

Artículo

Hidrolato de saúco: exploración del perfil químico y antioxidante Potencia y antigenotoxicidad para aplicaciones cosméticas.

Sara Goncalves 1,2,3,* , Francisco Peixoto 4 , Katja Schoss 5 , Nina Kočevár Glavač 5 , Isabel Gaivão 2,3 

- ¹ Centro Clínico Académico de Trás-os-Montes y Alto Douro (CACTMAD), Universidad de Trás-os-Montes y Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal Centro de
- ² Ciencias Animales y Estudios Veterinarios (CECAV), Departamento de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias de la Vida y del Medio Ambiente, Universidad de Trás-os-Montes y Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal; igaivao@utad.pt Laboratorio
- ³ Asociado de Ciencias Animales y Veterinarias (AL4AnimalS), Universidad de Trás-os-Montes y Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal Centro de Química de
- ⁴ Vila Real (CQVR), Departamento de Biología y Medio Ambiente, Universidad de Trás-os-Montes y Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal; fpeixoto@utad.pt Departamento de
- ⁵ Biología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Ljubljana, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana, Eslovenia; katja.schoss@ffa.uni-lj.si (KS); nina.kocevar.glavac@ffa.uni-lj.si (NKG)

* Correspondencia: sgoncalves@utad.pt

Resumen: El hidrolato de saúco (*Sambucus nigra* L.), derivado de la destilación doméstica al vapor, es prometedor como ingrediente multifuncional para aplicaciones cosméticas y de cuidado de la piel. Este estudio investiga la composición química y las actividades biológicas del hidrolato de saúco obtenido mediante destilación al vapor. A pesar del creciente interés en el hidrolato de saúco, ha faltado estudios exhaustivos que aclaren su composición química y sus posibles componentes bioactivos. Para abordar esta brecha, realizamos un análisis detallado de la composición, la actividad antioxidante y la antigenotoxicidad del hidrolato de saúco. Se realizaron evaluaciones genotóxicas y ensayos de antioxidantes (ABTS, DPPH) para evaluar sus propiedades biológicas. Obtuvimos hidrolato de saúco con una notable transferencia de compuestos aromáticos mediante el proceso de destilación al vapor, destacando su eficacia y sostenibilidad. La caracterización química identificó compuestos vitales, incluido el fenilacetaldehído, el 2-acetilpirrol y un componente principal no identificado, que contribuyen colectivamente a las propiedades aromáticas y biológicas del hidrolato. La evaluación genotóxica mediante el ensayo Comet demostró los efectos protectores del hidrolato contra el daño al ADN inducido por el peróxido de hidrógeno y la estreptonigrina. La protección óptima del ADN se observó al 10% (p/v), atribuida a la actividad antioxidante de los compuestos identificados. El hidrolato exhibió un potencial antioxidante significativo, demostrando respuestas dependientes de la concentración y correlacionando concentraciones más altas con una mayor actividad antioxidante. Estos hallazgos subrayan los atributos multifacéticos del hidrolato de saúco, posicionándolo como un ingrediente natural prometedor para el cuidado de la piel. Este estudio respalda el hidrolato de saúco como un valioso recurso natural y sostenible para el desarrollo de productos.

Palabras clave: hidrolato de saúco; destilación al vapor; antioxidantes; productos cosméticos; caracterización química



Cita: Gonçalves, S.; Peixoto, F.; Schoss, K.; Glavac, NK; Gaivão, I.

Hidrolato de saúco: exploración del perfil químico, la potencia antioxidante y la antigenotoxicidad para aplicaciones cosméticas. *Aplica. Ciencia.* 2024, 14, 6338. <https://doi.org/10.3390/app14146338>

Editores académicos: Antony C. Calokerinos, Charalampos Proestos, Mustafa Bener y Vassilia J. Sinanoglou

Recibido: 18 de junio de 2024

Revisado: 13 de julio de 2024

Aceptado: 19 de julio de 2024

Publicado: 20 de julio de 2024



Copyright: © 2024 por los autores. Licenciatario MDPI, Basilea, Suiza.

Este artículo es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos y condiciones de los Creative Commons

Licencia de atribución (CC BY)

(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introducción

Debido a la mayor conciencia medioambiental, existe un interés creciente en los ingredientes naturales para su uso en productos cosméticos. Para hacer de los ingredientes naturales una fuente interesante y económicamente sostenible de compuestos bioactivos, es indispensable seleccionar y optimizar tecnologías de extracción adecuadas y respetuosas con el medio ambiente que permitan la recuperación y la sostenibilidad de los análisis objetivo.

La baya del saúco (*Sambucus nigra* L.) ha sido ampliamente reconocida por sus aplicaciones históricas y contemporáneas en medicinas tradicionales, artes culinarias y alimentos funcionales debido a su rico contenido fitoquímico [1]. Entre la diversa gama de productos deri

Los hidrolatos de bayas de saúco han atraído cada vez más atención por sus posibles beneficios para la salud y sus propiedades multifuncionales [2]. Los hidrolatos, también conocidos como hidrosoles, aguas florales o destilados, son los coproductos acuosos obtenidos durante la extracción de aceites esenciales [3]. Estos coproductos han sido valorados por sus perfiles aromáticos y por poseer un espectro de compuestos bioactivos distintos de los que se encuentran en los aceites esenciales correspondientes [4]. El hidrolato de saúco, en particular, es prometedor como un recurso valioso para diversas aplicaciones, incluidas la cosmética y la aromaterapia [5,6].

A pesar del creciente interés en el hidrolato de saúco, sigue habiendo una escasez de estudios exhaustivos que esclarezcan su composición química y sus posibles componentes bioactivos. Estas investigaciones son esenciales para comprender plenamente los posibles beneficios y aplicaciones del hidrolato. Los estudios sugieren que la baya del saúco posee importantes propiedades antioxidantes y antigenotóxicas, pero se necesitan investigaciones detalladas para comprender por completo sus posibles beneficios y aplicaciones [7,8]. Para abordar esta brecha, nuestro estudio realiza un análisis en profundidad del perfil químico y las actividades biológicas del hidrolato de saúco obtenido mediante destilación al vapor.

Empleamos una variedad de metodologías, que incluyen cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) para la caracterización química, ensayos de antioxidantes (ABTS, DPPH) y evaluaciones genotóxicas utilizando el ensayo Comet para evaluar sus propiedades biológicas. Al dilucidar la potencia antioxidante y la antigenotoxicidad del hidrolato de saúco, nuestro objetivo es proporcionar información valiosa sobre sus posibles aplicaciones, particularmente en la industria cosmética. Nuestros hallazgos contribuyen al contexto más amplio de la investigación y el desarrollo de productos naturales, destacando el hidrolato de saúco como un ingrediente prometedor, sostenible y multifuncional para formulaciones para el cuidado de la piel. Esta exploración integral tiene como objetivo arrojar luz sobre el biorecurso versátil que ofrece el hidrolato de saúco, enfatizando su importancia como un activo valioso y sostenible para el desarrollo futuro.

2. Materiales y métodos

2.1. Células

Se recogieron muestras de sangre periférica de una voluntaria sana de 35 años.

No fumaba, no consumía alcohol, no tenía problemas de salud y no había tomado ningún medicamento durante los seis meses anteriores al estudio. Esta investigación se realizó con la aprobación del comité de ética de la Universidad de Trás-os-Montes y Alto Douro (Doc4-CE-UTAD-2023) y de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

2.2. químicos

La estreptonigrina (CAS 3930–19-6) se adquirió de Santa Cruz Biotechnology Inc. de Santa Cruz, TX, EE. UU. La Fpg (formamido-piridinina[fapy]-ADN glicosilasa) se adquirió de New England BioLabs (Ipswich, MA, EE. UU.). El acetato de etilo ACS (Reag. Ph. Eur./USP) y NaCl se adquirieron de Carlo Erba Reagents (Val-de-Reuil, Francia). El agua destilada se adquirió en MedicalShop (Ponte de Lima, Portugal).

El aparato de destilación se compró a Agrosprof (Braga, Portugal). El GC-MS de n-hexano (SupraSolv), el fenilacetaldéhid y todos los demás productos químicos se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania).

2.3. Solución de lisis

La solución de lisis se preparó combinando NaCl 2,5 M, EDTA disódico 0,1 M y base Tris 0,01 M, y ajustando el pH a 10. Inicialmente, la mezcla, excluyendo Triton X-100, se disolvió en agua destilada justo por debajo de el volumen final, con cantidades precisas de cada compuesto. Luego se ajustó el pH a 10 usando una solución de NaOH 10 M durante 1 h a 4 °C. Finalmente, se añadió Triton X-100 al 1% a la solución de lisis antes de su uso.

2.4. Solución salina tamponada con fosfato (PBS)

Se preparó una solución de PBS disolviendo cantidades exactas de KH₂PO₄ 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KCl 2,7 mM y NaCl 137 mM en agua destilada, justo por debajo de la cantidad final requerida.

volumen. Luego se ajustó el pH a 7,4 usando una solución de HCl 1 M. Finalmente, se añadió el agua restante para lograr el volumen final deseado de la solución de PBS.

2.5. Tampón de reacción enzimática para

Fpg El tampón de reacción enzimática, que comprende HEPES 0,04 M, KCl 0,10 M, EDTA 0,0005 M y BSA 0,2 mg/ml, se formuló en H₂O. El pH de la solución tampón se ajustó a 8,0 añadiendo cuidadosamente una solución de KOH 6 M.

2.6. Solución de electroforesis La

solución de electroforesis se preparó combinando NaOH 0,3 M y 1 mM. EDTA en un matraz, luego se agregó agua destilada hasta que el pH estuvo por debajo de 13.

2.7. Preparación de

enzimas La enzima específica de lesión para el ensayo Comet, Fpg, disponible comercialmente, se obtuvo de bacterias y se almacenó a -80 °C en alícuotas después de la producción inicial mediante ingeniería plasmídica . El Fpg descongelado se diluyó según las pautas del proveedor con un tampón Fpg y se mantuvo en hielo hasta que se agregó a los geles durante los experimentos, asegurando la funcionalidad adecuada de la enzima.

2.8. Cosecha y preparación de saúco

En agosto de 2022 se compraron bayas de saúco en INOVTERRA (Vila Pouca de Salzedes, Portugal). Las bayas de saúco secas se mantuvieron en un recipiente de vidrio herméticamente cerrado hasta su posterior análisis [9]. Las bayas de saúco se molieron hasta convertirlas en polvo utilizando un molinillo de café para cada experimento.

2.9. Destilación al vapor de saúco

La proporción adecuada de material vegetal y agua para la destilación al vapor puede variar dependiendo de factores como el tipo y la cantidad de material vegetal que se utiliza y el resultado deseado de la extracción. Sin embargo, una recomendación estándar en la literatura es utilizar una proporción de 1:3 (1 parte de material vegetal por 3 partes de agua) para extraer aceites esenciales de materiales vegetales (Tabla 1). Cabe señalar que la proporción óptima para la destilación al vapor también puede variar según el aparato de destilación utilizado. En nuestros experimentos se utilizó un alambique de cobre (alambique). El procedimiento se describe en la Tabla 1 [10].

Tabla 1. Formulación y procedimiento de destilación al vapor de saúco.

Ingrediente	g/ml
Agua destilada	4050
Bayas de saúco	1350
Procedimiento	
1. Se colocaron bayas de saúco secas en el aparato de destilación junto con el agua destilada.	
2. Luego se conectó el aparato a un condensador enfriado por agua y se calentó usando una manta calefactora.	
3. Una vez que el agua del matraz alcanzó el punto de ebullición, el vapor generado pasó por el bayas de saúco, extrayendo los componentes del aceite esencial.	
4. Luego, el vapor se condensó en las paredes del condensador y goteó en un recipiente colector. durante 1 h.	
5. El líquido recogido era una mezcla de aceite esencial y agua, separada mediante un embudo.	
6. El hidrolato se conservó en un recipiente hermético resistente a la luz y la exposición a la luz directa. Se evitó la luz solar y el calentamiento excesivo.	

2.10. Cálculo de la proporción de hierba seca a hidrolato

En nuestro estudio, la proporción de hierba seca a hidrolato se calculó como la relación entre el peso de la hierba seca (bayas de saúco) y el volumen de hidrolato obtenido, expresado como porcentaje:

$$\text{Proporción de hierba seca a hidrolato (\%)} = \frac{\text{Peso del ingrediente (g)}}{\text{Volumen de hidrolato (mL)}} \times 100$$

Esta métrica indica cuantitativamente la cantidad de componentes volátiles de las bayas de saúco que se transferirán con éxito al hidrolato.

2.11. Preparación de extractos de

hidrolato La extracción del hidrolato se llevó a cabo en recipientes de vidrio y por triplicado usando hexano y acetato de etilo como disolventes orgánicos. La relación de hidrolato/hexano fue de 9:1 (v/v), con 9 ml del hidrolato y 1 ml del disolvente orgánico, y la relación de hidrolato/ acetato de etilo fue de 8:2 (v/v), con 8 mL del hidrolato y 2 mL del solvente orgánico. Las mezclas se agitaron durante la noche a temperatura ambiente. Luego, se tomaron 0,5 ml de la fracción superior (disolvente orgánico) para el análisis GC-MS (Sección 2.12). Después del análisis, se calcularon las desviaciones estándar relativas y se promediaron los resultados.

2.12. Perfil de sustancias volátiles determinado por cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC-MS)

Las muestras de hidrolato sin procesar y los extractos de hidrolato se analizaron utilizando un sistema Shimadzu GC-MS (GCMS-QP2010 Ultra, São Paulo, Brasil) equipado con un detector de MS y una columna capilar Rxi-5Sil MS (Restek, Pennsylvania, EE. UU.; 30 m × 0,25 mm, espesor de película 0,25 µm). Las temperaturas del inyector y de la fuente de iones se establecieron en 250 °C y 200 °C, respectivamente. La temperatura de la columna se programó para aumentar de 40 °C a 220 °C a un ritmo de 3 °C/min, manteniendo las temperaturas inicial y final durante 15 min cada una. Se utilizó helio (99,99%) como gas portador a un caudal de 1 ml/min. Se inyectaron muestras de hidrolato de 0,5 µL y 1,0 µL, y muestras de extracto de 1,0 µL utilizando un muestreador automático en modo dividido, con proporciones de división de 1:5 y 1:10 para las muestras de hidrolato, y 1:5 para las muestras de extracto . La detección de MS se realizó en modo de ionización electrónica con una energía de ionización de 70 eV y la temperatura de la línea de transferencia de MS se ajustó a 250 °C. El rango de masa a carga (m/z) fue de 40 a 400, con una frecuencia de escaneo de 5 Hz.

La identificación de compuestos se basó en la comparación de sus espectros de masas y los índices de retención con los de compuestos sintéticos en las bibliotecas espectrales del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST11) y de Sabores y Fragancias de Compuestos Naturales y Sintéticos (FFNSC2). El pico de fenilacetaldéhidó se confirmó utilizando un estándar de referencia. Los índices de retención lineal se determinaron con respecto a una serie homóloga de n-alcanos (C6-C24). Las concentraciones relativas de los componentes se calcularon a partir de los picos de GC sin factores de corrección.

2.13. Tratamiento con hidrolato de

saúco Para el ensayo Comet, se eligieron cuatro concentraciones de saúco en función de resultados anteriores: 1%, 5%, 10% y 15% (p/v) [8]. Se prepararon dos tratamientos: uno con H₂O₂ y otro con estreptonigrina (SN). Se realizaron dos experimentos independientes, con 10 días de diferencia, para cada condición.

Para aplicar el tratamiento con H₂O₂ , se mezclaron 50 µL de H₂O₂ con 0,5 L de PBS. El experimento implicó montar diez frascos Coplin: el primero contenía solo PBS, del segundo al quinto contenían diferentes concentraciones de saúco combinado con PBS, el sexto contenía la solución tratada con H₂O₂ y los cuatro restantes contenían varias concentraciones de saúco combinadas con el Tratamiento con H₂O₂ . Se prepararon dos portaobjetos para cada condición. Un portaobjetos de cada conjunto siguió el protocolo estándar, mientras que el segundo se sometió a incubación enzimática antes de continuar. La Figura 1 proporciona una descripción esquemática de estos pasos, que muestra las etapas secuenciales del procedimiento.

Representando las etapas secuenciales del procedimiento.



El tratamiento con SN implicó disolver SN en PBS para alcanzar una concentración final de 20. El tratamiento con el método de doble diapositiva se representó visualmente en la Figura 2.

El flujo de trabajo se representa visualmente en la Figura 2.



Los efectos genotóxicos y antigenotóxicos de la baya del saúco se evaluaron in vivo utilizando el ensayo Comet en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).

La experimentación siguió la metodología descrita en [11]. Todas las soluciones y Se prepararon de antemano portaobjetos prerrevestidos que contenían 1% de agarosa de punto de fusión normal. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante un pinchazo en el dedo y se mezclaron 25 μ L de cada muestra.

con 0,8% de agarosa de bajo punto de fusión en PBS. Posteriormente, se colocaron dos gotas de 70 µl de esta mezcla en portaobjetos prerrevestidos, cada uno cubierto con un cubreobjetos para dispersar uniformemente la solución. Este proceso se repitió para cada concentración bajo examen. Luego, los portaobjetos se refrigeraron a 4 °C durante 5 minutos para permitir que la agarosa solidificara antes de retirar los cubreobjetos. A continuación, los portaobjetos se sometieron a diversos tratamientos en frascos Coplin a 37 °C durante 1 h. Después del tratamiento, los portaobjetos se colocaron en una solución de lisis fresca y fría. Los portaobjetos se dispusieron sin espacios en la cámara de electroforesis y se sumergieron en un tampón desnaturalizante y de electroforesis frío durante 20 min. La electroforesis se realizó en oscuridad a 4 °C con una corriente de 300 mA y un voltaje de 25 V (equivalente a 0,8 V/cm) durante 20 min. Después de la electroforesis, los portaobjetos se lavaron secuencialmente en PBS (10 min a 4 °C) y agua destilada (10 min a 4 °C) antes de secarlos al aire. Cada gel se tiñó con 40 µL de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (1 µg/mL en dH₂O) y se cubrió con un cubreobjetos para su examen bajo un microscopio de fluorescencia (Leica DMLS, Massachusetts, EE. UU.) a 400 × aumento. Se observaron cincuenta células por gel y la intensidad de la cola de cada célula se calificó de 0 (sin cola) a 4 (casi todo el ADN en la cola) [12]. La puntuación final, expresada en unidades arbitrarias que van de 0 a 400, se calculó utilizando la fórmula del indicador de daño genético (GDI).

Indicador de daño genético (GDI)

$$= [(\% \text{ nucleóide clase 0}) \times 0] + [(\% \text{ nucleóide clase 1}) \times 1] + [(\% \text{ nucleóide clase 2}) \times 2] + [(\% \text{ nucleóide clase 3}) \times 3] + [(\% \text{ clase de nucleóide 4}) \times 4]$$

Además, otro portaobjetos para cada condición se sometió a incubación enzimática. Después de lavar con tampón B a 4 °C, se aplicó enzima Fpg diluida (50 µL) a cada gel y se incubó en una caja húmeda a 37 °C durante 30 min. La electroforesis y los pasos posteriores se llevaron a cabo según el protocolo. El uso de gel de agarosa para incluir células en el ensayo Comet sirve para inmovilizar las células y salvaguardar su integridad estructural mediante pasos de ensayo posteriores. Esta metodología se emplea comúnmente cuando se analizan células adherentes o en crecimiento en monocapa, facilitando su manipulación y manejo [13]. El gel de agarosa proporciona una matriz de soporte que encapsula las células, evitando su desprendimiento o alteración durante los pasos posteriores del ensayo, como la lisis celular y la electroforesis. La inclusión de células en agarosa garantiza su distribución uniforme en los portaobjetos de microscopio, lo que permite un análisis uniforme [14].

Además, la naturaleza porosa de la agarosa facilita la difusión de la solución de lisis y otros reactivos manteniendo la integridad celular. Esto elimina eficazmente las proteínas celulares y los contaminantes durante la lisis, mejorando la visualización y el análisis del daño del ADN [13,15]. Por el contrario, las células en suspensión requieren la inclusión en agarosa para el análisis del ensayo Comet. Las células en suspensión se dispersarían durante la electroforesis, lo que dificultaría una evaluación precisa de los niveles de daño en el ADN. La inclusión de estas células en agarosa las inmoviliza, lo que garantiza un análisis de daños en el ADN consistente y confiable en los pasos posteriores del ensayo Comet [16,17].

2.14.2. Ensayo cometa en PBMC humanas utilizando SN EI

protocolo se mantuvo consistente con los procedimientos anteriores, pero el tratamiento varió. En este experimento, se disolvieron cuatro concentraciones de saúco en una mezcla de SN y PBS. Se colocó una gotita de 50 µl de esta solución sobre el gel de agarosa y la muestra de sangre, luego se cubrió con un cubreobjetos. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron a 37 °C durante 1 h antes de sumergirlos en solución de lisis y siguiendo el protocolo establecido.

2.15. Ensayo de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

La capacidad del hidrolato para promover la dismutación de H₂O₂ se evaluó utilizando una modificación del método descrito anteriormente [18]. Este método se basa en convertir el ácido homovanílico (HVA) en su dímero fluorescente en presencia de H₂O₂ y peroxidasa de rábano picante (HRP). Se utilizaron cuatro concentraciones diferentes para evaluar la posible dismutación.

capacidad de ción del hidrolato de saúco (1%, 5% y 15% p/v). El hidrolato de saúco se incubó en tampón fosfato (50 mM, pH 7,4) en presencia de H₂O₂ 20 mM, HVA 0,1 mM y HRP 6,4 mg/ml. Después de 5 minutos, la reacción se detuvo con 0,5 ml de tampón de glicina frío (pH 12,0). La fluorescencia de la solución se midió a 312 nm para longitudes de onda de excitación y 420 nm para emisión con un espectrofluorómetro Varian Eclipse. La generación de peróxido se calculó usando una curva estándar de H₂O₂ y los niveles de H₂O₂ se expresaron como dismutación de H₂O₂ en nmol /min.

2.16. Actividad antioxidante

2.16.1. Actividad de eliminación de radicales ABTS

El ensayo de eliminación de radicales ABTS se evaluó siguiendo un método previamente descrito [19], con algunas modificaciones. El ensayo de decoloración de cationes radicales ABTS evaluó la actividad eliminadora de radicales libres del hidrolato de saúco. Para iniciar la formación del radical catión ABTS^{•+}, se mezcló ABTS 7 mM con persulfato de potasio 2,5 mM (1:1 p/p) en agua y se dejó incubar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12 a 16 h antes de su utilización. La solución de ABTS^{•+} resultante se diluyó con metanol hasta alcanzar una absorbancia de 0,700 a 734 nm. Después de agregar cuatro concentraciones diferentes del hidrolato (1%, 5% y 15%, p/v) a la solución diluida de ABTS^{•+}, se midió la absorbancia 30 minutos después de mezclar bien. Cada ensayo incluyó un blanco de disolvente apropiado y todas las mediciones se realizaron por triplicado. El porcentaje de inhibición de la absorbancia a 734 nm se calculó mediante la fórmula:

$$\text{ABTS}^{\bullet+} \text{ efecto eliminador(\%)} = \times 100 (2) \frac{(AB - AA)}{AB}$$

donde AB representa la absorbancia del radical ABTS mezclado con metanol. AA representa la absorbancia del radical ABTS mezclado con el hidrolato o estándar de saúco.

La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) se calculó preparando una curva Trolox estándar de una solución Trolox estándar.

2.16.2. Ensayo de eliminación de radicales DPPH

La capacidad de eliminación de radicales libres DPPH de las muestras del hidrolato de saúco se evaluó siguiendo un método previamente descrito [20], con ligeros ajustes, utilizando el radical DPPH estable, que exhibe un pico de absorción a 515 nm. Se preparó una solución del radical DPPH disolviendo 2,4 mg de DPPH en 100 ml de metanol. A 3,995 ml de DPPH metanólico se añadió una solución de prueba (1%, 5% y 15% p/v). La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 min. Luego se midió la absorbancia de la mezcla de reacción a 515 nm usando un espectrofotómetro. Además, se midió la absorbancia del radical DPPH sin ningún hidrolato (es decir, el blanco). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La capacidad para eliminar el radical DPPH se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{DPPH eliminado(\%)} = \frac{(AB - AA)}{AB} \times 100$$

donde AB representa la absorbancia del blanco en t = 0 min, y AA representa la absorbancia del hidrolato en t = 30 min. La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) se calculó preparando una curva Trolox estándar de una solución Trolox estándar.

2.17. Análisis estadístico El

análisis de los datos se realizó utilizando el software IBM SPSS Statistics, versión 20 (Chicago, IL, EE. UU.). La evaluación estadística incluyó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de pruebas post hoc con el método de Tukey. La significación estadística se determinó con valores de p inferiores a 0,05.

3. Resultados

3.1. Destilación al vapor de saúco

En este estudio se obtuvieron 3330 mL de hidrolato. La proporción de hierba seca a hidrolato fue Se determinó que era 40,54%. Esta métrica proporciona información valiosa sobre la eficiencia de la Proceso de destilación al vapor, que indica el grado de enriquecimiento de un hidrolato con compuestos volátiles. compuestos. Cuanto mayor sea la masa de la hierba seca, mayor será el contenido de volátiles. compuestos en el hidrolato.

El pH del hidrolato obtenido se midió usando un medidor de pH (MP511, Benchtop, Apera Instruments, Columbus, OH, EE. UU.) y se encontró que el valor de pH era 3,35.

3.2. Caracterización química

El análisis directo del hidrolato, es decir, el análisis del hidrolato sin procesar, reveló la presencia de tres compuestos, fenilacetaldehído, 2-acetilpirrol y un desconocido compuesto (Tabla 2), que representa el 26,7%, 13,7% y 59,7% de la composición total según sus intensidades máximas relativas, respectivamente. El fenilacetaldehído era entonces cuantificado utilizando una curva de calibración estándar. Usando un volumen de inyección de 1 µL, se determinó una concentración de 0,063 ± 0,083 mg/mL para la división 1:5 y una concentración de 0,068 ± 0,047 mg/mL para la división 1:10. Utilizando un volumen de inyección más bajo (0,5 µL), mejor se logró la repetibilidad, particularmente en la división 1:5; la concentración de fenilacetaldehído fue de 0,096 ± 0,049 mg/mL.

Tabla 2. Caracterización química.

Muestras sin procesar	Área %	
	26,7%	fenilacetaldehído
	13,7%	2-acetil-pirrol
	59,7%	Estados miembros: 43 (100) 44 (72) 144 (60)
Cuantificación de fenilacetaldehído.		
0,5 µL, dividido 1:5		0,096 ± 0,049 mg/ml
0,5 µL, dividido 1:10		0,160 ± 0,074 mg/ml
1 µL, dividido 1:5		0,063 ± 0,083 mg/ml
1 µL, dividido 1:10		0,068 ± 0,047 mg/ml
Extractos de hexano	Área %	
	3,1%	n-hexanal
	4,5%	furfural
	82,6%	fenilacetaldehído
	2,2%	(E)-beta-damascenona
Cuantificación de fenilacetaldehído.		
1 µL, dividido 1:5		0,025 ± 0,001 mg/ml
Extractos de acetato de etilo	Cuantificación de fenilacetaldehído.	
	1 µL, dividido 1:5	0,069 ± 0,003 mg/ml

En los extractos hidrolados con acetato de etilo sólo se detectó fenilacetaldehído en una concentración promedio de 0,069 ± 0,003 mg/mL, que corresponde a la concentración de 0,009 mg/mL en el hidrolato. Se detectaron cuatro compuestos en los extractos de hexano, n-hexanal, furfural, fenilacetaldehído y (E)-beta-damascenona, que representan el 3,1%, 4,5%, 82,6% y 2,2% de la composición total según su intensidad máxima relativa, respectivamente . Los cuatro compuestos ya han sido reportados como constituyentes volátiles de las bayas de saúco [21]. La concentración promedio de fenilacetaldehído fue de 0,025 ± 0,001 mg/mL,

1 µL, dividido 1:5 0,069 ± 0,003 mg/mL

lo que corresponde a una concentración de 0,003 mg/mL en el hidrolato. La repetibilidad de extracciones con hexano y acetato de etilo fue buena.

En este estudio se evaluó el daño al ADN en PBMC se realizó utilizando el método 3.3. Ensayo del cometa. El ensayo H₂O₂ para la evaluación del daño al ADN en PBMC se realizó utilizando el Ensayo Cometa para investigar el impacto de las concentraciones de hidrolato de saúco y H₂O₂. En este estudio, la evaluación del daño al ADN en PBMC se realizó utilizando los resultados de la prueba cometada. Los resultados revelaron una elevación notable en el daño del ADN en el grupo 'C+' del ensayo Comet después de ser expuesto al impacto de la concentración de H₂O₂, lo que significó mayores efectos de genotoxicidad (Figura 3). Además, un desafío con H₂O₂ de cinco minutos a 10 ppm no tuvo efecto significativo sobre el ADN (Figura 3). El grupo C+ estuvo expuesto únicamente a H₂O₂, lo que significó mayores efectos genotóxicos (Figura 3). La posible relación depende de la concentración entre el tratamiento de hidrolato de saúco y H₂O₂. Se observó una correlación dependiente de la concentración entre el tratamiento de hidrolato de saúco y H₂O₂, donde las concentraciones más altas muestran tendencias de mayor daño en comparación con concentraciones más bajas. Además, las tendencias de mayor daño fueron cuestionadas por el H₂O₂ en comparación con concentraciones más bajas. Además, el H₂O₂-Los grupos que se sometieron al tratamiento con hidrolato de saúco mostraron una reducción notable en los grupos desafiados que se sometieron al tratamiento con hidrolato de saúco mostraron una reducción notable. GDI, posicionándolos favorablemente frente al grupo 'C+'. Analizando los datos del IDG se observa una reducción del IDB, posicionándolos favorablemente frente al grupo 'C+'. Analizando el Se hace evidente que el resultado óptimo surgió con el tratamiento del 1%, mostrando los datos del GDI, se hace evidente que el resultado óptimo surgió con el tratamiento del 1%, mostrando los datos del GDI, se hace mayor daño menor al ADN en todas las concentraciones probadas.

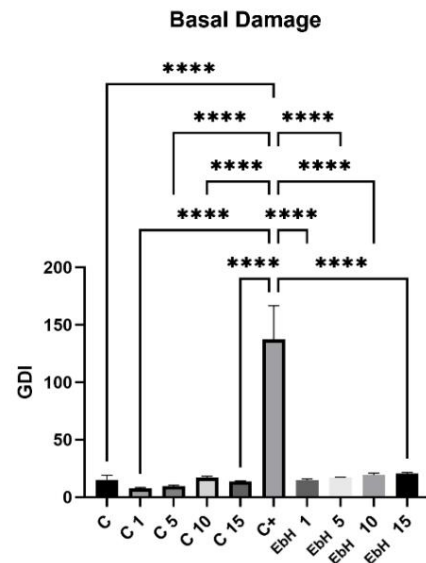


Figura 3. Evaluación del indicador de daño genético (GDI) en PBMC humanas. Los valores medios de Figura 3. Evaluación del indicador de daño genético (GDI) en PBMC humanas. Los valores medios del daño en el ADN, cuantificados como unidades arbitrarias utilizando el ensayo Comet in vivo, se determinaron en el grupo no desafiado como en el grupo desafiado con H2O2. La designación 'C' corresponde al control tanto el grupo no desafiado como el desafiado con H2O2. La designación 'C+' corresponde al grupo de control tratado exclusivamente con PBS. Las denominaciones 'C1', 'C5', 'C10' y 'C15' corresponden a PBS con PBS y la respectiva concentración de hidrolato de saúco (1:1%, 5:5%, 10:10% y 15:15%). 'C+' significa el grupo sometido únicamente al tratamiento con H2O2. Los grupos evaluados se distinguen por abreviaturas que indican el ingrediente constituyente (EbH: hidrolato de saúco) y la respectiva concentración de hidrolato de saúco (1:1%, 5:5%, 10:10% y 15:15%). El asterisco cuadruple se encuentra Concentración de hidrolato de saúco (1:1%, 5:5%, 10:10% y 15:15%). El triple asterisco representa diferencias significativas entre el tratamiento de control y todos los tratamientos con EbH, pero también entre diferencias significativas entre el tratamiento control y todos los tratamientos EbH, pero también entre todos los controles sin el tratamiento SN. Las barras de error representan errores estándar. y todos los controles sin el tratamiento SN. Las barras de error representan errores estándar.

En la categoría 'Daño Basal + Daño Oxidativo', el grupo 'EbH1' exhibe la

En la categoría 'Daño basal + Daño oxidativo', el grupo 'EbH1' exhibe el daño medio al ADN más bajo entre el grupo tratado con hidroclorato de saucos. El control

daño medio al ADN más bajo entre los grupos tratados con HCl y H₂O₂ de saucos. Los grupos de control ('C', 'C1', 'C5', 'C10', 'C15', 'C20', 'C25', 'C30', 'C35', 'C40', 'C45', 'C50', 'C55', 'C60', 'C65', 'C70', 'C75', 'C80', 'C85', 'C90', 'C95', 'C100') no mostraron un aumento significativo en el daño al ADN, lo que indica sus pronunciados efectos genotóxicos (Figura 4, Daño Basal +

El grupo tratado exclusivamente con H₂O₂ ('C4') demostró un daño oxidativo medio significativamente mayor. Daño en el ADN, lo que indica sus pronunciados efectos genotóxicos (Figura 4, Daño Basal + Daño Oxidativo).

en la cola de 3,75. Los grupos de tratamiento con hidrolato de saúco exhibieron un aumento de ADN. daños con concentraciones más altas. 'EbH 1' tuvo el GDI más bajo de 14,75 y % de ADN en la cola de 3,69. En la condición combinada de 'Daño Basal + Daño Oxidativo', el control El grupo mostró un GDI de 44,25 y un % de ADN en la cola de 11,06. El hidrolato de saúco Los grupos de tratamiento también mostraron un mayor daño en el ADN con concentraciones más altas. El El menor daño en el ADN se observó en 'EbH 1', con un GDI de 25,75 y % de ADN en la cola de 6.44. Estos resultados indican que el hidrolato de saúco induce un aumento dosis-dependiente en Daño al ADN en condiciones de estrés basal y oxidativo, con la mayor concentración ('EbH 15') causando los daños más importantes.

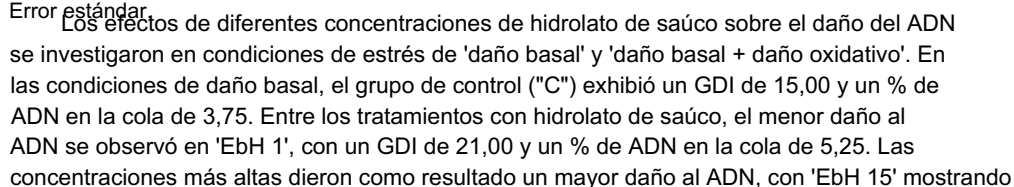
Tabla 3. Efectos antigenotóxicos del hidrolato de saúco sobre el daño del ADN en sangre periférica humana células mononucleares con agresión de H2O2 .

Tratamiento	GDI	% ADN en la cola
Daño básico		
C	15.00	3.75
C 1	7.50	1.88
C 5	9.50	2.38
C 10	17.00	4.25
C 15	13.50	3.38
C+	137,41	34.35
EbH 1	14.75	3.69
EbH 5	17.00	4.25
EbH 10	19.25	4.81
EbH 15	20,50	5.13
Daño basal y oxidativo		
C	44,25	11.06
C 1	15,00	3.75
C 5	21,75	5.44
C 10	23,75	5.94
C 15	25,25	6.31
C+	182,50	45,63
EbH 1	25,75	6.44
EbH 5	30,50	7,67
EbH 10	31,50	7,88
EbH 15	37,50	9.38

3.4. Ensayo del cometa: Desafío SN

La investigación sobre el daño del ADN en PBMC reveló resultados distintivos en los distintos grupos de tratamiento. Dentro de la categoría 'Daño basal', donde se probaron las concentraciones de saúco, el grupo tratado con una concentración de saúco del 1% ('EbH1') exhibió consistentemente el daño medio más bajo en el ADN, lo que sugiere un potencial efecto protector contra el estrés genotóxico. Por el contrario, los grupos de control ('C', 'C1', 'C10', y 'C15') mostraron niveles variables de daño en el ADN (Figura 5). Al analizar los datos de GDI, Se hace evidente que el resultado óptimo surgió con el tratamiento al 1%, lo que muestra la mayor daño menor al ADN entre todas las concentraciones probadas.

El análisis ampliado del daño del ADN en PBMC utilizando varios tratamientos reveló resultados matizados en los distintos grupos experimentales. En el 'Daño Basal +Daño oxidativo', el subgrupo 'EbH5' exhibió el ADN más bajo observado daño (Figura 6, Daño Basal + Daño Oxidativo). Siguiéndolo de cerca, el 'EbH1' El subgrupo demostró un daño en el ADN relativamente menor. De manera similar, en el subgrupo 'Daño oxidativo NET', el subgrupo 'EbH10' ilustró el daño al ADN menos observado. (Figura 6, Daño Oxidativo NETO). Prestando atención a los datos GDI con Fpg (Figura 6, Daño Oxidativo NETO), se hace evidente que se logró el resultado más favorable con el tratamiento del 10%, como lo demuestra el nivel más bajo registrado de daño al ADN.



Los efectos de diferentes concentraciones de hidrolato de saúco sobre el daño del ADN. fueron investigados bajo estrés de 'Daño Basal' y 'Daño Basal + Daño Oxidativo' condiciones. En las condiciones de daño basal, el grupo de control ('C') exhibió un GDI de 15,00 y % ADN en la cola de 3,75. Entre los tratamientos con hidrolato de saúco, el El menor daño en el ADN se observó en 'EbH 1', con un GDI de 21,00 y % de ADN en la cola. de 5,25. Las concentraciones más altas dieron como resultado un mayor daño al ADN, con 'EbH 15' mostrando el GDI más alto de 58.75 y % ADN en la cola de 14.69 (Cuadro 4).

Tabla 4. Efectos antigenotóxicos del hidrolato de saúco sobre el daño del ADN en sangre periférica humana Células mononucleares con insulto SN.

Tratamiento	GDI	% ADN en la cola
Daño básico		
C	15.00	3.75
C 1	7.50	1,88
C 5	9.50	2.38
C 10	17.00	4.25
C 15	13.50	3.38
C+	137,41	34.35
EbH 1	21.00	5.25
EbH 5	31,75	7,94
EbH 10	54.00	13.50
EbH 15	58,75	14.69
Daño basal y oxidativo		
C	44,25	11.06
C 1	15,00	3.75
C 5	21,75	5.44
C 10	23,75	5.94
C 15	25,25	6.31
C+	182,50	45,63
EbH 1	62,50	15.63
EbH 5	59,50	14,88
EbH 10	72,50	18.13
EbH 15	87,00	21,75

En la condición combinada de 'daño basal + daño oxidativo', el grupo de control mostró un GDI de 44,25 y un % de ADN en la cola de 11,06. El daño al ADN más bajo entre los tratamientos con hidrolato de saúco se observaron nuevamente en 'EbH 1', con un GDI de 62,50 y % de ADN en la cola de 15,63. De manera similar a la condición basal, las concentraciones más altas condujeron a mayor daño en el ADN, con 'EbH 15' mostrando el GDI más alto de 87,00 y % de ADN en la cola de 21,75.

Estos resultados indican que, aunque el tratamiento con hidrolato de saúco al nivel más bajo La concentración ('EbH 1') muestra el menor daño al ADN entre las concentraciones probadas, todavía resulta en un mayor daño al ADN que el grupo de control en condiciones basales y oxidativas. condiciones de estrés.

3.5. Actividad de eliminación de peróxido de hidrógeno

Evaluamos la capacidad del hidrolato de saúco para dismutar el H2O2 para comprender si el efecto protector observado en términos de genotoxicidad se debió al hecho de que El hidrolato de saúco tuvo un efecto directo sobre el H2O2. Sin embargo, encontramos que el hidrolato no promovió la dismutación del H2O2. Sin embargo, este resultado nos permite descartar una posible interacción directa del hidrolato con H2O2, convirtiéndolo en formas menos nocivas. Por tanto, el efecto observado del hidrolato podría neutralizar los radicales libres formados por la acción del H2O2 en las células o mediante la activación de los sistemas de reparación del ADN presentes en las células, ayudando a corregir el daño causado por el H2O2 antes de que se vuelva permanente.

Por lo tanto, el efecto protector observado del hidrolato de H2O2 se puede atribuir a la combinación de estos mecanismos, lo que reduce el daño al ADN causado por el peróxido de hidrógeno.

nos permite descartar una posible interacción directa del hidrolato con el H2O2, convirtiéndolo en formas menos nocivas. Por tanto, el efecto observado del hidrolato podría neutralizar los radicales libres formados por la acción del H2O2 en las células o mediante la activación de los sistemas de reparación del ADN presentes en las células, ayudando a corregir el daño causado por el H2O2 antes de que se vuelva permanente.

Por lo tanto, el efecto protector observado del hidrolato de H2O2 puede atribuirse a la combinación de estos mecanismos, lo que reduce el daño al ADN causado por el peróxido de hidrógeno.

3.6 Actividad antioxidante

Las investigaciones científicas (Figura 7) de la actividad antioxidante de los extractos de saúco arrojan resultados dependientes de la concentración (Figura 7). En análisis de la actividad antioxidante de ABTS, medida la relación entre el hidrolato de saúco y la por equivalentes de Trolox (Figura 7). Con concentraciones crecientes de hidrolato de saúco (1%, 5% y 15%) hubo un aumento proporcional en los valores equivalentes de Trolox, lo que demuestra un aumento correspondiente en la capacidad antioxidante.

Figura 7. Relación entre la concentración de hidrolato de saúco y la actividad antioxidante por inhibición de ABTS en μmol Trolox. Los grupos probados se distinguen por las abreviaturas que indican el ingrediente constituyente (EbH: hidrolato de saúco) y la concentración respectiva de hidrolato de saúco (1:1%, 5:5% y 15:15%). El único asterisco representa diferencias significativas entre 'C+' y 'EbH5'. El triple asterisco representa diferencias significativas entre 'C+' y 'EbH15'.

También se investigó el impacto de las diferentes concentraciones de hidrolato sobre la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH. Los valores equivalentes de Trolox se determinaron a concentraciones de 0%, 1%, 5% y 15% de hidrolato. Como era de esperar, el hidrolato de saúco muestra actividad antioxidante porque, durante el proceso de extracción, algunos de los compuestos antioxidantes (p. ej., furfural, fenilacetaldéhid y (E)-beta-damascenona) se liberan de la baya y se disuelven en el agua. Sorprendentemente, los resultados revelaron una relación no lineal entre la concentración de hidrolato y la actividad antioxidante. Con una concentración del 1%, el valor equivalente de Trolox aumentó significativamente en comparación con el valor inicial, lo que sugiere una influencia positiva del hidrolato sobre las propiedades antioxidantes. Sin embargo, en la Figura 7. Relación entre la concentración de hidrolato de saúco y la actividad antioxidante

5% se observó una disminución en los valores equivalentes de Trolox, lo que indica una inhibición completa por ABTS en μmol Trolox. Los grupos probados se distinguen por las abreviaturas que denotan efecto dependiente del centrado. Sorprendentemente, la mayor actividad antioxidante se observó en el ingrediente constituyente (EbH: hidrolato de saúco) y en el respectivo hidrolato de saúco.

Concentración de hidrolato del 15%, lo que resalta la presencia de una concentración óptima para la concentración (1:1%, 5:5% y 15:15%). El único asterisco representa diferencias significativas entre 'C+' y 'EbH5'. El triple asterisco representa diferencias significativas entre 'C+' y 'EbH15'.

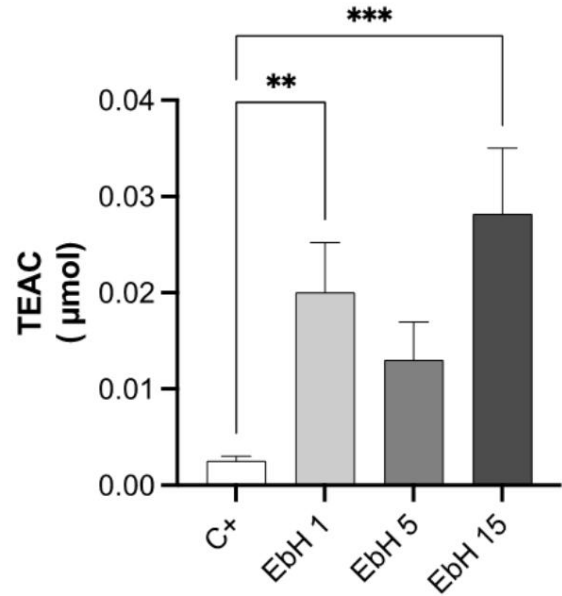


Figura 8. Relación entre la concentración de hidrolato de saúco y la actividad antioxidante por inhibición de DPPH en μmol de Trolox. Los grupos probados se distinguen por las abreviaturas que denotan el ingrediente constituyente (EbH: hidrolato de saúco) y el respectivo hidrolato de saúco el centrado (1:1%, 5:5% y 15:15%). El doble asterisco representa diferencias significativas entre 'C+' y 'EbH1'. El triple asterisco representa diferencias significativas entre 'C+' y 'EbH15'.

4. Discusión

4.1. Destilación al vapor de saúco

Con base en la proporción calculada de hierba seca e hidrolato, los resultados resaltan una solución eficiente. transferencia de compuestos aromáticos y volátiles de las bayas de saúco, lo que demuestra la eficacia del proceso de extracción y, en última instancia, el potencial para aplicaciones terapéuticas o cosméticas.

También se investigó el impacto de las diferentes concentraciones de hidrolato sobre la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH. Los valores equivalentes de Trolox se determinaron a concentraciones de 0%, 1%, 5% y 15% de hidrolato. Como era de esperar, el hidrolato de saúco muestra actividad antioxidante porque, durante el proceso de extracción, algunos de los compuestos antioxidantes (por ejemplo, furfural, fenilacetaldehído y (E)-beta-damascenona) se liberan de la baya y se disuelven en el agua. Sorprendentemente, los resultados revelaron una relación no lineal entre la concentración de hidrolato y la actividad antioxidante. A una concentración del 1%, el valor equivalente de Trolox aumentó significativamente en comparación con el valor inicial, lo que sugiere una influencia positiva del hidrolato en las propiedades antioxidantes. Sin embargo, al 5%, se observó una disminución en los valores equivalentes de Trolox, lo que indica un efecto complejo dependiente de la concentración. Sorprendentemente, la mayor actividad antioxidante se observó con una concentración de hidrolato del 15%, lo que subraya la presencia de una concentración óptima para una máxima eficacia.

4. Discusión 4.1.

Destilación al vapor de saúco

Con base en la proporción calculada de hierba seca e hidrolato, los resultados resaltan una transferencia eficiente de compuestos aromáticos y volátiles de las bayas de saúco, lo que muestra la eficiencia del proceso de extracción y, en última instancia, el potencial para aplicaciones terapéuticas o cosméticas, y también enfatiza la importancia del vapor. La destilación como técnica de extracción sostenible. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las variaciones en la proporción de hierba seca a hidrolato pueden surgir de factores como las características del material vegetal, los parámetros de destilación y el manejo durante la recolección y separación, mientras que estos pueden afectar significativamente la eficiencia de la destilación. El nivel de pH observado afecta las aplicaciones potenciales y enfatiza la necesidad de un control de calidad preciso. Ajustar el pH para aplicaciones específicas puede mejorar la utilidad del hidrolato de saúco en diversas industrias.

Este estudio explora el potencial de uso de la baya del saúco en cosmética natural, investigando la destilación al vapor como un método accesible para la obtención de hidrolato de saúco. Los hallazgos contribuyen a comprender los beneficios de la baya del saúco para la salud de la piel, enfatizando la sostenibilidad de la destilación al vapor para la extracción aromática y terapéutica. Además, hasta donde sabemos, este es el primer estudio sobre la composición y propiedades biológicas in vitro del hidrolato de saúco.

Este estudio también contribuye a una mejor comprensión de la caracterización de los componentes volátiles del hidrolato de saúco. En el análisis de hidrolatos, la extracción líquido-líquido generalmente se usa para extraer los compuestos volátiles en un solvente orgánico debido a las limitaciones de la GC-MS como herramienta para analizar muestras acuosas [22]. El hexano se utiliza más comúnmente como disolvente orgánico [23], aunque no es un disolvente de extracción óptimo para identificar la composición de un hidrolato, ya que es un disolvente altamente apolar ($\log P = 3,90$). Por lo tanto, utilizamos adicionalmente la extracción con acetato de etilo, que es más polar ($\log P = 0,73$) que el hexano pero aún no se mezcla con agua. Teniendo en cuenta que un hidrolato es una solución acuosa de compuestos volátiles y que los compuestos volátiles polares están presentes en contenidos más altos que los menos polares, esperábamos detectar más compuestos en el extracto de acetato de etilo. Sin embargo, este no fue el caso; solo pudimos detectar fenilacetaldehído en el extracto de acetato de etilo, mientras que (E)-beta-damascenona, n-hexanal y furfural también se detectaron en el extracto de hexano, pero en cantidades mínimas.

Generalmente, el número total de compuestos detectados en un hidrolato depende del método elegido para analizar el hidrolato, y se espera que se detecten menos compuestos cuando el hidrolato se aplica directamente al GC-MS, es decir, sin pretratamiento o preparación del hidrolato. muestra, que cuando se extrae previamente con una fase orgánica como hexano o acetato de etilo. Considerando esto, concluimos que tanto el análisis GC-MS directo de hidrolato no procesado como el análisis de extractos son necesarios para obtener la información más detallada posible sobre la composición de un hidrolato.

La baya del saúco ha sido ampliamente reconocida por su diversa gama de compuestos bioactivos, incluidos antioxidantes, vitaminas y ácidos grasos esenciales [5]. Las propiedades antioxidantes

de saúco son de particular interés, ya que tienen el potencial de contrarrestar el estrés oxidativo y prevenir el envejecimiento prematuro. Esto concuerda con estudios previos que han sugerido la capacidad de la baya del saúco para proteger la piel del daño de los radicales libres [8]. Estos hallazgos también subrayan las propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas de la baya del saúco, que contribuyen a su capacidad para calmar la piel irritada y defenderla contra posibles infecciones. Las propiedades antigenotóxicas reportadas en la baya del saúco son de gran interés, lo que sugiere una conexión entre su uso y los beneficios antienviejecimiento. En conjunto, los atributos multifacéticos de la baya del saúco la posicionan como un ingrediente natural prometedor para mejorar la salud de la piel y abordar diversos problemas cutáneos. Creemos que los resultados de nuestro estudio amplían las posibilidades de la aplicación de la baya del saúco al demostrar los efectos biológicos probados del hidrolato de baya del saúco, que indican posibles propiedades cosméticas o terapéuticas.

La importancia de la destilación al vapor en la extracción de aceites esenciales e hidrolatos de materiales vegetales, arraigada en la medicina tradicional y la aromaterapia, minimiza el desperdicio y respalda las prácticas ecológicas. La producción de hidrolato de saúco se alinea con la demanda de la industria de alternativas naturales y sostenibles.

La elaboración de cosméticos mediante destilación al vapor permite la personalización según los tipos y preferencias de piel individuales, alineándose con la tendencia de regímenes de cuidado de la piel personalizados. Durante el estudio se produjo una observación notable ya que la presencia de aceite esencial se percibió visualmente durante la destilación al vapor, pero no se recolectó ninguno. Esto motivó una investigación sobre los factores que influyen en esto, como las variabilidades en el contenido de aceite esencial, la volatilidad y posibles compuestos alternativos que confieren características aromáticas. Es posible que hayan contribuido errores o parámetros subóptimos en el proceso de destilación, lo que destaca la necesidad de una reevaluación meticulosa para obtener conocimientos más profundos sobre la dinámica de la destilación al vapor y sus implicaciones para la extracción de compuestos aromáticos valiosos.

4.2. Evaluación genotóxica

Los efectos protectores observados del hidrolato de saúco contra el estrés genotóxico, como se revela a través del ensayo Comet con desafíos de H₂O₂ y SN, se alinean con las propiedades conocidas de la baya del saúco, particularmente su rica composición fitoquímica [24].

La elevación del daño en el ADN observada en el grupo 'C+' expuesto únicamente a H₂O₂ subraya el pronunciado impacto genotóxico del peróxido de hidrógeno. Por el contrario, la relación dependiente de la concentración observada en los grupos tratados con hidrolato de saúco sugiere una interacción matizada entre las concentraciones de hidrolato y la protección del ADN. Esto se alinea con las determinadas propiedades antioxidantes del hidrolato de saúco, ya que se sabe que los antioxidantes eliminan las especies reactivas de oxígeno, reduciendo el daño inducido por el estrés oxidativo a los componentes celulares, incluido el ADN.

El resultado óptimo observado con el tratamiento con hidrolato de saúco al 10 % en la condición SN y el tratamiento al 1 % con la condición H₂O₂ sugiere un posible efecto protector específico de la concentración. Este hallazgo puede atribuirse al equilibrio óptimo de compuestos bioactivos en esta concentración, ya que concentraciones más altas mostraron tendencias de mayor daño al ADN. Las concentraciones de 1% y 10%, con un daño mínimo al ADN y una notable reducción de la genotoxicidad, resaltan el potencial del hidrolato de saúco para mitigar el estrés oxidativo. Además, el hidrolato probablemente mejora los sistemas de defensa antioxidante celular, incluida la regulación positiva de las enzimas antioxidantes o la eliminación directa de los radicales libres.

Además, los diversos resultados observados con las diferentes concentraciones de hidrolato y los desafíos subrayan la complejidad de los efectos del hidrolato de saúco sobre el daño del ADN. Los matices en los resultados pueden estar relacionados con variaciones en las concentraciones de fitoquímicos específicos dentro del hidrolato de saúco, cada uno de los cuales contribuye de manera diferente a su capacidad protectora general.

La presencia de fenilacetaldehído, 2-acetilpirrol y el compuesto no identificado en el hidrolato de saúco sugiere una bioactividad potencial que podría correlacionarse con los efectos genotóxicos observados. El fenilacetaldehído, predominante (26,7%) en el hidrolato determinado al utilizar la muestra sin procesar, así como en ambos acetato de etilo (100%; fue el único

compuesto detectado) y extractos de hexano (82,6%), es un compuesto fragante conocido que ha demostrado diversas actividades biológicas, incluidas propiedades antimicrobianas y antioxidantes [25-27]. Estas propiedades podrían contribuir a los efectos antígenotóxicos observados en el ensayo Comet, ya que se sabe que los antioxidantes mitigan el daño al ADN inducido por el estrés oxidativo.

El compuesto no identificado, que constituye una porción significativa del hidrolato (59,7%; hidrolato sin procesar), justifica una mayor investigación para dilucidar su estructura y posible actividad biológica. La evaluación genotóxica, que mostró una reducción del daño en el ADN, indica que el efecto combinado de estos compuestos puede conferir propiedades protectoras contra agentes genotóxicos.

Además, el 2-acetilpirrol, otro compuesto identificado, se ha estudiado por sus posibles actividades biológicas, incluidas sus propiedades antioxidantes [28,29]. Este compuesto también podría desempeñar un papel en los efectos antígenotóxicos observados, aunque su mecanismo de acción exacto en este contexto aún debe explorarse más a fondo. El n-hexanal (3,3%) y el furfural (4,5%), detectados en extractos

de hexano en concentraciones más bajas, también poseen actividades biológicas conocidas, incluidas propiedades antioxidantes [30,31].

Su presencia, aunque menor, podría mejorar sinérgicamente el efecto antígenotóxico general del hidrolato.

(E)-beta-Damascenona, un compuesto presente en extractos de hexano al 2,2%, es otro contribuyente a la actividad biológica del hidrolato. Sus propiedades antioxidantes respaldan aún más la capacidad del hidrolato para proteger contra el daño del ADN [32].

Además, el 2-acetilpirrol (13,7%; hidrolato sin procesar) en el hidrolato de saúco puede mejorar su capacidad para proteger contra el daño del ADN. Las propiedades antioxidantes del 2-acetilpirrol podrían mitigar los efectos del estrés oxidativo inducido por agentes genotóxicos como el SN y el H₂O₂ [29]. Este efecto protector sería consistente con la reducción observada en el daño del ADN en el ensayo Comet.

La caracterización química del hidrolato de saúco identifica compuestos esenciales que probablemente contribuyan a su actividad biológica. La evaluación genotóxica apoya la hipótesis de que estos compuestos, particularmente el fenilacetaldéhid y posiblemente el compuesto no identificado, tienen potencial antígenotóxico. Se requieren más estudios para comprender completamente los mecanismos por los cuales estos compuestos ejercen sus efectos protectores contra el daño del ADN.

Estos hallazgos subrayan el potencial del hidrolato de saúco como un recurso valioso para aplicaciones que requieren propiedades antioxidantes y antígenotóxicas, como en los cosméticos. Se necesitan más estudios para dilucidar completamente los mecanismos mediante los cuales estos compuestos ejercen sus efectos protectores e identificar la estructura y actividad del compuesto no identificado.

4.3. Actividad de eliminación de peróxido de hidrógeno

La ausencia de actividad eliminadora de H₂O₂ detectable en el hidrolato de saúco se debe a la ausencia de compuestos químicos capaces de catalizar la descomposición del H₂O₂ en H₂O y O₂, así como a la inactivación de enzimas como la catalasa y otras peroxidasas durante la destilación al vapor. proceso, que tiene implicaciones significativas para comprender el posible papel protector del hidrolato de saúco contra el daño del ADN.

La catalasa es una enzima crucial responsable de catalizar la descomposición del H₂O₂ en agua y oxígeno, previniendo así la acumulación de esta especie reactiva de oxígeno (ROS) y mitigando el daño inducido por el estrés oxidativo [33].

El proceso de destilación al vapor, que involucra temperaturas elevadas, puede haber resultado en la desnaturalización o inactivación de las peroxidasas presentes en las bayas de saúco. Esta inactivación podría explicar la falta de actividad catalasa observada en el ensayo posterior, donde se probó la capacidad del hidrolato de saúco para dismutar H₂O₂ [34].

A la luz de estos hallazgos, la ausencia de actividad catalasa en el hidrolato de saúco sugiere que otros mecanismos antioxidantes pueden contribuir a sus posibles efectos protectores contra el daño del ADN. La reducción observada en el daño al ADN dependiente de la concentración, particularmente bajo condiciones de estrés oxidativo, implica que el hidrolato de saúco puede albergar compuestos bioactivos capaces de eliminar los radicales libres y mitigar

efectos genotóxicos. Estos efectos protectores sobre el ADN pueden atribuirse a la presencia de otros antioxidantes, como los polifenoles o los flavonoides, que podrían desempeñar un papel en la contrarrestación del daño oxidativo.

Las implicaciones del hidrolato de saúco como agente protector contra el daño del ADN, incluso sin enzimas antioxidantes, resaltan la naturaleza compleja y multifacética de sus componentes bioactivos. Investigaciones adicionales sobre los compuestos antioxidantes específicos presentes en el hidrolato de saúco, sus mecanismos de acción y sus posibles efectos sinérgicos contribuirán a una comprensión más completa del papel de la baya del saúco en la mitigación del estrés oxidativo y la preservación de la integridad del ADN. Estos hallazgos tienen implicaciones prometedoras para el desarrollo de productos naturales con propiedades protectoras del ADN adecuados para aplicaciones de cuidado de la piel y otras industrias.

4.4. Actividad antioxidante

Los resultados obtenidos con los dos métodos para evaluar la actividad antioxidante (ABTS y DPPH) sugieren fuertemente que el hidrolato de saúco tiene un potencial antioxidante considerable, con concentraciones más altas que se correlacionan con una actividad antioxidante más significativa [35]. Estos datos subrayan el papel prometedor del hidrolato de saúco como fuente de antioxidantes naturales, lo que tiene implicaciones potenciales para diversas industrias que buscan compuestos naturales ricos en antioxidantes para el desarrollo de productos y aplicaciones de salud.

Estos hallazgos arrojan luz sobre la relación matizada entre la composición cualitativa y cuantitativa del hidrolato y la actividad antioxidante, proporcionando información valiosa para una mayor exploración de los mecanismos subyacentes y las posibles aplicaciones en cosméticos, alimentos funcionales o productos farmacéuticos. Cabe señalar que las propiedades antioxidantes de los compuestos presentes en el hidrolato pueden explicar el efecto protector observado en el daño del ADN inducido por H₂O₂ y SN. Sin embargo, no se puede descartar que algunos de los compuestos puedan estimular los sistemas de reparación del ADN presentes en la célula.

4.5. Limitaciones

Si bien este estudio proporciona información valiosa sobre los beneficios potenciales del hidrolato de saúco para el cuidado de la piel y otras aplicaciones, varias limitaciones merecen consideración. En primer lugar, el tamaño de la muestra del estudio, que se basó en datos obtenidos de un único voluntario sano, puede limitar la generalización de los hallazgos a una población más amplia. Además, el uso de bayas de saúco procedentes de un lugar específico y en un momento específico puede introducir variabilidad debido a diferencias geográficas y variaciones estacionales en la composición de las plantas. No se controlaron variables de confusión como la dieta, los factores del estilo de vida y las exposiciones ambientales, lo que podría influir en los resultados observados. Abordar estas limitaciones mediante tamaños de muestra más grandes, diseños experimentales controlados y la consideración de posibles factores de confusión podría mejorar la validez y la generalización de investigaciones futuras en esta área.

5. Conclusiones

Este estudio arroja luz sobre el potencial de la baya del saúco como ingrediente natural en productos de belleza y cuidado de la piel. La exploración de la destilación al vapor de saúco destaca sus diversos beneficios para la salud de la piel y enfatiza la accesibilidad y sostenibilidad del uso de este método. A medida que la demanda de cosméticos naturales y prácticas sostenibles continúa aumentando, estos hallazgos contribuyen al creciente conjunto de investigaciones que respaldan la integración de los recursos de la naturaleza en los regímenes contemporáneos de cuidado de la piel. Al unir la tradición y la ciencia moderna, la baya del saúco ejemplifica la sinergia armoniosa entre la naturaleza y el bienestar personal. Este estudio destaca los atributos multifacéticos del hidrolato de saúco, posicionándolo como un ingrediente natural prometedor para mejorar la salud de la piel y abordar diversos problemas cutáneos. La presencia de compuestos bioactivos como el fenilacetaldehído y el 2-acetilpirrol, junto con la actividad potencial del compuesto no identificado, subraya el potencial del hidrolato en cosméticos y otras aplicaciones que requieren propiedades antioxidantes y antígeno tóxicas. Se necesitan más investigaciones para dilucidar

mediante el cual estos compuestos ejercen sus efectos protectores y para identificar los no identificados estructura y actividad del compuesto. Estos hallazgos contribuyen al creciente cuerpo de conocimiento sobre los beneficios de la baya del saúco, respaldando su uso como valioso producto natural y sostenible. recurso de desarrollo de productos.

Contribuciones de los autores: SG, FP, KS, NKG e IG: conceptualización, redacción: revisión y edición; SG, KS, NKG y FP: Investigación, recursos, metodología, validación, curación de datos y visualización; SG: Redacción del borrador original; administración de proyectos y análisis formal; FP y IG: Supervisión; IG: Financiación. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada de el manuscrito.

Financiamiento: Este trabajo fue apoyado por el proyecto UIDB/00772/2020 (<https://doi.org/10.54499/UIDB/00772/2020>), financiado por la Fundación Portuguesa para la Ciencia y la Tecnología (FCT).

Declaración de la Junta de Revisión Institucional: Este estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Trás-os-Montes y Alto Duero (Doc4-CE-UTAD-2023, 27 de enero de 2023).

Declaración de consentimiento informado: Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos involucrados en el estudio.

Declaración de disponibilidad de datos: Los datos que respaldan los hallazgos y conclusiones están disponibles al solicitud del autor correspondiente.

Agradecimientos: Los autores agradecen a Dinis Diogo y Guy Gonçalves por proporcionar los ingredientes. analizados en esta investigación y coadyuvantes en la destilación al vapor. Los autores agradecen a Tiago Ferreira por ayudando con el análisis estadístico.

Conflictos de intereses: Los autores declaran que la investigación se realizó sin fines comerciales. o relaciones financieras que podrían interpretarse como posibles conflictos de intereses.

Abreviaturas

Abreviatura	A término
ABTS	Ácido 2,2'- azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
C	Grupo control tratado con PBS
C 1, C 5, C 10, C 15	Grupos control tratados con PBS y el respectivo hidrolato de saúco concentraciones (1%, 5%, 10%, 15%)
C+	Grupo sometido únicamente a tratamiento SN
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EbH	Hidrolato de saúco
Fpg	formamido-piridinina[fapy]-ADN glicosilasa
GDI	Indicador de daño genético
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HVA	ácido homovanílico
H2O2	Peróxido de hidrógeno
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica.
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
SN	estreptonigrina
TÉCA	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox

Referencias

1. Liu, J.-K. Productos naturales en cosmética. Nat. Pinchar. Bioprospectiva. 2022, 12, 40. [\[Referencia cruzada\]](#)

2. Maleš, I.; Pedisić, S.; Zorić, Z.; Elez-Garofulić, I.; Repajić, M.; Tu yo.; Vladimir-Knežević, S.; Butorac, D.; Dragović-Uzelac, V. El Plantas medicinales y aromáticas como ingredientes en la producción de bebidas funcionales. J. Función. Alimentos 2022, 96, 105210. [\[CrossRef\]](#)

3. Precios.; Price, L. Aromaterapia para profesionales de la salud, 2ª ed.; Churchill Livingstone: Londres, Reino Unido, 1999.

4. Xu, C.; Li, Q.; Wang, N.; Liu, D.; Guo, C. Identificar y discriminar atributos de aroma y componentes bioactivos de cinco Aceites esenciales comerciales de semillas de apio (*Apium graveolens* L.) utilizando E-nose, HS-GC-IMS y GC-MS. LWT 2023, 184, 115094. [\[Referencia cruzada\]](#)

5. Gonçalves, S.; Gaivão, I. Ingredientes naturales comunes en la región de Trás-os-Montes (Portugal) para uso en la industria cosmética: Una revisión sobre composición química y propiedades antigenotóxicas. Moléculas 2021, 26, 5255. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

6. Tiralongo, E.; Pequeño, S.; Lea, R. La suplementación con saúco reduce la duración del resfriado y los síntomas en los viajeros aéreos: un estudio aleatorio Ensayo clínico controlado con placebo, doble ciego y personalizado. *Nutrientes* 2016, 8, 182. [\[CrossRef\]](#)
7. Liu, D.; Éi, X.-Q.; Wu, D.-T.; Li, H.-B.; Feng, Y.-B.; Zou, L.; Gan, RY Saúco (*Sambucus nigra* L.): compuestos bioactivos, funciones para la salud y aplicaciones. *J. Agrícola. Química de los alimentos*. 2022, 70, 4202–4220. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Gonçalves, S.; Gaivão, I. La Bella y la Bestia Tóxica: Uso del ensayo Comet para estudiar la antigenotoxicidad de ingredientes naturales. *En Productos Cosméticos e Industria-Nuevos Avances y Aplicaciones*; Ahmad, DU, Akhtar, PJ, Eds.; IntechOpen: Rijeka, Croacia, 2023. [\[Referencia cruzada\]](#)
9. Proença da Cunha, A.; Pereira da Silva, A.; Costa, MdC; Rodríguez Roque, O.; Proença da Cunha, H.; Proença Portugal, M. *Manual de Plantas Mediciniais—Bases Farmacológicas e Clínicas*; Dinalivro: Lisboa, Portugal, 2017.
10. Tisserand, R.; Young, R. Seguridad de los aceites esenciales: una guía para profesionales de la salud, 2ª ed.; Elsevier: Ámsterdam, Países Bajos. tierras, 2014. [\[CrossRef\]](#)
11. Sierra, LM; Gaivão, I. (Eds.) Genotoxicidad y reparación del ADN; Springer: Nueva York, NY, EE. UU., 2014. [\[CrossRef\]](#)
12. Collins, AR El ensayo Comet para reparación y daño del ADN: principios, aplicaciones y limitaciones. *Mol. Biotecnología*. 2004, 26, 249–261. [\[Referencia cruzada\]](#)
13. Oliva, PL; Banáth, JP El ensayo del cometa: un método para medir el daño del ADN en células individuales. *Nat. Protocolo*. 2006, 1, 23–29. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Benhusein, GM; Mutch, E.; Aburawi, S.; Williams, FM Efecto genotóxico inducido por peróxido de hidrógeno en hepatoma humano células utilizando el ensayo cometa. *Libio J. Med*. 2010, 5, 4637. [\[Referencia cruzada\]](#)
15. Fairbairn, DW; Oliva, PL; O'Neill, KL El ensayo del cometa: una revisión exhaustiva. *Mutación. Res. Gineta. Toxico*. 1995, 339, 37–59. [\[Referencia cruzada\]](#)
16. Hartmann, A. Recomendaciones para realizar el ensayo Comet alcalino in vivo . *Mutagénesis* 2003, 18, 45–51. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Singh, NP; Stephens, RE Electroforesis en microgel: sensibilidad, mecanismos y electroestiramiento del ADN. *Mutación. Res. Reparación* 1997, 383, 167–175. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. La Valeta, EA; Berton, G. Desensibilización del metabolismo del oxígeno de los macrófagos en ligandos inmovilizados: efecto diferente de la inmunoglobulina G y complemento. *J. Immunol*. 1987, 138, 4366–4373. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Park, Y.-S.; Towantakavanit, K.; Kowalska, T.; Jung, ST.-T.; Ham, K.-S.; Heo, B.-G.; Cho, J.-Y.; Yun, J.-G.; Kim, H.-J.; Gorinstein, S. Compuestos bioactivos y actividades antioxidantes y antiproliferativas de cultivares de loto blanco coreano. *J. Med. Alimentos* 2009, 12, 1057–1064. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Yen, GC; Duh, PD Efecto eliminador de extractos metanólicos de cáscaras de maní sobre especies de radicales libres y oxígeno activo. *J. Agrícola. Química de los alimentos*. 1994, 42, 629–632. [\[Referencia cruzada\]](#)
21. Hale, A. Los compuestos volátiles de las bayas de saúco (*Sambucus nigra* L.). *Nat. Esencia volátil. Óleos* 2014, 1, 51–54.
22. Seçilmi, s Canbay, H. Eficacia de la extracción líquido-líquido, la extracción en fase sólida y la técnica de espacio de cabeza para la determinación de algunos compuestos volátiles solubles en agua del agua aromática de rosas. En t. *J. Anal. Química*. 2017, 2017, 4870671. [\[Referencia cruzada\]](#)
23. Clough, SR Hexano. En *Enciclopedia de Toxicología*, 3ª ed.; Wexler, P., Ed.; Prensa académica: Oxford, Reino Unido, 2014; págs. 900–904. [\[Referencia cruzada\]](#)
24. Silva, P.; Ferreira, S.; Nunes, FM Subproductos de saúco (*Sambucus nigra* L.) una fuente de antocianinas y polifenoles antioxidantes. *Prod. de cultivos industriales*. 2017, 95, 227–234. [\[Referencia cruzada\]](#)
25. Kobayakawa, T.; Tamamura, H. Capítulo siete: isómeros de dipéptidos de cloroalqueno como peptidomiméticos. En *Métodos en Enzimología*; Petersson, EJ, Ed.; Prensa académica: Cambridge, MA, EE. UU., 2021; Volumen 656, págs. 191–239.
26. Pan, H.; Xiao, Y.; Xie, A.; Li, Z.; Ding, H.; Yuan, X.; Sol, R.; Peng, Q. El mecanismo antibacteriano del ácido fenilacético aislado de *Bacillus megaterium* L2 contra *Agrobacterium tumefaciens*. *PeerJ* 2022, 10, e14304. [\[Referencia cruzada\]](#)
27. Choi, SA; Kim, SL; Kim, J.-H.; Ko, Y.-C.; Lee, D.-S. El fenilacetaldehído volátil de una planta se dirige a las células madre del cáncer de mama mediante Inducción de ROS y Regulación de Señal Stat3. *Antioxidantes* 2020, 9, 1119. [\[CrossRef\]](#)
28. Lasekan, O.; Teoh, LS Contribución de compuestos aromáticos a las propiedades antioxidantes del ñame blanco tostado (*Dioscorea rotundata*). *BMC Química*. 2019, 13, 133. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Yanagimoto, K.; Lee, KG; Ochi, H.; Shibamoto, T. Actividad antioxidante de compuestos heterocíclicos encontrados en volátiles del café producidos por la reacción de Maillard. *J. Agrícola. Química de los alimentos*. 2002, 50, 5480–5484. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Elisia, I.; Kitts, DD Cuantificación de hexanal como índice de oxidación de lípidos en la leche humana y asociación con antioxidantes. componentes. *J. Clin. Bioquímica. Nutrición*. 2011, 49, 147–152. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Pigatto, PD; Diani, M. Efectos beneficiosos del palmitato de furfurilo antioxidante en tratamientos no farmacológicos (dispositivos emolientes recetados, PED) para la dermatitis atópica y trastornos de la piel relacionados. *Dermatol. El r*. 2018, 8, 339–347. [\[Referencia cruzada\]](#)
32. Jurišić Grubešić, R.; Nazlić, M.; Miletić, T.; Vuko, E.; Vuletić, N.; Ljubenkov, I.; Dunkić, V. Capacidad antioxidante de compuestos volátiles libres de *Olea europaea* L. cv. Hojas Oblica Dependiendo de la Etapa de Vegetación. *Antioxidantes* 2021, 10, 1832. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Nandi, A.; Yan, L.-J.; Jana, CK; Das, N. Papel de la catalasa en el estrés oxidativo y las enfermedades degenerativas asociadas a la edad. *Óxido. Medicina. Celula. Longev*. 2019, 2019, 9613090. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)

34. Chanwun, T.; Muhamad, N.; Chirapongsatonkul, N.; Churngchow, N. Hevea brasiliensis suspensión celular peroxidasa: purificación, Caracterización y aplicación para la decoloración de tintes. *AMB Express* 2013, 3, 14. [\[Referencia cruzada\]](#)
35. Lee, KJ; Oh, YC; Cho, WK; Ma, JY Determinación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de cien tipos de compuestos químicos puros mediante un ensayo de detección HPLC fuera de línea y en línea. *Complemento basado en Evid. Alternativo. Medicina. ECAM* 2015, 2015, 165457. [\[Referencia cruzada\]](#)

Descargo de responsabilidad/Nota del editor: Las declaraciones, opiniones y datos contenidos en todas las publicaciones son únicamente de los autores y contribuyentes individuales y no de MDPI ni de los editores. MDPI y/o los editores renuncian a toda responsabilidad por cualquier daño a personas o propiedad que resulte de cualquier idea, método, instrucción o producto mencionado en el contenido.