unos cuantos milenios. Existen varias especies extendidas por el mundo como por ejemplo *Helix pomatia*, *H. lucorum*, *H. aspersa*, *H. aspersa maxima*, etc., aunque otras especies ya están por extinguirse si no se pone atención en ello.

Entre las características generales del caracol de jardín *Helix aspersa* Müller, se puede observar que la longitud de la concha univalva varía entre 20 - 35 mm aprox., con una altura de 25 - 40 mm aprox. (en zonas favorables se encuentran individuos de dimensiones mayores). El color de fondo de la concha es gris o amarillento, con tiras de color oscuro, a veces, interrumpidas. La forma de la concha es cónica (conohélice, con 3 - 4 espirales), globosa y panzuda, muy convexa en la parte superior y no presenta el orificio columelar. La abertura es oval, oblicua y pronunciada. El cuerpo es de color oscuro, tendiendo al negro, adornado de manchitas más claras.

Difundido en zonas de clima mediterráneo, e incluso, aclimatado en zonas de calor con influencia marina (Serrano, 2001), se alimenta casi exclusivamente durante las horas nocturnas. Su hábitat natural comprende terrenos calizos (pH 6,5 - 8,5), como también jardines, parques y zonas cultivadas. Al ser xerófilo, vive preferentemente en zonas soleadas, secas y de escasa vegetación, y en particular, en las zonas marinas (Marasco y Murciano, 2000; Serrano, 2001). Su vida es relativamente breve (4 - 5 años), aunque han existido casos en que pueden durar más de 8 años en cautiverio.

Su morfología externa, de acuerdo a Galindo y Suárez (1997), se pueden distinguir dos partes bien diferenciadas: la *concha* y el *cuerpo*. La Concha es univalva, globulosa y enrollada en espiral en distintos planos, generalmente de derecha a izquierda (dextrorsa) y excepcionalmente a la inversa (sinistrorsa). El eje columelar, compacto en *Helix aspersa* Müller, termina en una extremidad superior o ápice y en otra inferior u ombligo, situado debajo del reborde terminal o *peristoma*. La concha, con 3, 4 ó 5 espiras según la especie, presenta estrías o líneas de crecimiento, paralelas al eje, y bandas coloreadas perpendiculares u horizontales a las estrías. El límite entre espiras se denomina *línea de sutura*. La concha es producida por el *manto* (repliegue del tegumento que recubre la masa visceral) a partir de calcio absorbido de los alimentos, siendo su composición de un 98 - 99% de sales minerales y 1 - 2% de materia orgánica (conquiolina). Estructuralmente,

se halla constituida por tres capas: una externa o periostraco compuesta por una fina película de materia orgánica (conquiolina), otra media o mesostraco formada por láminas prismáticas, impregnadas de compuestos cálcicos cristalizados (tipo calcita) en el seno de una matriz proteica y otra interna o endostraco, conjunto de láminas superpuestas, formadas alternativamente, por carbonato cálcico cristalizado (tipo aragonito) y conquiolina.

El Cuerpo está recubierto por el tegumento, consta de *cabeza*, *pie* y *masa visceral*. En la cabeza se hallan dos grandes tentáculos oculares superiores y, debajo de los mismos, otros dos tentáculos táctiles de menor tamaño. En posición antero - ventral se distingue la *boca* limitada por un labio superior bilobulado, dos labios laterales y un labio inferior. El *orificio genital* se encuentra sobre la región lateral derecha, en el límite terminal de la cabeza, detrás de la base del tentáculo ocular.

El *pie*, región corporal sobre la que reposa el cuerpo del animal, es de forma alargada y representa la mitad del peso corporal. Dada su estructura de fibras lisas y células secretoras de una sustancia mucosa llamada mucina o limacina (Marasco y Murciano, 2000), corrientemente conocida como "baba", procedente de la glándula del pie y collar del manto, muy cercana al poro excretor (pneumostoma), debajo de la concha (disección propia; Campion, 1961), los caracoles poseen una lenta, pero potente capacidad de desplazamiento mediante reptación. En la región media superior derecha del pie, por debajo del *peristoma*, desembocan los *orificios respiratorio*, *excretor* y el *ano*.

La concha se encuentra fuertemente unida al pie por el *músculo columelar*.

En la masa visceral recubierta por el manto y situada en la concha, se encuentran los *aparatos digestivo* (con una voluminosa glándula digestiva o *hepatopáncreas*), *circulatorio*, *respiratorio*, *excretor* y *reproductor*.

En su morfología interna, el Aparato Digestivo está conformado por la Boca, que está constituida por un bulbo bucal musculoso, provisto dorsalmente de una mandíbula denticular quitinosa, denominada *rádula* (con esto raspa el alimento vegetal). Es una especie de peine quitinoso que se encuentra envuelto dentro de la membrana que conecta con el componente del aparato digestivo inmediato a la boca, el *esófago* y, luego se abre en un amplio y largo *estómago* fusiforme, el cual va seguido por un *intestino* de gran longitud con una doble circunvolución alrededor del hepatopáncreas que termina en el *ano*. Adosadas a las paredes estomacales se encuentran dos *glándulas salivares*, blancuzcas y multilobuladas, que desembocan en el bulbo bucal, mientras que la tercera glándula digestiva (hepatopáncreas), formada por dos lóbulos, lo hace entre el estómago y el intestino.

El Aparato Circulatorio, compuesto de *Corazón*, situado en posición dorsal, se encuentra protegido por el *pericardio*. Consta de una aurícula piriforme anterior y de un ventrículo alargado posterior del que nacen dos aortas; la anterior, que irriga al pie y la región cefálica, y la posterior al hepatopáncreas y al ovotestis. Ambas aortas dan origen a las restantes arterias originándose un sistema vascular arterio - venoso formado por una

extensa red en la que se intercalan senos venosos o lagunas sanguíneas, ya que la circulación es sencilla y abierta.

El Aparato Respiratorio, con el principal órgano constituido por la *cavidad paleal*, que forma un saco pulmonar o "pulmón" que comunica con el exterior por el orificio respiratorio o pneumostoma. Se encuentra tapizado por una gran cantidad de vasos finamente ramificados en los que se produce la hematostis y que confluyen en la vena pulmonar por la que circula sangre o hemolinfa oxigenada, cuyo pigmento es la *hemocianina*. Como complemento a la respiración pulmonar, los caracoles poseen una respiración cutánea importante (la concha es porosa, existe un contacto aéreo con el manto).

El Aparato Excretor, de tipo nefridiano con un solo *riñón* u *órgano de Bojanus*, de color gris amarillento, situado entre el corazón y el recto. Su morfología es triangular con dos partes claramente diferenciadas, una propiamente excretora y otra consistente en una vejiga de acumulación, de la que parte un fino canal excretor que termina en el orificio del mismo nombre, al lado del ano.

El Aparato Reprodutor, es el más voluminoso y complicado de los órganos que posee, ocupando gran parte de la cavidad visceral de los Helicidos adultos. Comprende tres partes: una porción inicial hermafrodita, otra intermedia, constituida por las vías genitales masculinas y femeninas, y otra terminal en la que se unen dichas vías para finalizar en un órgano genital común. La primera porción está constituida por una glándula sexual hermafrodita u *ovotestis*, productora de gametos masculinos y femeninos con diferente secuencia temporal. La gónada se continúa por un conducto flexuoso, denominado *canal hermafrodita*, que desemboca en una dilatación o "*cámara de fecundación*", donde también lo hace la *glándula de la albúmina*. La porción intermedia se inicia en la citada cámara, a partir de la cual parte un grueso canal festoneado (*ovispermiducto*), formado por la yuxtaposición de otros dos, el *oviducto* y el *espermiducto*, que después se separan. El espermiducto se divide para dar origen, por una parte, a un largo canal deferente que termina en un *pene* dilatado y hueco provisto de un músculo retractor, y por otra, a un conducto ciego helicoidal, también largo y muy fino, denominado *flagelo*, en el que se aglomeran los espermatozoides en forma de un filamento llamado *espermatóforo*. El oviducto termina en una dilatación que recibe, a su vez, por una parte la *bolsa del dardo* unida a los dos grupos de *glándulas multífidas*, y por otra el *canal del receptáculo seminal* o *espermateca*. La bolsa del dardo es evaginable y aloja un *dardo*, en forma de aguja prismática, de naturaleza calcárea, que sirve de órgano excitador y fijador durante la cópula (es capaz de atravesar a la pareja para la copulación). En la porción terminal se reúnen los conductos genitales masculino y femenino, formando un vestíbulo genital común o *vagina* que termina en el *orificio genital* situado cerca de la base del tentáculo ocular derecho.

El Sistema Nervioso se compone de dos partes: el *sistema simpático* o *neumogástrico* y el *sistema central*. El sistema simpático que inerva la mayor parte del tubo digestivo, comprende un par de ganglios bucales, colocados debajo del bulbo del mismo nombre y unidos por dos cordones que se comunican con los *ganglios cerebroides*.

El Sistema Nervioso Central se halla constituido por un sistema de ganglios anteriores dispuestos en forma de *collar periesofágico* comprendiendo los ganglios cerebroides, los *ganglios pedios* y el *sistema visceral*, compuesto por un par de ganglios pleurales unidos a tres ganglios viscerales, este conjunto constituye el complejo cerebro - pleuro - pedio. De cada uno de los citados grupos parten nervios y conectivos que los unen a otros ganglios. Los ganglios cerebroides inervan los *tentáculos*, *labios* y *boca* y los restantes la *cavidad paleal*, el *saco visceral*, el *pie* y el *músculo columelar*.

El Órgano de los Sentidos compuesto de un tegumento se halla provisto de células neuroepiteliales, repartidas por toda la superficie, esencialmente a nivel de los tentáculos, de los labios y del borde del pie. Dichas células constituyen los órganos sensoriales táctiles y posiblemente olfativos.

En el extremo de cada uno de los dos tentáculos mayores se hallan los *ojos*, con un pequeño poder visual, fundamentalmente *foto-receptor*. En su estructura se distingue: una *córnea*, un *crystalino*, un *cuerpo vítreo* y el correspondiente *nervio óptico*.

Los *otocistos*, situados a nivel de los ganglios pedios, son unas formaciones esféricas recubiertas por dos capas en cuyo interior se encuentran tres pequeños corpúsculos calcáreos (*otolitos*) bañados en el seno de un líquido fisiológico. Constituyen el órgano del equilibrio y probablemente están relacionados con el sistema auditivo.

La Fisiología de acuerdo a Galindo y Suárez (1997):

Función de la concha:

La concha desempeña principalmente un papel defensivo frente a los depredadores y a las condiciones adversas del medio (calor, frío, viento, luz, sequía, etc.), asimismo, es un eficaz elemento de protección ante la gran sensibilidad del caracol al grado higrométrico ambiental, el cual es capaz de afectar a la coloración y a la resistencia de la concha: un ambiente húmedo la oscurece y hace frágil, mientras que la sequía la aclara y endurece. Se estima que el grado óptimo de hidratación del caracol es de un 86%.

La retracción del cuerpo en el interior de la concha, como respuesta a estímulos adversos, se efectúa gracias a varios músculos, especialmente al columelar. El crecimiento en longitud y reparación de daños, tiene lugar a partir del manto, completándose su papel protector con la formación de un velo membranoso (*epifragma* u *opérculo*) en las épocas de letargo, siendo generalmente más grueso en invierno que en verano.

La Alimentación:

Los alimentos (vegetales, en general) son cortados y triturados entre la mandíbula superior y la rádula, mediante movimientos alternativos de vaivén. La deglución se ve favorecida por una secreción mucosa de las glándulas salivares (neutra o alcalina) desprovista de actividad diastásica (que degrada el almidón), según algunos investigadores, o poseedora de una enzima para el desdoblamiento de glúcidos y proteínas y la saponificación de los lípidos, las células de absorción, donde se acumulan glucógeno y grasas y las células calcáreas, lugar de almacenamiento del fosfato de calcio que juega un papel en la formación de la concha y del opérculo (en las especies de epifragma calcáreo, como por ejemplo, *H. pomatia*). El intestino carece de glándulas digestivas y sólo representa un papel de eliminación de excretas, aunque la flora intestinal es capaz

de desdoblar la celulosa.

La Circulación:

La *hemolinfa* o "*sangre*" de los Helicidos, es un líquido viscoso e incoloro que adquiere coloración azulada en contacto con el aire debido a la presencia del pigmento respiratorio, hemocianina, cuya estructura química es la de una cromoproteína no porfirínica con una riqueza en cobre que oscila entre 0,17 – 0,26%. La hemolinfa, una vez oxigenada en el pulmón, llega a la aurícula del corazón a través de una *vena pulmonar*, pasa al *ventrículo* desde donde es impulsada a las aortas y distribuida por el sistema vascular, asegurándose así la irrigación de los diferentes tejidos, órganos y glándulas corporales, a través de los *senos venosos* que se continúan con las *venas*, retornando nuevamente al *pulmón*, repitiéndose el ciclo circulatorio. El *ritmo cardíaco* es de tipo miógeno, que varía según la temperatura ambiental, oscila entre 20 - 35 contracciones / minuto a 12 - 14°C, pero puede elevarse a 100 - 110 contracciones / minuto a 38°C o descender a 8 - 10 contracciones / minuto cuando el animal se halla a temperaturas de letargo invernal.

La Respiración:

Los caracoles tienen una forma de respiración similar a la de los animales superiores, con movimientos de inspiración y espiración, y ritmo de 3 - 4 por minuto, mediante apertura y cierre de los dos labios del pneumostoma. El aire penetra en el *pseudopulmón*, oxigena la sangre de sus finas ramificaciones vasculares y seguidamente es expulsado, una vez efectuada la hematosis. La respiración pulmonar se refuerza con una respiración cutánea, favorecida por una sustancia mucosa epidérmica, que en determinados casos puede representar el 43 - 80% de la respiración total, lo que proporciona una gran resistencia a fenómenos de hipoxia.

La Excreción:

La eliminación de productos metabólicos de desecho se lleva a cabo merced a la filtración del órgano de Bojanus o riñón y, sobre todo, a través de las paredes del intestino.

La Reproducción:

Aunque el caracol es hermafrodita (tiene los órganos genitales masculinos y femeninos), la fecundación requiere indispensablemente una cópula recíproca, ya que es insuficiente en autofecundarse.

La edad de madurez sexual depende esencialmente de la temperatura, humedad y luminosidad ambientales, así como de la época de nacimiento. El caracol común en condiciones naturales alcanza su madurez sexual a los 8 meses, aunque no se reproduce hasta los 12 o 14 meses; en criaderos con condiciones favorables (15 - 20°C, 80 - 85% HR, 8 - 10 h luz/día), 8 - 12 meses. La reproducción de los caracoles comprende 5 fases: cópula, fecundación, puesta, incubación y eclosión.

Los Sentidos:

El tacto es el sentido más desarrollado y generalizado en toda la superficie tegumentaria no recubierta por la concha, sobre todo en los tentáculos, en la porción anterior del cuerpo y en la boca, que permiten una gran sensibilidad a los contactos, la temperatura y el grado higrométrico.

Por lo que se refiere al olfato, los caracoles son capaces de distinguir tenues olores hasta una distancia de 50 cm aproximadamente, aumentando si se trata de sustancias o alimentos con olores pronunciados. La percepción tiene lugar a través de toda la superficie corporal y especialmente a nivel de tentáculos y labios. El sentido del gusto es muy variable y parece que va asociado al del olfato con posible localización preferente en la cavidad bucal.

La sensibilidad auditiva, nula pero ligada a la del equilibrio, se lleva a cabo a través de otocistos y otolitos.

El sentido de la vista está poco desarrollado, aunque los Helicidos son capaces de percibir objetos de escasa coloración a distancias de 2 - 6 cm, y de distinguir la luz de la oscuridad, ya que su actividad depende en gran medida del fotoperíodo.

Los Ritmos Biológicos:

La vida de los caracoles en la naturaleza se caracteriza por tener tres fases de diferente actividad biológica: vida activa, estivación e hibernación, dependientes de las condiciones higrométricas y térmicas del ambiente.

La estivación es un estado letárgico, como respuesta a los períodos secos del lugar. Su duración puede llegar a ser hasta de 4 meses, anualmente, durante los cuales el caracol disminuye o incluso llega a paralizar su metabolismo de acuerdo con la humedad ambiental.

La hibernación, que coincide con las bajas temperaturas invernales y otros factores como la disminución del fotoperíodo, es un período de letargo más pronunciado y duradero que el de estivación. Durante este tiempo, se paralizan las funciones digestivas y la frecuencia cardíaca se reduce a 3 contracciones por minuto a 0°C, viviendo el caracol a expensas de sus reservas, especialmente del glucógeno almacenado en el hepatopáncreas. En esta etapa adelgazan bastante.

Tanto en la fase de estivación como en la de hibernación los caracoles se retraen dentro de su concha y segregan un disco mucoso incoloro, que se solidifica en contacto con el aire, para taponar el orificio de la concha: es el epifragma, que en el caso de *H. aspersa* es mucoso, mientras que en el *H. pomatia* es calcáreo.

Según algunos autores, las fases de estivación e hibernación, pero sobre todo esta última, corresponden a un fenómeno de reposo fisiológico interno necesario para la recuperación de los órganos reproductores y las funciones sexuales.

Cuando las temperaturas aumentan y la humedad ambiental es adecuada, el caracol sale de su letargo invernal con un apetito desmedido, a consecuencia de las pérdidas energéticas sufridas en la fase anterior.

Durante la vida activa se produce un rápido crecimiento de los caracoles jóvenes supervivientes de la hibernación y una recuperación de los animales adultos que, posteriormente, comenzarán su período reproductivo.

2.1) Propiedades del caracol:

Las propiedades de los caracoles como alimento, comparando con otras carnes de deleite común: vacuno, pollo, pescado y ostras (por cada 100 gramos de carne). Esta tabla es universal, por lo que se puede encontrar en casi todos los países que consumen caracoles (Schmidt-Hebbel *et al.*, 1992; Herrera, 2003):

Contenido Nutricional	Animal				
	*Caracol	Vacuno	Pollo	Pescado	Ostra
Lípidos (g)	0,5 – 0,8	10 – 12	12	1,50	1,10
Calorías (Kcal)	60 – 80	160 – 170	120 - 200	70 - 100	65 - 80
Proteínas (g)	13 – 15	21 – 23	17 – 18	15 - 20	12
Agua (%)	70 – 85	65 - 72	70 - 72	75 - 82	78 - 82
Sales minerales (mg)	1,5 – 2,0	0,9	0,8 – 1,0	0,25	0,29

*Rico en calcio

Tabla 1: Contenido Nutricional de alimentos animales, comparativo entre carne de caracol, vacuno, pollo, pescado y ostra.

Como puede verse en la Tabla 1, el caracol aporta muy pocos lípidos. A pesar de ser pariente de las ostras, la preparación de los caracoles debe ser libre de aderezos grasos para mantener su contenido lipídico.

Los caracoles pueden consumirse por personas de todas las edades y estados (embarazadas y en lactancia, adultos y jóvenes). Además, contienen casi un 40% de los aminoácidos esenciales. Basta un platillo de unos 10 caracoles grandes, para suministrar la cantidad necesaria. Por lo tanto, la carne de caracol es nutritiva, sana y exquisita.

Otra propiedad interesante de los caracoles es la baba, limacina, mucina o secreción pedial, utilizada para cosmética y medicina. Al respecto, no hay publicaciones científicas que presenten los componentes en la secreción pedial de *Helix aspersa* M.

En un examen libre que se realizó en el año 2004, la baba analizada (que está potenciada biológicamente de acuerdo a las condiciones controladas en un estudio previo; Herrera, 2002) contiene varios compuestos:

- *Alantoína*: involucrado en la regeneración de tejido epidérmico humano.
- *Ácido glicólico*: exfolia, retira el tejido celular epidérmico viejo o muerto.
- *Ácido glucurónico*: producto de excreción celular.

- *Cobre, Hierro, Cinc*: importantes minerales indispensables para la vida.
- *Polifenoles**: equivalentes Ácido gálico. A pesar de poseer polifenoles, la capacidad antioxidante resultante es negativa, lo que motiva la realización de este presente estudio.

De acuerdo a la propaganda comercial ligada a los ya varios productos con baba de caracol, los exámenes no arrojaron la presencia de proteínas Colágeno (ni Elastina), tampoco mineral Selenio**.

En épocas de antaño, por tradición cultural (en conversaciones particulares con los abuelos descendientes de italianos y españoles), se utilizaban los caracoles por su baba para suavizar la garganta de resfríos, bronquitis y gripes. Se tomaban caracoles sanos y activos, se lavaban bien, se encerraban en un par de platos hondos con azúcar por un día, y se hacía beber el jarabe resultante.

En casos de hidropesía (acumulación anormal de líquido seroso en cualquier cavidad del cuerpo, o su infiltración en el tejido celular), se hacía consumir caracoles, como también para los partos.

En los casos de úlceras, se recomendaba tragarse un caracol sin cáscara en ayunas, antes lavándolo bien con agua. Por acción de los ácidos del estómago, el caracol comenzará a borbotear secreción pedial.

También la baba de caracol fue utilizada para depilar vellos del cutis femenino, para curar hemorragias, hernias, trastornos de ojos (Gabriélidès A., 1932), heridas, verrugas (se duda de que cure todos los tipos de papilomas en la piel), suavizar arrugas, cicatrices, queloides, espinillas, estrías (aún rojas se quitan, las blancas solamente las atenúa bastante en un lapso mínimo de uso continuado de 5 años), líneas de expresión, etc.

Por lo tanto, debido a la utilidad del extracto de secreción pedial de caracol de jardín *Helix aspersa* Müller para productos cosmetológicos, dérmicos y medicinales (Bonnemain, 2005), por la propiedades curativas que posee teórica y observacionalmente, y, a la gran proliferación de estos organismos que existen en nuestro país (considerados por algunos como plaga, especie introducida desde Europa) sin destino productivo muchas veces, se ha puesto atención en la posible capacidad antioxidante de la secreción pedial por determinados compuestos como la *Alantoína*.

*, ** N. de la A. Análisis de Polifenoles, DPPH y metales, realizados en Abril del 2004 en Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Valparaíso.

3.1) Radicales Libres:

Los Radicales Libres son átomos, moléculas, o iones con (uno o varios) electrones desapareados, en su orbital más externo (Boveris, 2005; Magder, 2006; Pala y Tabakçioğlu, 2007; Maldonado *et al.*, 2010). Esta característica hace que sean muy reactivos, ya que tienden a captar un electrón de otros átomos o moléculas, con tal de estabilizarse electroquímicamente (Rahman, 2007). En los sistemas biológicos, estas estabilizaciones se producen con moléculas adyacentes, tales como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos y derivados de éstos (Halliwell, 1989). Muchas veces las reacciones continúan, amplificándose la alteración (Luna, 2012). La mayoría de los radicales libres que dañan sistemas biológicos se conocen como Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) u (ERNs, en el caso del nitrógeno)(Magder, 2006; Pryor *et al.*, 2006; Rahman, 2007; Maldonado *et al.*, 2010).

Table *Free radicals, nonradical oxidants, and nonradical thiol-reactive species*

Free radicals
Superoxide anion radical
Nitric oxide
Hydroxyl radical
$\cdot\text{CCl}_3$
Nonradical oxidants
Hydrogen peroxide
Hydroperoxyfatty acids
Aldehydes
Quinones
Peroxynitrite
Disulfides
Nonradical thiol-reactive chemicals
Conjugated aldehydes, e.g., acrolein
4-Hydroxynonenal, malondialdehyde
Quinones
Epoxides
Zn^{2+} , Hg^{2+} , other metal ions

Tabla 2. Radicales Libres, oxidantes no radicales, y especies reactivas de tiol no radicales (Jones, 2008).

Como puede observarse en la Tabla 2, en general, los Radicales libres pueden ser originados por el Oxígeno (radical anión superóxido, radical hidroxilo), por el Nitrógeno (radical óxido nítrico), ser precursores de radicales libres, como oxidantes no radicales (peróxido de hidrógeno; hidroperóxidos de ácidos grasos); y también químicos reactivos del grupo tiol no radical (disulfuros, 4 – hidroxinonenal, quinonas, iones metálicos), etc. (Dröge, 2002; Jones, 2008).

En los sistemas biológicos, los radicales libres se producen endógenamente por la necesaria respiración celular mitocondrial (aerobios), actividades enzimáticas y del sistema inmunológico (Jones, 2008; Comporti, 2010). De manera exógena, como ejemplos de la formación de radicales libres en la actualidad humana y de cierto modo, influyendo en los organismos vivos (Vargas *et al.*, 2007), se encuentran: la contaminación del aire, suelo, agua

por procesos industriales, agrícolas, domésticos, tráfico aéreo, terrestre, marítimo (combustibles fósiles, metales pesados, pesticidas, otros químicos); sobreexposición a radiaciones ultravioletas, y/o a otras radiaciones ionizantes; hábitos tóxicos, medicamentosos (drogas, anestésicos, otros), hábitos de alimentación (comida altamente procesada, otros).

Volviendo a la célula, los mecanismos de generación de radicales libres, de los tipos especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, pueden ser varios y como resultado normal de su fisiología (Halliwell, 2006; Vargas *et al.*, 2007). Pueden generarse en mitocondrias, retículo endoplasmático, linfocitos, neutrófilos, endotelio, entre otros, en consecuentes reacciones de Haber-Weiss y Fenton o dismutación de superóxido. Pueden provenir de un origen no enzimático además, donde involucra reacciones con tioles, quinonas, flavinas, mioglobina, etc.; como también enzimático, por acción de xantina y aldehído oxidasas, citocromo P-450, NADPH oxidasa.

De manera habitual, el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O_2), en lo que se conoce como estado triplete, así el oxígeno es poco reactivo con una velocidad de reacción baja a temperatura fisiológica; sin embargo por reacciones puramente químicas, por acciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que son capaces de originar daño celular. Por lo tanto se debe mencionar que si bien el oxígeno es imprescindible para el metabolismo y las funciones del organismo, no se deben olvidar los muchos efectos tóxicos que produce (Fridowich, 1978; Halliwell, 2000).

La respiración celular es la principal fuente de RL, específicamente, a nivel de la cadena de transporte de electrones, que es la última etapa de producción de protones de alta energía, y cuyo pasaje a través de la membrana interna mitocondrial genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar el adenosín trifosfato. En este proceso de fosforilación oxidativa, el oxígeno actúa como aceptor final de electrones, adquiriendo en más del 95 % de estas reacciones, un total de 4 electrones con producción de 2 moléculas de agua, proceso realizado por citocromo oxidasa. Una consecuencia directa de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas pueden entregar 1 ó 2 electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos, tales como el (radical) anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que son productores de RL. La citocromo oxidasa es un gran complejo y ensamblado de multiproteínas, que catalizan varios pasos de esta reducción y porque también deben sostener especies tóxicas del oxígeno parcialmente hasta que sean reducidas totalmente a agua (Halliwell, 2006; Jones, 2008; Kunwar y Priyadarsini, 2011), y obteniendo el tan apreciado ATP.

En la Figura 1, se puede observar la confluencia de los caminos químicos iniciados con $O_2^{\cdot-}$ y con NO en la formación del radical HO^{\cdot} (Boveris, 2005). Por un lado, la reducción mitocondrial del O_2 a H_2O , produce parcialmente $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , que por reacciones con iones metálicos como el Fe, provocan la generación de HO^{\cdot} .

Por otro lado, la autooxidación de la ubisemiquinona (UQH·) a ubiquinol, del complejo mitocondrial III, que genera O_2^- , como también la autooxidación de la flavina del complejo I. También, mitocondrialmente, se produce por una interacción de los complejos I y IV, al parecer como un control respiratorio celular, NO, que compite con el O_2 , puede reaccionar con O_2^- , originando peroxinitrito (ONOO-). Este a su vez, se protona a ácido peroxinitroso (ONOOH) y oxidar y nitrar dañando proteínas, lípidos y ADN, donde genera también HO· (reacción en cadena). Finalmente, el proceso de lipoperoxidación, originado por este potente radical común para los mecanismos referidos en principio, que se deterioren lípidos de las membranas celulares, fracturándolas.

Otra fuente importante de radicales libres en una célula, es el agua. 80% de una célula está compuesta de agua. No hay duda que una rutina de la química metabólica en cada célula produce legiones de radicales libres cada hora, en el proceso de “vivir”. Debido a la radiación ionizante a la que se exponen las células (Pala y Tabakçioğlu, 2007). La radiólisis del agua produce radicales HO· directamente involucrando al ADN celular (Pala y Tabakçioğlu, 2007).

LA CADENA BIOLÓGICA DE REACCIONES DE RADICALES LIBRES

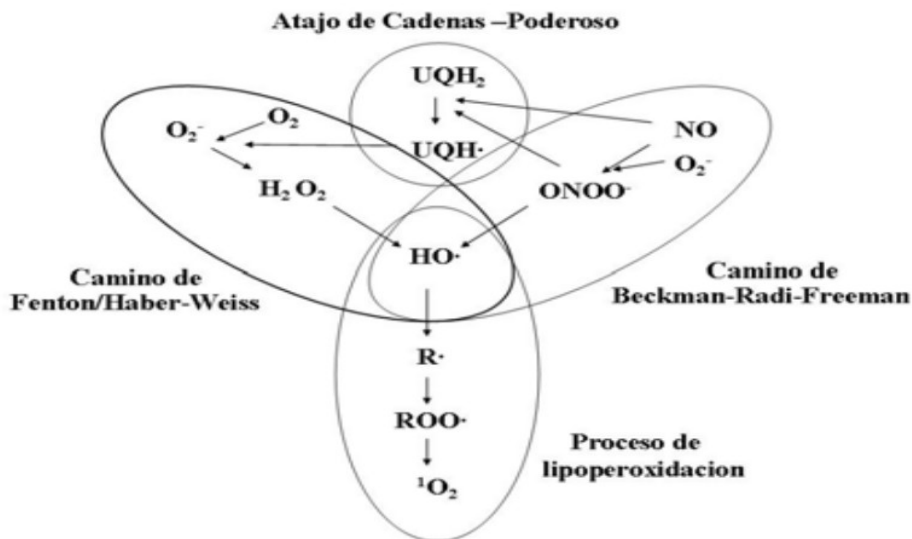


Figura 1: Esquema de las reacciones de radicales libres en los sistemas biológicos (Boveris, 2005).

La producción de estas especies reactivas, tanto de oxígeno como de nitrógeno, tiene propósitos fisiológicos innumerables (Madger, 2006; Pala y Tabakçioğlu, 2007).

Algunos de ellos son:

- Las especies de hierro son cofactores de citocromos P-450 y de las hemoperoxidasas.
- El NO· está involucrado en la regulación del tono vascular.

- El H_2O_2 está involucrado en la síntesis de las hormonas tiroideas.
- Algunas mutaciones inducidas por especies reactivas pueden ser de importancia para los procesos evolutivos permitiendo una respuesta adaptativa a las condiciones cambiantes del ambiente.
- Las especies reactivas afectan la transcripción de genes (en mamíferos, más de 100 genes son regulados por el estado redox celular), la tasa de crecimiento, la proliferación celular, el rol de señalética celular.
- El mecanismo de defensa de los fagocitos contra organismos invasores involucra especies reactivas como el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, lo cual resulta muy efectivo.

4.1) Estrés oxidativo:

La definición en general de Estrés Oxidativo es la formación superior y/o eliminación insuficiente de las moléculas altamente reactivas como las especies reactivas del oxígeno, del nitrógeno, o los precursores de éstos (Crespo-Retes *et al.*, 2010), por lo que trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado (Ames *et al.*, 1993).

De acuerdo a Jones (2008), ha redefinido el concepto, contando con dos diferentes consecuencias mecánicas, el daño macromolecular, y la interrupción del circuito redox de tior, que lleva a señalética celular aberrante y control redox disfuncional. Como se muestra en la Figura 2, el daño macromolecular es comúnmente considerado en términos de mecanismos oxidativos ligados a radicales libres. Los radicales libres son pequeñas, difusibles moléculas que difieren de las moléculas biológicas en que ellas tienen un electrón desapareado. El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes, que resultan en un daño macromolecular y una desorganización de la señalética y control redox. Se han focalizado investigaciones en los mecanismos de daño macromolecular por radicales libres (de un electrón)(izquierda). Aquí se pone atención en el mecanismo alternativo que involucra oxidantes de dos electrones (derecha). Basados en la cinética de la xantina oxidasa, muestra que la reducción univalente del O_2 a radical anión superóxido es siempre una fracción menor de la reducción bivalente hacia H_2O_2 , que puede anticipar la predominancia de los oxidantes de dos electrones durante el estrés oxidante. Aunque la velocidad arbitraria de la generación de oxidantes es igual a 1000, quizás 900 podrían ser de oxidantes de dos electrones y sólo 100 podrían corresponder a oxidantes de un electrón. Los mecanismos de barrido de los radicales libres son eficientes y los convierten en oxidantes no radicales. La velocidad de la producción de oxidante podría ser particionada; si los barredores de radicales son >90% efectivos, entonces podría haber una velocidad de daño macromolecular de <1 y una velocidad de producción de oxidantes de dos electrones igual a >999. Por lo tanto, los oxidantes no radicales contribuyen a la patología de las enfermedades por la desorganización de la señalética redox y de los mecanismos de control, la patología puede correlacionarse con el daño macromolecular y aún siendo relativamente insensible a los barredores de radicales libres. Los oxidantes no radicales (por ejemplo, aldehídos conjugados) también causan daño macromolecular, que pueden desorganizar la señalética redox y las vías de control (no mostradas).

Los radicales libres tienden a ser reactivos y pueden participar en reacciones en cadena en donde un evento de iniciación de un sólo radical libre puede ser propagado para dañar a múltiples moléculas. Los ácidos grasos polinsaturados, que son abundantes en las membranas celulares, son dañadas oxidativamente por reacciones en cadena de radicales libres cuando se exponen al O_2 en presencia de trazas de iones metálicos (lipoperoxidación). Por estudio previos, un sólo evento de iniciación puede dañar oxidativamente 200 a 400 moléculas de lípidos antes que dos radicales se neutralicen y se termine la secuencia de la reacción.

Ya han pasado 40 años donde se ha esclarecido la química de los procesos de los radicales libres sobre los sistemas biológicos y mostrado importante información sobre las defensas antioxidantes de los mismos. Los daños oxidativos, en general, parecen estar ligados a los eventos de iniciación de los radicales libres y no como una consecuencia de las reacciones en cadena (Jones, 2008).

Una diferencia importante entre los estudios de radicales libres aislados y en acción sobre los sistemas biológicos, sería que se generan más oxidantes no radicales en éstos últimos que radicales libres en sí. Un ejemplo de esto es la bien estudiada actividad de la xantina oxidasa, que produciendo el radical anión superóxido (30% del flujo), el producto predominante es el peróxido de hidrógeno (por la dismutación del anterior y que es muy eficiente en transformar oxidantes radicales libres en oxidantes no radicales libres). Los radicales libres de óxido nítrico y de anión superóxido reaccionan para generar el oxidante no radical, peroxinitrito. El oxidante no radical de dos electrones, peróxido de hidrógeno se produce a 1 – 4% de la velocidad de consumo del oxígeno, y es importante como oxidante.

De esta manera, si el estrés oxidativo produce oxidantes radicales y no radicales, los oxidantes no radicales son importantes en cantidad en una enfermedad, por lo que el daño macromolecular sería dependiente del radical libre, correlacionándose con el daño patológico, pero, sería irrelevante al proceso de la enfermedad. La nueva comprensión que se debiera considerar ahora es el oxidante de dos electrones como un componente de estrés oxidativo que se distinga del daño macromolecular mediado por radicales libres.

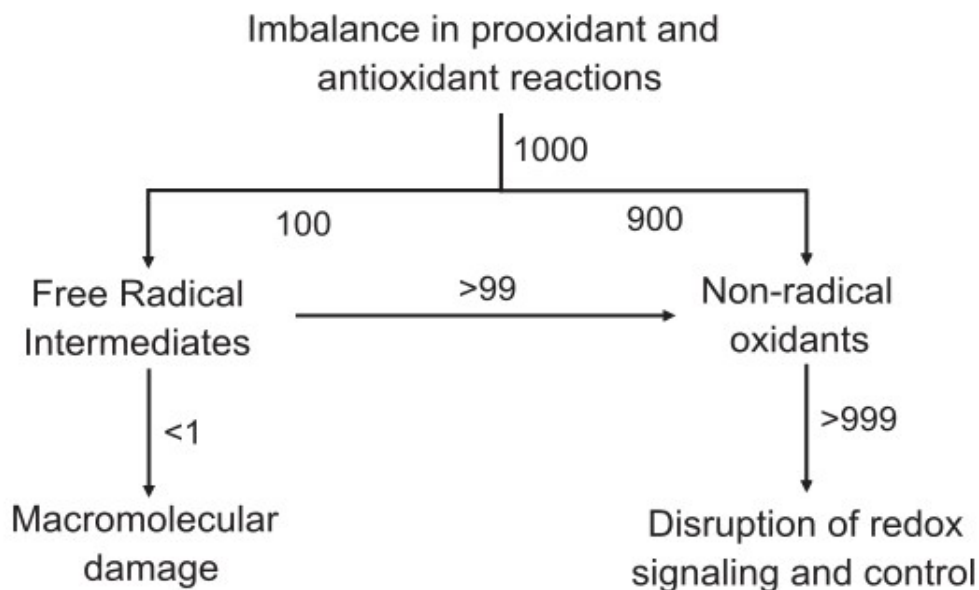


Figura 2: Dos mecanismos de estrés oxidativo (Jones, 2008).

Una observación central es la de los residuos de cisteína sensibles a redox, que experimentan reacciones reversibles de óxido-reducción de dos electrones, comunes en las proteínas (recambio oxidativo de 0.5% de tioles celulares por minuto). Con mucha evidencia disponible, finalmente, Jones indica que, la función de los elementos tioles son sensibles a redox en la señalética y control de virtualmente todos los aspectos de la vida, incluyendo la regulación energética, estructura citoesquelética, transporte, proliferación, diferenciación y apoptosis. La interrupción de estas señaléticas redox y control por oxidantes no radicales libres de dos electrones podría darnos más pistas sobre las patologías ligadas al estrés oxidativo, y es necesario identificar los elementos redox cruciales y comprender su fisiología; por tanto, su posible terapéutica.

Sobrevivir a un ambiente oxidante es en realidad uno de los mayores desafíos que enfrentan los organismos vivos. El concepto que nos entrega gradualmente a una forma de “oxidación” orgánica llevó a la Teoría de los Radicales Libres del Envejecimiento (Pryor *et al.*, 2006).

Las especies reactivas, generadas en situación de estrés oxidante, pueden iniciar procesos patológicos graves y favorecer su progresión debido al impacto que tienen estas especies (tanto de oxígeno, como de nitrógeno), además se han asociado a muchas patologías en el ser humano, como: procesos reumáticos, patologías de tipo gastroentéricas, renales, neurológicas, endocrinas, broncopulmonares, entre muchas otras (Maldonado *et al.*, 2010), que al fin y al cabo son la aceleración del envejecimiento y posterior riesgo de muerte (Monaghan *et al.*, 2009; Garratt *et al.*, 2011).

5.1) Antioxidantes:

El término Antioxidante es muy utilizado actualmente, pero muy pocas veces bien definido para los sistemas biológicos. Por tanto, se ha propuesto que “Antioxidante es cualquier sustancia que presente en concentraciones muy pequeñas comparadas con las de una biomolécula oxidable, disminuye o evita la oxidación de ésta última” (Halliwell, 2000, Hicks *et al.*, 2006; García, 2008). El antioxidante al colisionar con el RL le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil menos tóxico y que en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes.

La protección antioxidante en los sistemas biológicos involucra a una gran variedad de componentes químicos de origen endógeno (que viene genéticamente incorporado) y exógeno (del ambiente adquirido), que interactúan mediante efectos sinérgicos y complementarios, siendo un mecanismo muy flexible y eficiente (Leighton *et al.*, 1999; Velásquez *et al.*, 2004; Monaghan *et al.*, 2009).

Pueden clasificarse en:

Primarios:

- Previenen la formación de nuevos radicales libres, convirtiéndolos en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas. Las defensas antioxidantes de nuestro organismo son indispensables para preservar nuestra salud. De aquí surge la necesidad de conocer la maquinaria con que cuentan los seres vivos para protegerse del daño oxidativo. Nuestro cuerpo tiene un eficiente sistema antioxidante para defenderse de las especies reactivas del oxígeno. Son múltiples los mecanismos antioxidantes con que operan los organismos vivos dependiendo de la especie dañina y del sitio donde se produce.

Ejemplos:

- Glutatión peroxidasa (Gpx), que convierten el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los lipoperóxidos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres.
- Catalasa, que convierte el H_2O_2 en agua y oxígeno.
- Glutatión reductasa, también convierte H_2O_2 en agua y oxígeno, como fuente de electrones reductores la NADPH.
- Glutatión S transferasa. Cataliza la detoxificación de especies reactivas por el traspaso de grupo -SH del glutatión para apagarlos.
- Proteínas que se unen a metales (ferritina, transferrina) y limitan la disponibilidad de hierro necesario para formar el radical $HO\cdot$.

Secundarios:

- Capturan los radicales libres evitando la reacción en cadena. Los antioxidantes dietarios son compuestos que ingerimos a través de la dieta, disminuyen los efectos adversos de las especies reactivas del oxígeno en el cuerpo humano. Son claves para el control de enfermedades crónicas ya que al ser ingeridos su aporte es fácilmente modificable, lo que tiene un enorme significado en medicina preventiva. No obstante existen diferencias importantes en su comportamiento tanto químico como biológico dentro de los organismos.

Algunos de estos antioxidantes dietarios están bien establecidos como la vitamina C, vitamina E, carotenoides, y otros particularmente novedosos como es el caso de los polifenoles (Harborne y Williams, 2000).

El consumo de estos productos de origen natural está asociado al bajo riesgo de incidencias y mortalidad de cáncer y a menores índices de mortalidad por enfermedad coronaria de acuerdo a diversos estudios epidemiológicos (Hertog *et al.*, 1992; Knekt *et al.*, 1996). Los fenoles, especialmente los flavonoides y los antocianos muestran una gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo (Heim *et al.*, 2002; Espin, *et al.*, 2000; Kuskoski *et al.*, 2003; Moyer *et al.*, 2002). Poseen actividades anti-inflamatoria, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana y antineoplásica (Prior *et al.*, 1998; Ross & Kasum, 2002; Sánchez-Moreno, 2002; Satué-Gracia *et al.*, 1997).

Ejemplos:

- Vitamina E o alfa-tocoferol. Antioxidante membranario liposoluble; previene la oxidación de los lípidos. Aumenta su acción en presencia de zinc. Actúa específicamente con el oxígeno singulete y el radical del ácido graso poliinsaturado.
- Vitamina C o ácido ascórbico. Antioxidante del plasma hidrosoluble; poderoso inhibidor de la oxidación de lípidos, regenera a la vitamina E y es protector de los efectos del tabaco. Actúa específicamente con el radical anión superóxido y el radical hidroxilo.
- Beta-caroteno (precursor Vitamina A, antes de ser ingerido y procesado en la mucosa del intestino delgado, y almacenado en hígado en forma de ésteres de retinol).
- Ácido úrico.
- Bilirrubina.
- Albúmina.
- Melatonina. Es un antioxidante potente que altera la actividad de la enzima superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa e inhibe la actividad de la sintasa de óxido nítrico. Se ha reportado que es capaz de neutralizar el radical hidroxilo, radical peroxilo, oxígeno singulete, óxido nítrico y proteínas oxidadas (Reiter *et al.*, 2000; Korkmaz *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2010).

- Estrógenos. Capturan radical hidroxilo y modulan actividad de NADPH oxidasa (que genera radical anión superóxido)(Dantas *et al.*, 2002; Prokai *et al.*, 2003; Uttara *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2010; Borrás *et al.*, 2010), reduciendo la lipoperoxidación de las membranas celulares.
- Polifenoles: flavonoides y no flavonoides. Retardan la degradación oxidativa de los lípidos. Actúan como queladores de metales, antimutágenos y anticarcinogénicos (Gharras, 2009).
- Compuestos glucosinolatos (isotiocianatos), organo-azufrados (dialil-disulfido).

Terciarios:

- Reparar las biomoléculas dañadas por los radicales libres.

Ejemplos:

- Enzimas reparadoras de ADN (endonucleasas, exonucleasas). Metionina sulfóxido reductasa (primer paso en la oxidación de metionina, reversible por acción de reductasa; segundo paso, genera sulfonas, irreversible). El hecho de reciclamiento por reductasas de estos residuos de metionina corresponderían a un mecanismo de protección frente a un daño oxidativo (Andresen *et al.*, 2006).

Finalmente, como puede observarse en la Tabla 3, se pueden medir especies reactivas, defensas antioxidantes, daño oxidativo y de reparación, para determinar marcadores redox que permitan la interpretación de la etiología, fisiopatología y el pronóstico de muchos de los padecimientos crónicos-degenerativos, lo cual es necesario aumentar el número de indicadores bioquímicos para comprender un poco mejor la condición y así permitir un diagnóstico más acertado, y eficacia de su tratamiento (Quintanar y Calderón, 2009; Delgado *et al.*, 2009).

Tabla 3. Métodos para estimar especies reactivas de oxígeno, defensas antioxidantes, daño oxidativo y mecanismos de reparación.

Método	Medición	Muestra	Almacenaje de muestras*	Principio de la prueba y comentarios.
<i>Especies reactivas de oxígeno (EROs).</i>				
Resonancia electrónica de espín (RSE) con trampa de espín*	Intermediarios reactivos de radicales libres	Sangre, tejidos		Agrega un atrapador de molécula que reacciona con EROs para formar radicales más estables que se pueden medir por RSE. Requiere un costoso espectrómetro RSE
Citómetro de flujo	Oxígeno singlete, radical anión superóxido, H ₂ O ₂ , peroxinitrito, radicales hidroxilo.	Sangre, diferentes tejidos	No	Usado en combinación con pruebas que fluorescen cuando se oxidan por EROs específicos; mucho más sensible que las pruebas espectroscópicas.
<i>Defensas antioxidantes.</i>				
Ensayo indirecto con espectrofotometría	Actividad superóxido dismutasa (SOD)	Glóbulos rojos	No	SOD de la muestra compete con el citocromo c por el radical anión superóxido; la actividad se estima como cambios en la absorbancia a 550 nm.
Ensayo indirecto con espectrofotometría	Actividad catalasa (CAT) o glutatión peroxidasa dependiente de Se	Diferentes tejidos (por ejemplo: hígado, músculo)	Sí	La actividad se determina por la desaparición del radical libre. Las muestras necesitan ser congeladas a -70°C inmediatamente después de la disección. Requiere de muestras terminales o biopsias.
Prueba de los Laboratorios Kirial (KRL)	Defensas antioxidantes en glóbulos rojos	Sangre	No	El tiempo necesario de hemólisis 50% de todos los glóbulos rojos cuando atacan los radicales libres. Mide principalmente la resistencia membranal a los oxidantes, por esta razón, está muy ligado a la vitamina E. Requiere de glóbulos frescos, no congelados.
Prueba de absorbente de oxígeno	Capacidad antioxidante	Plasma, yema	Sí	Evaluación colorimétrica de capacidad antioxidante no enzimática para prevenir la oxidación por ácido hipocloroso.
Capacidad antioxidante equivalente a Trolox	Capacidad antioxidante	Plasma, suero	Sí	Evaluación colorimétrica de la capacidad de apagar y decolorar radicales libres cromogénicos.
Capacidad antioxidante total	Capacidad antioxidante no enzimática total	Plasma	Sí	Evaluación colorimétrica de la capacidad de apagar y decolorar radical ABTS+; la medición se compara a estándares interno (Trolox, análogo de vitamina E).
<i>Daño oxidativo.</i>				
Daño a lípidos				
HPLC o GC	Isoprostanos	Plasma, orina, tejidos, fluido seminal, condensado de exhalado	Sí	Medición de isoprostanos en plasma y orina son una medición de "cuerpo completo", pero es propenso a lipoperoxidación por artefacto durante el almacenaje (reducida por la congelación inmediata de almacenaje a -80°C, y la adición de antioxidantes e inhibidores enzimáticos).
Ensayo TBARS (especies reactivas al ácido tiobarbitúrico)	Malondialdehído (MDA)	Plasma, eritrocitos, huevo, diferentes tejidos (hígado, corazón)	Sí	La determinación de MDA espectrofotométricamente luego de la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA). Es simple y barato, pero potencialmente inadecuado ya que TBA reacciona con otros compuestos; la oxidación durante la preparación puede ocurrir también. Algunas modificaciones pueden reducir los problemas.

HPLC con detección de fluorescencia y UV-Vis	MDA	Plasma, suero o condensado de exhalado.	Sí	Aducto MDA-TBA se identifica por HPLC luego de un paso de deproteización. Las condiciones de reacción involucran la incubación a alta temperatura, aunque una potencial oxidación durante la preparación de la muestra puede ocurrir. Usando diaminonaftaleno en vez de TBA elimina arbitrariedades, que es menor en muestras de exhalado.
HPLC	MDA	Plasma	Sí	Plasma libre de proteína es directamente inyectada a HPLC y es mucho más rápida la elución de MDA lo que permite un análisis rápido. El método es preciso y robusto, y la cantidad de plasma necesario es pequeño.
CG	Etano, pentano	Condensado de exhalado	Sí	El etano y pentano son estables por productos de lipoperoxidación del condensado de exhalado. El método ha sido usado para evaluar "el cuerpo completo" de lipoperoxidación.
<i>Daño a proteínas.</i>				
Ensayo de carbonilos	Grupos carbonilos de proteínas	Tejido o plasma	Sí	Los productos de la oxidación de proteínas contienen grupos carbonilos, medidos espectrofotométricamente, HPLC-UV, ELISA o Western blot/Electroforesis luego de la reacción con 2,4 - dinitrofenilhidracina. Los carbonilos son buenos biomarcadores por su relativamente fácil formación durante el estrés oxidativo y alta estabilidad.
HPLC	Semialdehídos gamma-glutámico y aminoacético	Plasma		Mide las mejores contribuciones a los carbonilos totales de las proteínas por HPLC luego de la derivación con fluoresceinamina, o por HPLC fluorimétrico luego de la derivación con agente fluorescente.
<i>Daño a ADN.</i>				
GC-MS	Un amplio rango de bases modificadas en una sola muestra de ADN	Diferentes tejidos	Sí	Puede simultáneamente identificarse y cuantificar las bases de nucleótidos modificados. Existe riesgo de sobreestimación de daño debido a oxidación de artefacto de muestras del ADN durante el procesamiento de las muestras. Se requiere de personal altamente especializado e instrumentación sofisticada, y algunos estándares internos que están disponibles en el mercado.
Ensayo electroforesis en cometa individual	Rotura de cadena de ADN	Linfocitos y diferentes tipos de tejidos	No	La extensión del movimiento del ADN desde células lisadas (visualizado por el uso de ADN teñido fluorescente) en gel de electroforesis depende de la rotura de la cadena o de cambios en el superenrollamiento. También es posible detectar bases oxidadas. Como las cadenas están rotas también ocurre reparación de ADN, pero la rotura no puede ser atribuida solamente al daño por oxidación del ADN, sino también a la inclusión de enzimas específicas de la lesión, por lo que se debe subsanar esta limitación.
<i>Reparación.</i>				
Espectrofotometría	Actividad de proteosoma	Plasma diferentes tejidos	y Sí	Mide la degradación de fluoropéptidos (como quimotripsina y como tripsina) por espectrofotometría.

Ensayo cometa	Actividad de OGG1 (8 – oxoguanina glicosilasa)	Extractos de linfocitos	No	Mide la actividad de OGG1, la enzima en las células mamíferas que remueven la 8 – oxoGua, un indicador específico del daño oxidativo al ADN. El ensayo crea la oxidación de 8 – oxoGua y entonces se mide la actividad enzimática de reparación en el extracto de células lisadas.
---------------	--	-------------------------	----	--

***Si hay o no muestras, pueden ser almacenadas; “No” indica que las muestras necesitan ser analizadas brevemente luego de la colección (<2 días)(Monagham *et al.*, 2009).**

En una revisión bibliográfica respecto de Antioxidantes en baba de caracol, se encontró en España en el 2004, respecto a la eficacia del tratamiento intensivo con la secreción de “*Cryptomphalus aspersa*” * en el fotoenvejecimiento cutáneo (Tribó-Boixareu *et al.*, 2004) y en un artículo respecto de las propiedades regenerativas de la misma especie, también en España (Brieva *et al.*, 2008), afirmando que la secreción pedial contiene gran cantidad de proteínas, ácido hialurónico, gran actividad antioxidante SOD y GSH-T.

Como previamente se realizó un estudio libre de los compuestos existentes en la baba de caracol (metálicos como cobre, hierro, cinc, no así selenio, parte integral de las enzimas antioxidantes del tipo GSH-T), sugiere que el producto que se ha analizado bajo las características de baba de caracol para tratamientos de fotoenvejecimiento cutáneo español, resultaría del animal completo o se maltrata salvajemente (el maltrato animal es un delito), vulnerando la integridad del caracol (riesgo de enfermedad) o simplemente filtrando un jugo de caracol en pos de un “producto saludable”.

Ramos-Vasconcelos y Hermes-Lima (2002) estudiaron el hipometabolismo, defensas antioxidantes del tipo CAT, SOD, Se-GPX, GR, GST y G6PDH y metabolismo de radicales libres en el caracol de tierra *Helix aspersa*, en donde las mayores actividades antioxidantes del tipo CAT, SOD, Se-GPX, GR, GST y por supuesto actividad G6PDH se originan del hepatopáncreas y músculo del pie una vez que sale de la dormancia estacionaria e inicia su actividad.

*N. de la A. Que por un error tipográfico y taxonómico se habla de *Cryptomphalus aspersa*, según Gerber (2000), pero no hay acuerdos al respecto entre los investigadores malacólogos, por los nuevos estudios moleculares (Wade *et al.*, 2007) que, hacen que se continúe identificando como *Helix aspersa*, según su determinante original, el naturalista danés, Otto Friedrich Müller, que lo caracterizó en 1774 y equipos italianos liderados por Manganeli (2005) y ucranianos-rusos, liderados por Sverlova (2006), Egorov (2008), Sysoev y Schileyko (2009) que no aceptan la interpretación de Gerber.

II HIPÓTESIS DE TRABAJO

Dada la aplicación de preparaciones en base a la secreción pedial de *Helix aspersa* Müller como productos antienvjecimiento, se postula que los compuestos presentes en esta secreción poseerían propiedades antioxidantes.

III OBJETIVOS

1.3) OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la capacidad antioxidante total de la secreción pedial y de los preparados conteniendo secreción pedial de *Helix aspersa* Müller.

2.3) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar la capacidad antioxidante total de los preparados, en particular, de la secreción pedial, por el método DPPH.
- Evaluar el contenido fenólico de los preparados, en particular, la secreción pedial, por el método Folin-Ciocalteu.
- Evaluar la contribución de los distintos componentes (materias primas) a la capacidad antioxidante de los tres productos elaborados con secreción pedial.

IV MATERIALES Y MÉTODOS

1.4) Muestras a analizar para DPPH y Folin-Ciocalteu:

Tres productos elaborados en base a baba de caracol potenciada biológicamente: Melihel, Amelixil e Hiperjarabe.

Ingredientes generales:

A = Aceite vegetal, sin preservantes, Natura®. 1 L.

B = Baba de caracol extraída de acuerdo a condiciones determinadas por estudio anterior (datos no publicados). 1 L.

G = Gel base agua, Carbopol 940, pH 5.5 – 6.9. 1 Kg.

H = Hiperjarabe (extracto de hierbas medicinales). 500 mL.

J = Jarabe de azúcar y miel de abejas. 500 g.

P = Preservantes de uso farmacéutico (sorbato de potasio, ácido cítrico y benzoato de sodio). 500 g.

R = Solución alcohólica 40° de romero y manzanilla. 500 mL.

Melihel (gel de uso dérmico):

A = Aceite vegetal, sin preservantes, Natura®.

B = Baba de caracol extraída de acuerdo a condiciones determinadas por estudio anterior (datos no publicados).

G = Gel base agua, Carbopol 940.

P = Preservantes de uso farmacéutico (sorbato de potasio, ácido cítrico y benzoato de sodio).

R = Solución alcohólica 40° de romero y manzanilla.

Amelixil (elíxir mucolítico):

B = Baba de caracol extraída de acuerdo a condiciones determinadas por estudio anterior (datos no publicados).

J = Jarabe de azúcar y miel de abejas.

P = Preservantes de uso farmacéutico (sorbato de potasio, ácido cítrico y benzoato de sodio).

R = Solución alcohólica 40° de romero y manzanilla.

Amelixil versión Hiperjarabe (elíxir mucolítico más hierbas medicinales):

B = Baba de caracol extraída de acuerdo a condiciones determinadas por estudio anterior (datos no publicados).

H = Hiperjarabe (extracto de hierbas medicinales).

J = Jarabe de azúcar y miel de abejas.

R = Solución alcohólica 40° de romero y manzanilla.

P = Preservantes de uso farmacéutico (sorbato de potasio, ácido cítrico y benzoato de sodio).

Los productos completos (Melihel, Amelixil e Hiperjarabe) tienen los siguientes porcentajes de sus materias primas:

PRODUCTOS	MELIHEL	AMELIXIL	HIPERJARABE
INGREDIENTES	%	%	%
A	1,00	0,00	0,00
B	50,00	50,00	50,00
G	46,50	0,00	0,00
H	0,00	0,00	10,00
J	0,00	47,70	37,70
P	0,50	0,30	0,30
R	2,00	2,00	2,00
TOTAL %	100,00	100,00	100,00

2.4) Reactivos Análisis Capacidad Antioxidante y Fenoles:

- DPPH, Radical libre, Sigma-Aldrich, para análisis.
- Folin-Ciocalteu (reactivo fenol), 2.0 N, Sigma, 500 mL.
- Na₂CO₃, Sigma, 1 K, para análisis.
- CH₃OH al 80%, JT Baker, para análisis.
- CuSO₄.5H₂O, Sigma, de análisis.
- KNaC₄H₄O₆.4H₂O, Mallinckrodt, 400 g, para análisis.
- TROLOX, Fluka Chemika, 5 g, ≥98%, para análisis.

3.4) Equipos:

- Espectrofotómetro Cecil CE2041 2000 Series (Análisis Capacidad Antioxidante DPPH).
- Espectrofotómetro UV-120-01 Shimadzu (Análisis Fenoles).

4.4) Análisis Estadístico de los datos:

Debido a que las materias primas son las mismas desde un comienzo para la fabricación de las muestras a analizar, sobre todo, Baba de caracol, extraída en condiciones controladas para mejorar la cantidad de Alantoina (de acuerdo a estudio de la propia autora; Herrera, 2002), para la manufactura de productos biológicos en serie, no habrían diferencias estadísticas demostrables entre las muestras, porque son dependientes unas de otras, no poseen variabilidad y por lo tanto, no existen medias comparables, por ser una pseudoreplicación simple (Hurlbert, 1984).

En el análisis de capacidad antioxidante por medio del método DPPH, se realizó sólo una medición al ser un ensayo largo y con disponibilidad limitada de reactivos. En el de contenido fenólico, se hicieron 3 repeticiones.

5.4) Método de Folin-Ciocalteu, determinación del contenido de grupos fenólicos totales:

El método de Folin-Ciocalteu mide los grupos OH en una muestra basada en el hecho de que aumenta la absorción de luz a medida que los grupos OH en una muestra aumentan. Por lo tanto, este método no mide la cantidad exacta de polifenoles, porque los polifenoles no son los únicos compuestos que tienen grupos OH.

El contenido total de fenoles fue estimado por la oxidación de éstos, de acuerdo a Singleton *et al.* (1999), donde a 1 mL de muestra se le agregan 5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y luego de 7 min, se le incorporan 4 mL de carbonato de sodio al 7.5% p/v. Se incuba a temperatura ambiente por 2 horas en oscuridad.

Se determina absorbancia a 740 nm por triplicado.

Se prepara una solución de Trolox 5 μ M.

Se obtiene el contenido de grupos fenólicos totales en Equivalentes Trolox (μ M).

6.4) Capacidad antioxidante mediante el método DPPH:

Se desarrolló en base al método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995), y modificado por Kim *et al.* (2002).

Se prepara el radical DPPH 50 μ M en metanol al 80% cada vez que se va a proceder a la medición espectrofotométrica de la capacidad antioxidante de las muestras. En la cubeta de reacción (3 mL), 2.9 mL de solución DPPH se le agregan 0.1 mL de cada muestra a analizar, la mezcla se homogeniza cuidadosamente y se lee inmediatamente. Las mediciones de absorbancia a 517 nm se realizaron por cada minuto por 15 min. Se ajustó antes de iniciar la lectura con un blanco de metanol al 80% y luego la lectura de una solución de DPPH con metanol al 80% como control.

Los Equivalentes Trolox (μ M) resultantes de esta reacción, se obtienen por medio de una curva de calibración "Equivalentes Trolox v/s DPPH".

V RESULTADOS

1.5) Método de Folin-Ciocalteu, determinación del contenido de grupos fenólicos totales:

Gráfico 1: Contenido total de Grupos fenólicos en Materias primas.

Abreviaturas: A=Aceite; B=Baba; G=Gel; H=Extracto Hiperjarabe; J=Jarabe; P=Preservantes; R= Extracto Romero/Manzanilla.

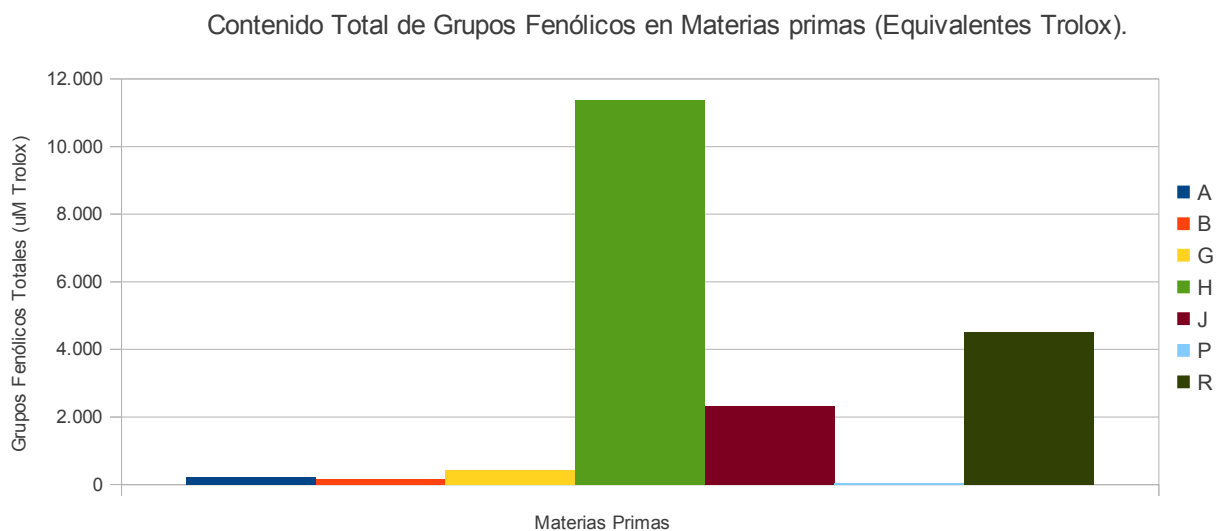
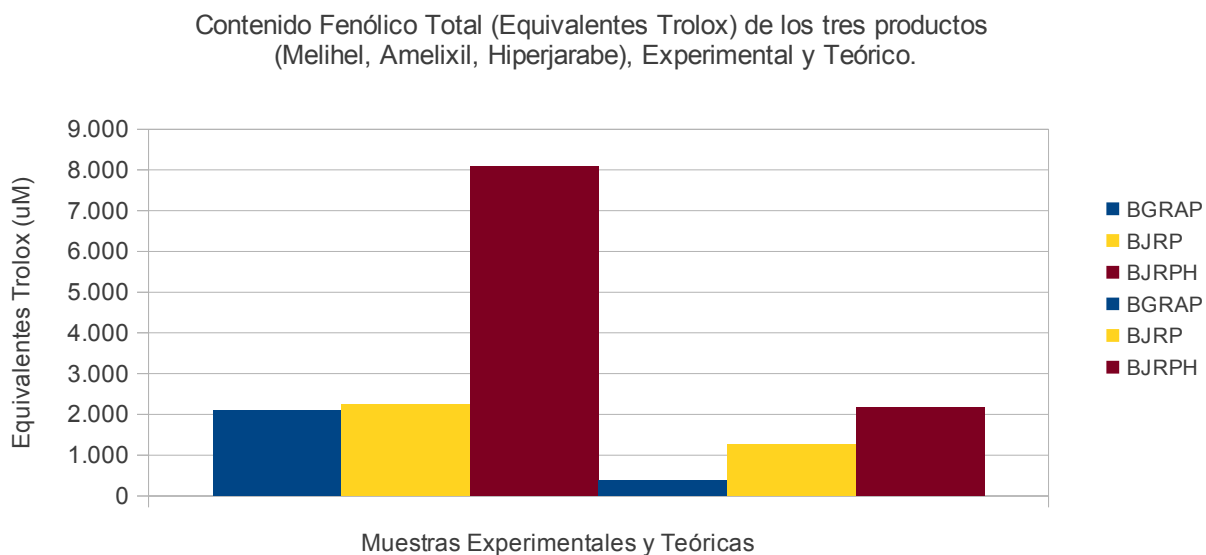


Gráfico 2: Contenido total de Grupos fenólicos de los tres productos con secreción pedial, experimental y teórico.



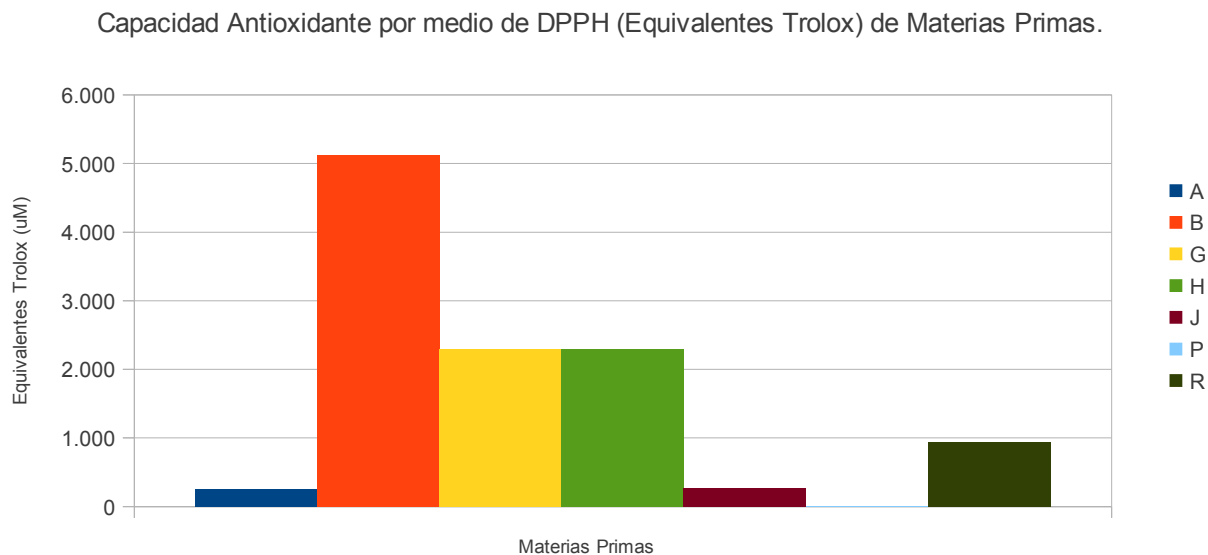
Abreviaturas: Materias Primas: A=Aceite; B=Baba; G=Gel; H=Extracto Hiperjarabe; J=Jarabe; P=Preservantes; R= Extracto Romero/Manzanilla. Productos: Melihel=BGRAP; Amelixil=BJRP; Hiperjarabe=BJRPH.

Como puede observarse en el Gráfico 1, las Materias primas presentan cierto contenido fenólico total muy diferente cuando éstos se encuentran combinados en los Productos finales (Melihel, Amelixil, Hiperjarabe).

En relación al Gráfico 2 de comparación entre los tres productos sobre contenido fenólico total, experimental y teórico (calculado desde los de las materias primas), se ve gran diferencia, a favor de los experimentales (más altos que los valores teóricos).

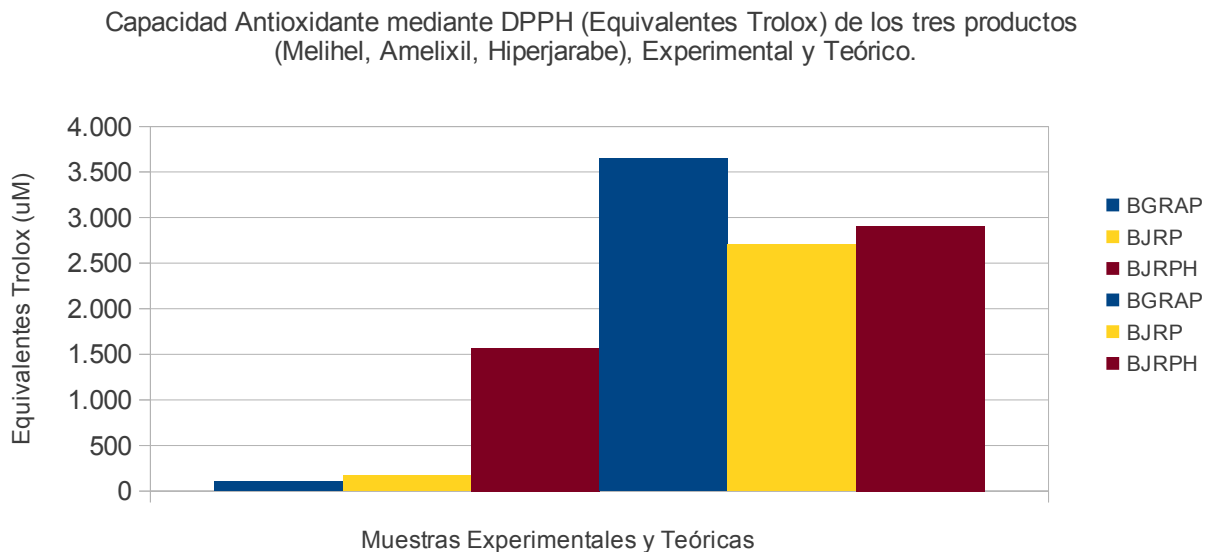
2.5) Capacidad antioxidante mediante el método DPPH:

Gráfico 3: Capacidad antioxidante total de Materias primas, por medio de DPPH.



Abreviaturas: A=Aceite; B=Baba; G=Gel; H=Extracto Hiperjarabe; J=Jarabe; P=Preservantes; R=Extracto Romero/Manzanilla.

Gráfico 4: Capacidad antioxidante total de los tres productos con secreción pedial, por medio de DPPH, experimental y teórico.



Abreviaturas: Materias Primas: A=Aceite; B=Baba; G=Gel; H=Extracto Hiperjarabe; J=Jarabe; P=Preservantes; R= Extracto Romero/Manzanilla. Productos: Melihel=BGRAP; Amelixil=BJRPH; Hiperjarabe=BJRPH.

De acuerdo a los resultados en el Gráfico 3, la capacidad antioxidante de las materias primas y por tanto, de los tres productos elaborados, no se correlacionan con los contenidos fenólicos totales de los mismos.

Posiblemente, la secreción pedial esté interactuando con las materias primas cuando se elaboran los productos finales.

En el caso de la comparación de los valores experimentales con los teóricos, en el Gráfico 4, también se ven grandes diferencias (alto contenido fenólico, baja capacidad antioxidante, en resultados experimentales).

Tabla 4: Porcentaje de Contribución Contenido Fenólico Total y Capacidad Antioxidante de los tres Productos (Melihel, Amelixil e Hiperjarabe).

Materias Primas	Porcentaje Contribución Capacidad Antioxidante Productos finales					
	Melihel		Amelixil		Hiperjarabe	
	Folin (uM Trolox)	DPPH (uM Trolox)	Folin (uM Trolox)	DPPH (uM Trolox)	Folin (uM Trolox)	DPPH (uM Trolox)
A	<1	<1	-	-	-	-
B	21	70	6	95	3	88
G	54	29	-	-	-	-
H	-	-	-	-	52	8
J	-	-	87	4	40	3
P	<1	<1	<1	<1	<1	<1
R	25	1	7	1	4	1
TOTAL %	100	100	100	100	100	100

En la Tabla 4 arriba presentada, el porcentaje de contribución de la capacidad antioxidante en los productos finales, gracias a sus materias primas, en el caso de la secreción pedial B colabora con más del 50% (en DPPH), pero con bajo contenido fenólico 3-21%. Los extractos vegetales H y R y el jarabe J (con miel de abejas) entregan gran contenido fenólico (%) pero bajo en capacidad antioxidante por medio de DPPH (%). En el caso de gel G, su % de contenido fenólico y capacidad antioxidante por medio de DPPH son altos en relación al resto de las materias primas.

VI DISCUSIÓN

Es muy interesante observar que las materias primas poseen alto contenido fenólico pero baja capacidad antioxidante en los productos finales.

De acuerdo a los resultados presentados, para el Folin realizado, el producto que posee una mayor cantidad de grupos fenólicos es Hiperjarabe (experimental y teórico), a pesar de que posee la misma cantidad de baba de caracol (50%) que los otros dos productos que siguen en ese orden (Amelixil y Melihel), las diferencias encontradas se deben a las distintas combinaciones de las materias primas. Melihel es un gel (sólido) a base de carbómero que a pH alto, se reestructuran sus diversos componentes y estabilizan sus grupos funcionales, los cuales reaccionan con los reactivos reveladores de grupos fenólicos. En cambio, Hiperjabare (líquido, al igual que Amelixil), se diferencia en el extracto vegetal H, donde la cantidad de grupos fenólicos se dispara considerablemente, pero en el producto final, existe uno mucho más bajo. A pesar de esto, y tal vez, del bajo contenido fenólico de la baba de caracol, hay un mayor aporte de grupos fenólicos de acuerdo a las combinaciones de los ingredientes para los tres productos.

Para la medición de la Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox (uM), Hiperjarabe tiene la mayor cantidad mediante el método DPPH, siguiéndole, Amelixil y luego Melihel.

En el método DPPH y en el Índice Folin, existe una reacción por transferencia de electrones, SET, donde el antioxidante le transfiere un electrón al radical libre, metal o carbonilo, reduciéndolo (en el caso de DPPH, el radical es el propio DPPH, un radical orgánico nitrogenado y estable; en Folin, el ácido fosfomolibdotúngstico que oxida). Estas reacciones dependen del potencial de ionización.

Hay que tener claro además que el Folin muestra en general los grupos fenólicos totales que poseen una muestra, y no qué tipos de moléculas antioxidantes posee. También por sí sólo, el Folin no entrega información sobre las posibles interacciones sinérgicas o antagónicas de las moléculas presentes en las muestras, y es indudable que en las muestras con baba de caracol, aumentan o disminuyen las cantidades de los grupos fenólicos sin saber más acerca del contenido, y aumenten su contenido cuando se encuentran todas las materias primas en un producto final. En un análisis a los químicos puros como referencia, Ácido glicólico y Alantoína, tienen una capacidad antioxidante por medio de DPPH de 6.424 y 388 Equivalentes Trolox (uM), respectivamente. Respecto de Antioxidantes enzimáticos, hay presencia de SOD pero no de CAT en la baba de caracol (datos no publicados).

Respecto a qué tipo de polifenoles se encuentran en la baba de caracol, sólo Campion (1956) habla de una "flavona", que es el pigmento que le da la coloración amarillo-naranja a la baba en un opérculo seco en los estados de dormancia, por lo que habría que analizar posteriormente qué tipos de flavonoides podrían encontrarse y si tienen mayor relación con la capacidad antioxidante obtenida acá en este estudio.

De acuerdo a la contribución de las materias primas en los productos finales, la secreción pedial de *H. aspersa* M. contribuye con más del 50% en la capacidad antioxidante mediante DPPH, pero con bajo contenido fenólico.

VII CONCLUSIONES

La Capacidad Antioxidante encontrada por medio del método DPPH, de los productos elaborados con secreción pedial potenciada biológicamente, son bajos, tanto para Melihel, como para Amelixil. Hiperjerabe posee una alta Capacidad Antioxidante pero, se vence antes de tiempo, por lo que se descarta su producción.

Los polifenoles de la baba se complementan con los polifenoles agregados con las materias primas vegetales, como aceite, extracto alcohólico de romero/manzanilla, jarabe (de miel de abejas) y el extracto Hiperjarabe (plantas medicinales mucolíticas). Lamentablemente, y quizás sea esa la razón, el producto Hiperjarabe, al tener el extracto de plantas medicinales (a diferencia de Amelixil), interacciona negativamente con los otros componentes del jarabe, por lo que dura menos tiempo (medio año) que Amelixil (duración de un año desde la fecha de elaboración).

Melihel y Amelixil son buenos productos con alta capacidad antioxidante. Sus materias primas no son tóxicas y la baba o secreción pedial de caracol es potenciada biológicamente para aumentar sus cualidades.

VIII PROYECCIONES

Es necesario practicar un nuevo análisis para determinar el tipo de antioxidantes contenido en la secreción pedial de caracol (qué tipo de polifenoles se encuentran, si existe alguno del tipo flavona), ya que los análisis practicados en el presente estudio, no son suficientes, y tal vez, se obtenga mayor interrelación respecto de la capacidad antioxidante y el comportamiento de las distintas moléculas antioxidantes de los tres productos elaborados con secreciones pediales de *Helix aspersa* Müller, potenciados biológicamente, tanto materias primas por separado, como en su combinación final.

También sería necesario analizar la capacidad antioxidante de la secreción pedial a lo largo de un año para comparar contenido y capacidad antioxidante entre estaciones del año, ya que están relacionados los componentes de interés en la secreción, como Alantoína con Ácido glicólico y Ácido glucurónico a temperatura, humedad ambiental y condiciones alimenticias.

Además, sería interesante diseñar, implementar y medir algún sistema *in vivo* por el cual probar los productos y las propiedades descritas anteriormente.

MISCELÁNEOS

Figura 3: Productos estudiados con baba de caracol:



MELIHEL, GEL HUMECTANTE-REFRESCANTE PARA LA PIEL



AMELIXIL Y AMELIXIL VERSIÓN HIPERJARABE, ELÍXIR CON BABA DE CARACOL

Tabla 5: Contenido fenólico total Folin y capacidad antioxidante por medio de DPPH de las materias primas de los tres productos con secreción pedial.

	uM Trolox	uM Trolox
Materias Primas	Folin	DPPH
A	215	247
B	152	5.118
G	429	2.294
H	11.372	2.294
J	2.314	265
P	48,7	10,6
R	4.526	935

Abreviaturas: A=Aceite; B=Baba; G=Gel; H=Extracto Hiperjarabe; J=Jarabe; P=Preservantes; R= Extracto Romero/Manzanilla.

Tabla 6: Contenido fenólico total Folin y capacidad antioxidante por medio de DPPH de los tres productos con secreción pedial (valores experimentales).

	uM Trolox	uM Trolox
Productos	Folin	DPPH
Melihel		
BGRAP	2.096	106
Amelixil		
BJRP	2.244	173
Hiperjarabe		
BJRPH	8.077	1.571

Tabla 7: Contenido fenólico total Folin y capacidad antioxidante por medio de DPPH de los tres productos con secreción pedial (valores teóricos).

	uM Trolox	uM Trolox
Productos	Folin	DPPH
Melihel		
BGRAP	368	3.647
Amelixil		
BJRP	1.270	2.704
Hiperjarabe		
BJRPH	2.176	2.907

IX BIBLIOGRAFÍA

- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 7915-22, 1993.
- Andresen, M., Regueira, T., Leighton, F. Oxidative stress in critically ill patients. Rev Med Chile 134: 649 – 656, 2006.
- Borrás, C., Gambini, J., López-Grueso, R., Pallardó, F. V., Viña, J. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. Biochimia et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease 1802 (1): 205 – 211, 2010.
- Boveris, A. La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. Ars Pharm 46(1): 85 – 95, 2005.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. Technol. 22: 25-30, 1995.
- Brieva, A., Philips, N., Tejedor, R., Guerrero, A., Pivel, J.P., Alonso-Lebrero, J.L., and Gonzalez S. Molecular basis for the regenerative properties of a secretion of the mollusk *Cryptomphalus aspersa*. Skin Pharmacol Physiol, January 1, 21(1): 15-22, 2008.
- Campion, M. The structure and function of the cutaneous glands in *Helix aspersa*. Journal of Microscopical Science, Jun. Vol. 102, parte 2: 195-216, 1961.
- Comporti, M. Free radicals, oxidative stress and antioxidants. Journal of the Siena Academy of Sciences, vol 2, n°1, 2010.
- Crespo-Retes, I., Crespo-Pereda, J. P., Crespo-Pereda, M. T., Baiocchi, M. P. Oxidative stress, link between basic sciences and clinical practice. Rev Per Ginecol Obstet 56: 92 – 100, 2010.
- Dantas, A. P. V., Tostes, R. C. A., Fortes, Z. B., Costa, S. G., Nigro, D., Carvalho, M. H. C. In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. Hypertension 39 (part 2): 405 – 411, 2002.
- Delgado, R., L., Martínez, S., G., Díaz, B., A. Determination of oxidative stress markers in cardiovascular disease patients. Acta Bioquím Clín Latinoam 43 (3): 307 -13, 2009.
- Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 82: 47 – 95, 2002.
- Espin, J.C., Sololer-Rivas, C., Wichers, H.J., García-Viguera, C. Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. J. Agric. Food Chem 48: 1588-1592, 2000.
- Fridowich, I. The Biology of oxygen radicals. Science. 201: 875-88, 1978.
- Gabriélidès, A. Trachoma and trichiasis among the ancient greeks. Rev. Intern. du Trachome 9: 93. April, 1932.

- García, P., M. C. Antioxidantes en la dieta Mediterránea. *Nutrición Clínica en Medicina*. Diciembre, Vol. II, n°3: 129 – 140, 2008.
- Garratt, M., Vasilaki, A., Stockley, P., McArdle, F., Jackson, M., Hurst, J. L. Is oxidative stress a physiological cost of reproduction? An experimental test in house mice. *Proc. R. Soc. B* 278: 1098 – 1106, 2011.
- Gharras, H. E. Original article. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *International Journal of Food Science and Technology* 44: 2512 – 2518, 2009.
- Halliwell, B., Gutteridge J.M.C. *Free radical in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press 1: 142, 1989.
- Halliwell, B. The antioxidant paradox. *The Lancet*. 355: 1179-84, 2000.
- Halliwell, B. Reactives especies and antioxidants. Redox Biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, June, Vol. 141: 312 – 322, 2006.
- Harborne, J. B., Williams, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 52: 481-504, 2000.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13: 572-584, 2002.
- Hertog, M.G.I., Hollman, P.C.H., Katan, M.B. Content of potentially anti-carcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2379-2383, 1992.
- Hicks, J. J., Torres-Ramos, Y. D., Sierra-Vargas, M. P. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, Vol. 14, n°4, Octubre-Diciembre: 223 – 226, 2006.
- Hurlbert, S.H. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs. Ecological Society of America* 54(2): 187-211, 1984.
- Jones, D. P., Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C849 - C868, 2008.
- Kim, D-O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 50: 371-3717, 2002.
- Knekt, P., Järvinen, R., Reunanen, A., Matela, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *British Medical J.* 312: 478-481, 1996.
- Korkmaz, A., Reiter, R. J., Topal, T., Manchester, L. C., Oter, S., Tan, D. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med* 15 (1 – 2): 43 – 50. Jan – Feb, 2009.
- Kunwar, A., Priyadarsini, K. I. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *J Med Allied Sci* 1(2): 53 – 60, 2011.

- Kuskoski, E.M., Vega, J.M., Rios, J.J., Fett, R., Troncoso, A.Mm., Asuero, A.G. Characterization of anthocyanins from the fruits of baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg). *J. Agric. Food Chem.* 51: 5450-5454, 2003.
- Leighton, P., F., Urquiaga, R., I., Casanegra, P., P. Inestrosa, C., N., Maiz, G., A. Antioxidantes naturales y salud humana. El consumo de frutas, verduras y vino aportan antioxidantes naturales claves para la salud. *Boletín Ciencia, Vino y Salud.* Vol. 3, n°2, Noviembre, 1999.
- Magder, S. Review. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Critical Care* 10: 208, 2006.
- Maldonado S., O., Jiménez V., E. N., Guapillo V., M. R., Ceballos R., G. M., Méndez B., E. Free radicals and their role in chronic-degenerative diseases. *Rev Med UV,* Julio – Diciembre, 2010.
- Monaghan, P., Metcalfe, N. B., Torres, R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters* 12: 75 – 92, 2009.
- Moyer, R., Hummer, K. E., Finn, C.E., Frei, B., Wrolstad, R.E. Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: *Vaccinium, Rubus,* and *Ribes.* *J. Agric. Food Chem.* 50: 519-525, 2002.
- Pala, F. S., Tabakçioğlu, K. Review. Free Radicals: Our enemies or friends? *Advances in Molecular Biology* (1): 63-69, 2007.
- Prior, R.I., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., Mce-Wan, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., Mainland, C.M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* specie. *J. Agric. Food Chem* 46: 2686-2693, 1998.
- Prokai, L., Prokai-Tatrai, K., Perjesi, P., Zharikova, A. D., Perez, E. J., Liu, R., Simpkins, J. W. Quinil-based cyclic antioxidant mechanism in estrogen neuroprotection. *PNAS,* Sept 30, Vol. 100, 20: 11741 – 11746, 2003.
- Pryor, W. A., Houk, K. N., Foote, C. S., Fukuto, J. M., Ignarro, L. J., Squadrito, G. L., Davies, K. J. A. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R491 – R511, 2006.
- Qin, F., Lennon – Edwards, S., Lancel, S., Biolo, A., Siwik, D. A., Pimentel, D. R., Dorn, G. W., Kang, Y. J., Colucci, W. S. Cardiac-specific overexpression of catalase identifies hydrogen peroxide-dependent and -independent phases of myocardial remodeling and prevents the progression to over heart failure in *Gαq*-overexpressing transgenic mice. *Circ Heart Fail.* 3: 306 – 313, 2010.
- Quintanar, E., M. A., Calderón, S., J. V. La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Ed Bioquímica,* Vol. 28, 3: 89 – 101. Septiembre, 2009.
- Rahman, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging* 2(2): 219 – 236, 2007.
- Ramos-Vasconcelos, G.R., Hermes-Lima M. Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa.* *The Journal of Experimental Biology* 206: 675-685, 2002.

- Reiter, R. J., Tan, D., Osuna, C., Gitto, E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *Journal Biomedical Science* 7: 444 – 458, 2000.
- Ross, J.A., Kasum, C.M. Dietary Flavonoids: Bio-availability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.*, 22, 19-34, 2002.
- Sánchez-Moreno, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. *Alimentaria.*, ene-feb, 29-40, 2002.
- Satué-Gracia, M.T., Heinonen, M., Frankel, E.N. Anthocyanin as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3362-3367, 1997.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299: 152-178, 1999.
- Tan, D., Hardeland, R., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Korkmaz, A., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Fuentes – Broto, L., Reiter, R. J. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biological Reviews*. Vol 85, Issue 3 August: 607 – 623, 2010.
- Tribó- Boixareau, M.J., Parrado-Romero, C., Rais B., Rius-Díaz, F., González-Rodríguez, S., Vitale-Villarejo, M. A. Resultados preliminares de la eficacia del tratamiento intensivo con la secreción de *Cryptomphalus aspersa* (SCA) en la terapéutica del fotoenvejecimiento cutáneo. *Met Cutan Iber Lat Am* 32(6): 265-270, 2004.
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., Mahajan, R. T. Oxidative stress and neurodegeneration diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology* 7: 65 – 74, 2009.
- Vargas, F., Rivas, C., Nursama, A., Zoltan, T. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances en Química*, 2(2): 3-15, 2007.
- Velásquez, P., M., Prieto, G., B., Contreras, P., R. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias* 75, Julio – Septiembre, 2004.
- Wade, C.M., Hudelot, C., Davison, A., Naggs, F., Mordan, P.B. Molecular phylogeny of the helicoid land snails (Pulmonata: Stylommatophora: Helicoidea), with special emphasis on the Camaenidae. *J. Mollus. Stud.* 73 (4): 411-415, 2007.

OTROS:

- Base de datos animales:
<http://www.animalbase.uni-goettingen.de/zooweb/servlet/AnimalBase/home/species?id=1381>
- *Cryptomphalus aspersa* (1 vez nombrado) sino más bien como *Helix aspersa* (8 veces nombrado)
<http://www.organismnames.com/query.htm?q=Helix+aspersa&Submit.x=0&Submit.y=0&searchType=simple&so=a0&pp=10>
- Bonnemain B. Review: Helix and Drugs: Snails for Western Health Care From Antiquity to the Present. Advance Access Publication 28 January eCAM 2(1): 25–28, 2005.
- Galindo V., H. E., Suárez Del P., C. A., P. G. Jasme M., M. E. Diseño de un Plantel para la Crianza y Procesamiento a Nivel Industrial del Caracol de Tierra *Helix aspersa* Müller. Memoria de Ingeniero Civil Bioquímico. Valparaíso, PUCV. Facultad de Ingeniería. 1997.
- Herrera, A. Estudio de la interrelación entre dieta alimenticia y calidad de las secreciones pediales en *Helix aspersa* Müller. Tesis Pregrado Biólogo. PUCV, 2002.
- Herrera, A. Caminando como Caracoles: Manual Manual de Crianza del Caracol de Jardín *Helix aspersa* Müller para Chile. Inscripción Registro Propiedad Intelectual n° 136739. Autor e Impresor: Amelia Cristina Herrera Briceño. Octubre, 2003.
- Kantor, Y.I., Vinarski, M.V., Schileyko, A. A., Sysoev, A.V. Catalogue of the continental mollusks of Russia and adjacent territories. Online www.ruthenica.com/.../Continental_Russian_molluscs_ver2-3-1.pdf. 2009.
- Luna L., A. Mecanismos endógenos de generación de especies reactivas de oxígeno y respuesta celular antioxidante ante el estrés oxidativo. Instituto de Geriatria, México. <http://www.geriatria.salud.gob.mx>. 2012.
- Marasco, F., Murciano, C. Guía Completa de la Cría de Caracoles. Sistema de Helicicultura de Ciclo Biológico Completo. Editorial de Vecchi. Barcelona, España. 2000.
- Schmidt-Hebbel, H., Pennacchiotti, I., Masson, L., Mella, M.A. Tabla de Composición química de los alimentos chilenos, 8va Edición. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química, Universidad de Chile. 1992.
- Serrano L., A. Asociación Nacional de Helicicultura y Helicicultura, Italia, 2001. <http://www.helicicultura.com>, asochelix@helicicultura.com, <http://www.lumache-elici.com/>, ist.elicicultura@tin.it. 2001.

DOCUMENTO REALIZADO ÍNTEGRAMENTE POR LIBREOFFICE 3.4.4
OOO340M1 (BUILD:402) UBUNTU. COPYRIGHT © 2000, 2010 DE LOS CONTRIBUYENTES DE
LIBREOFFICE Y/O SUS AFILIADOS. TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS.
ESTE PRODUCTO FUE CREADO POR UBUNTU, CON BASE EN OPENOFFICE.ORG, QUE TIENE
COPYRIGHT 2000, 2010 DE ORACLE Y/O SUS AFILIADOS.
¡SOFTWARE LIBRE!

MELINNICRI@GMAIL.COM

TESIS INSCRITA EN PROPIEDAD INTELECTUAL LEY 17.336
POR AMELIA HERRERA BRICEÑO, CHILE, 2013.
DERECHOS RESERVADOS