

**UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA**  
**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**TOXICIDAD AGUDA Y EFECTO HEPATOPROTECTOR DEL  
EXTRACTO ETANÓLICO DE LOS TALLOS DE *ENCELIA  
CANESCENS LAMARCK.*, EN RATAS EN UN MODELO DE  
INTOXICACIÓN CON PARACETAMOL**

**TESIS**

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

**PRESENTADO POR:**

**BACH. COCHACHI ALFARO, YASMINA  
BACH. FERNÁNDEZ LANDA, DEISSY LIZ**

**ASESORES:**

**DRA. Q.F. CHÁVEZ ORELLANA, HAYDEE  
DRA. Q.F. HUAYANCA GUTIÉRREZ, CARMEN**

**ICA - PERÚ**

**2015**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo fruto de perseverancia y sacrificio se lo dedico en primer lugar a Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

**A mis padres, Adriano Y Gladys que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños,** Por estar siempre presentes a pesar de la distancia en cada paso que doy , por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

**A mis hermanos: Vladimir, Yordi y Edison** Siendo ellos mí impulso para continuar día a día.

**A mis abuelos:** que ellos siempre han confiado en mis capacidades y se han encargado de darme muchísimo ánimo.

**YASMINA.**

## **DEDICATORIA.**

Este trabajo dedico en primer lugar a **Dios** quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

**A mis padres, Humberto y Gregoria;** quienes por ellos soy lo que soy, por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles. Por valores y principios que me inculcaron, forjando en mí, carácter, empeño, perseverancia y coraje para conseguir mis objetivos.

**A mi hermano y una persona especial** por estar siempre presentes, acompañándome para poderme realizar.

**DEISSY LÍZ**

## **AGRADECIMIENTO.**

De manera muy especial, agradecemos a los asesores la Dra. Chávez Orellana, Haydee y Q.F. Huayanca Gutiérrez, Carmen quienes nos han brindado su confianza y apoyo, así como también sus consejos, no solo como maestras sino como amigas.

A los profesores quiénes siempre estuvieron disponible para cualquier consulta y siempre es un apoyo.

Un agradecimiento muy especial a nuestras amigas Yanina, Fiorella, Cruzcaya y a nuestra familia de Asociación científica de Investigación Farmacéutica (ACIF) nuestro mayor reconocimiento y gratitud.

**D.LIZ Y YASMINA.**

## **INDICE**

### **Página**

**SUMARY. .... 1**

**RESUMEN ..... 3**

### **I. INTRODUCCIÓN.**

### **II. MARCO TEORICO.**

**2.1. ANATOMÍA DEL HÍGADO. .... 10**

**2.1.1. Componentes estructurales del hígado..... 11**

**2.2. FUNCIONES DEL HÍGADO. .... 16**

**2.2.1. Metabolismo de proteínas. .... 17**

**2.2.2. Metabolismo de hidratos de carbono..... 18**

**2.2.3. Metabolismo de los lípidos. .... 19**

**2.2.4. Detoxificación de fármacos y toxinas. .... 19**

**2.3. MARCADORES DE LESIÓN HEPÁTICA. .... 20**

**2.3.1. Transaminasa hepáticas..... 20**

**2.3.2. Niveles normales de transaminasas. .... 21**

**2.3.3. Determinación de TGO/TGP en suero..... 21**

**2.3.4. Elevación de TGO/TGP..... 22**

**2.3.5. Fosfatasa alcalina..... 23**

2.3.6.	Proteínas totales.....	24
2.3.7.	Albumina.....	25
2.3.8.	Bilirrubina.....	25
2.4.	<b>VALORES NORMALES DE LAS ENZIMAS HEPÁTICAS EN LAS RATAS.....</b>	<b>26</b>
2.5.	<b>HEPATOTÓXICIDAD.....</b>	<b>26</b>
2.5.1.	Mecanismo de daño hepático.....	27
2.5.2.	Agentes hepatotóxicos.....	28
2.5.3.	Tetracloruro de carbono.....	29
2.5.4.	Paracetamol.....	29
2.5.4.1.	Biotransformación del paracetamol.....	31
2.5.4.2.	Biotransformación de dosis terapéuticas.....	31
2.5.4.3.	Biotransformación de dosis tóxicas.....	33
2.5.4.4.	Mecanismo de hepatotoxicidad por paracetamol.....	34
2.5.4.5.	Manifestaciones clínicas.....	37
2.6.	<b>TOXICIDAD AGUDA.....</b>	<b>38</b>
2.7.	<b>PLANTAS MEDICINALES CON EFECTO HEPATOPROTECTOR....</b>	<b>39</b>
2.7.1.	<i>Encelia canescens Lamarck</i> .....	41
2.7.2.	Descripción botánica.....	41
2.7.3.	Distribución geográfica.....	42
2.7.4.	Uso en la medicina popular.....	42

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS.**

<b>3.1. MATERIALES.....</b>	<b>44</b>
3.1.1. Material biológico.....	44
3.1.2. Material de vidrio.....	44
3.1.3. Reactivos y disolventes.....	44
3.1.4. Medicamentos.....	44
3.1.5. Equipos.....	44
<b>3.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA.....</b>	<b>45</b>
3.2.1. Estudio fitoquímico.....	45
3.2.2. Recolección, selección y secado de la muestra en estudio.....	45
3.2.3. Clasificación taxonómica.....	45
3.2.4. Obtención del extracto etanólico.....	45
3.2.5. Screening fitoquímico.....	46
3.2.5.1. Obtención de fracciones.....	46
3.2.5.2. Detección de grupos funcionales y metabolitos secundarios..	47
<b>3.3. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA.....</b>	<b>52</b>
3.3.1. Método experimental.....	52
<b>3.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR.....</b>	<b>53</b>
3.4.1. Método experimental.....	53
3.4.2. Ensayos bioquímicos.....	54
3.4.2.1. Determinación de alanina aminotransferasa.....	54

<b>3.4.2.2.</b>	<b>Determinación de aspartato aminotransferasa.....</b>	<b>56</b>
<b>3.4.2.3.</b>	<b>Determinación de fosfatasa alcalina.....</b>	<b>57</b>
<b>3.4.2.4.</b>	<b>Determinación de proteínas totales.....</b>	<b>58</b>
<b>3.4.2.5.</b>	<b>Determinación de albúmina.....</b>	<b>59</b>
<b>3.4.2.6.</b>	<b>Análisis histopatológico.....</b>	<b>61</b>
<b>3.5.</b>	<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>61</b>

#### **IV. RESULTADOS.**

<b>4.1.</b>	<b>ESTUDIO FITOQUÍMICO.....</b>	<b>63</b>
<b>4.2.</b>	<b>Clasificación Taxonómica.....</b>	<b>63</b>
<b>4.3.</b>	<b>Screening Fitoquímico.....</b>	<b>64</b>
<b>4.4.</b>	<b>TOXICIDAD AGUDA.....</b>	<b>65</b>
<b>4.4.1.</b>	<b>Comportamiento del peso corporal.....</b>	<b>65</b>
<b>4.4.2.</b>	<b>Síntomas clínicos.....</b>	<b>66</b>
<b>4.4.3.</b>	<b>Examen anatomopatológicos macroscópicos.....</b>	<b>67</b>
<b>4.5.</b>	<b>EFETO HEPATOPROTECTOR.....</b>	<b>67</b>

<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>79</b>
-----------	-----------------------	-----------

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>83</b>
--------------------------	-----------

<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>85</b>
-----------------------------	-----------

**REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS..... 87**

**ANEXOS.....104**

## ABREVIATURAS

**ALAT:** Alanina aminotransferasa.

**ALP:** Fosfatasa alcalina.

**APAP:** Paracetamol.

**ASAT:** Aspartato aminotransferasa.

**°C:** Grados Centígrados.

**cm:** Centímetros.

**C max:** Concentración máxima.

**CCL4:** Tetracloruro de carbono.

**DL50:** Dosis letal media.

**EES:** Rendimiento de extracto etanólico seco.

**FeCl3:** Tricloruro férrico.

**g:** Gramos.

**GSH:** Glutación.

**GSSG:** Glutación disulfuro.

**GPX:** Glutathion peroxidasa.

**H2O:** Agua.

**H2O2:** Peróxido de hidrogeno.

**Kg:** Kilogramo.

**L:** Litro.

**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad.

**M:** Muestra.

**mg:** Miligramos.

**Min:** Minutos.

**mL:** Mililitro.

**NACN:** Acetilcisteína.

**NAPQI:** N – acetil p-benzoquinoneimina.

**nm:** Nanómetro.

**NASH:** Esteatohepatitis no alcohólica.

**OMS:** Organización mundial de la salud.

**OPS:** Organización Panamericana de la Salud.

**Rf:** Franja de referencia.

**R:** Reactivo.

**RER:** Retículo endoplasmático rugoso.

**REL:** Retículo endoplasmático liso.

**Sil:** Silimarina.

**T max:** Temperatura máxima.

**TNT:** Trinitrotolueno.

**mm:** Milímetro.

**UI:** Microlitro.

**UNALM:** Universidad Nacional Agraria La Molina.

**VLDL:** lipoproteínas de muy baja densidad.

**VC:** Cloruro de vinilo.

**%:** Porcentaje.

# **SUMMARY**

The species *Encelia canescens* Lamarck (ECL) is traditionally used for its properties as galactófora, analgesic and anti urinary retention. However there is no scientific evidence of acute toxicity and hepatoprotective effect, is why in this study the acute toxicity and hepatoprotective effect of ethanol extract of ECL were evaluated. Acute toxicity was evaluated using dose limits taking into account the 3Rs principle. The hepatoprotective effect was determined at different doses (200, 400 mg / kg) of the extract, the liver damage induced with paracetamol (200 mg / kg) plus the hepatoprotective effect of the ethanol extract was compared ECL. with a commercial hepatoprotective drug (silymarin). The results of acute toxicity showed that the evaluated parameters remained normal having 100% survival. In the macroscopic studies were not in changes in the organs examined. Since this is an indicator that the LD50 of the extract is greater than 2000 mg / kg, and is classified as non-toxic as table Williams. Hepatoprotective effect in groups treated with the ethanol extract of ECL. transaminase levels show, phosphatase, albumin and the like to the control group total protein, being the most active extract 400 mg / kg the effect similar Silymarin 300 mg / Kg. Based on these Results suggests that the ethanol extract of ECL. Has hepatoprotective effect, possibly by the presence of flavonoids in synergism with other secondary metabolites found in Phytochemical Screening as triterpenes, amino acids, anthraquinones.

Keyword: Acute toxicity, hepatoprotective, *Encelia canescens* Lamarck, Paracetamol.

# **RESÚMEN**

La especie *Encelia canescens* Lamarck, (*ECL*), es utilizada tradicionalmente por sus propiedades como galactófora, analgésica y contra la retención de orina. Sin embargo no hay evidencias científicas sobre su toxicidad aguda y efecto hepatoprotector, es por ello que en este estudio se evaluaron la toxicidad aguda y efecto hepatoprotector del extracto etanólico de *ECL*. La toxicidad aguda se evaluó empleando dosis límite teniendo en cuenta el principio de las 3Rs. El efecto hepatoprotector fue determinado a diferentes dosis (200, 400 mg/Kg) del extracto, inducido el daño hepático con paracetamol (200 mg/Kg), además se comparó el efecto hepatoprotector del extracto etanólico de *ECL* con un fármaco hepatoprotector comercial (Silimarina). Los resultados de la toxicidad aguda mostraron que los parámetros evaluados permanecieron normales teniendo la supervivencia de un 100%. En los estudios macroscópicos no hubo lugar a modificaciones en los órganos examinados. Siendo esto un indicador de que la DL<sub>50</sub> del extracto es superior a 2000 mg/kg, y se clasifica como no tóxico según la tabla de Williams. En el efecto hepatoprotector los grupos tratados con el extracto etanólico de *ECL* muestran los niveles de transaminasas, fosfatasa, albúmina y proteínas totales similares al grupo control, siendo el extracto de mayor actividad el de 400 mg/Kg semejante al efecto de Silimarina a 300 mg/Kg. Tomando como base estos resultados se sugiere que el extracto etanólico de *ECL* posee efecto hepatoprotector, posiblemente por la presencia de Flavonoides en sinergismo con otros metabolitos secundarios que se encontraron en el Screening Fitoquímico como: triterpenos, aminoácidos, antraquinonas.

Palabra clave: Toxicidad aguda, hepatoprotector, *Encelia canescens* Lamarck, Paracetamol.

# I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades hepáticas representan un problema de salud a nivel mundial con importantes repercusiones, debido a la cantidad de funciones que realiza el hígado. El hígado es un órgano vital en el cuerpo humano, es el principal responsable del metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos, proteínas y desintoxicación de xenobióticos y drogas. Por lo tanto, el hígado se somete a lesión debido a la exposición crónica de drogas, sustancias tóxicas ambientales (humo de cigarrillo), enfermedades autoinmunes<sup>(1)</sup>, fármacos y otros xenobióticos<sup>(2)</sup>. Estas condiciones patológicas y las características metabólicas y de vascularización propias de este órgano lo hacen más vulnerable.

Las enfermedades hepáticas tienen una importante prevalencia en Latinoamérica, de una manera similar a lo que ocurre en el resto del mundo<sup>(3)</sup>.

Existen más de 900 drogas que han implicado daño hepático y es la razón más frecuente para retirar un medicamento del mercado. Muchos elementos químicos causan daño subclínico, es decir, que no se manifiesta con alguna sintomatología y se presentan solo con resultados anormales de las enzimas hepáticas. La hepatotoxicidad es responsable de un 5% de todos los ingresos hospitalarios y un 50% de todas las causas de insuficiencia hepática aguda<sup>(4)</sup>.

El paracetamol, también conocido como acetaminofén es ampliamente utilizado para el alivio de la fiebre, dolores de cabeza y otros dolores<sup>(5)</sup>. Estudios recientes indican que la sobredosis del paracetamol es la principal causa de falla hepática

aguda en adulto en estados unidos <sup>(6)</sup>. El paracetamol está involucrado en el 50% de los casos de falla hepática aguda en adultos, y en niños 13 % de los casos <sup>(7)</sup>.

El paracetamol se metaboliza principalmente en el hígado y no es tóxico en dosis adecuadas. Sin embargo, ya sea en sobredosis accidental o deliberada puede conducir hepatotoxicidad causada por el metabolito reactivo N-acetil-P-aminobenzoquinonaimina (NAPQI), lo que provoca el estrés oxidativo celular <sup>(8,9)</sup>. En junio del 2009 la administración de alimentos y medicamentos FDA <sup>(10)</sup>, mediante un comité asesor recomendó las nuevas restricciones que se deben de tener para proteger a las personas de los potenciales efectos tóxicos de paracetamol. Hasta el momento ningún tratamiento ha evitado con éxito la progresión de la enfermedad hepática.

En las últimas décadas se ha demostrado la eficiencia terapéutica de muchas preparaciones elaboradas a base de plantas medicinales <sup>(11)</sup>, muchos de estos poseen principios activos de fenoles y flavonoides, también contienen taninos y alcaloides en menor proporción y a estos componentes se les atribuyen efectos curativos sobre determinadas enfermedades <sup>(12)</sup>. De ahí la importancia de realizar estudios preclínicos con el propósito de detectar posibles efectos tóxicos post administración.

La validación científica de las plantas medicinales es una necesidad, no podemos limitar a la sabiduría popular la seguridad y eficacia de una planta, pues cada parte de ella tiene numerosas sustancias con actividad biológica, y algunos metabolitos

secundarios capaces de producir efectos tóxicos<sup>(13)</sup>. La introducción de estas en la terapéutica debe efectuarse sobre una base científica que valide tanto sus acciones farmacológicas como su toxicidad<sup>(14)</sup>.

Para la realización del presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

#### **OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar la toxicidad aguda y efecto hepatoprotector del extracto etanólico de los tallos de *Encelia canescens Lamarck*, en ratas en un modelo de intoxicación con Paracetamol.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Determinar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de los tallos de *Encelia canescens Lamarck* mediante Screening fitoquímico.
2. Determinar la dosis letal media (DL<sub>50</sub>).
3. Determinar la concentración que presenta mayor efecto hepatoprotector.
4. Comparar el efecto hepatoprotector del extracto etanólico de *Encelia canescens Lamarck* frente al medicamento Silimarina.
5. Realizar estudio histopatológico.

## **II. MARCO TEÓRICO**

## 2.1. ANATOMÍA DEL HÍGADO.

El hígado es después de la piel, el órgano más grande del organismo humano. El hígado se ve por primera vez en el embrión en desarrollo, durante la cuarta semana de embarazo. A medida que el feto se desarrolla, el hígado se divide en dos secciones, llamadas lóbulos derecho e izquierdo. Con el tiempo el lóbulo derecho será seis veces más grande que el izquierdo, pesa entre 1500 y 1900 g., alrededor del 3% del peso corporal de un adulto está representado por el hígado, recibe entre el 25 y 28% del flujo sanguíneo y utiliza aproximadamente el 20% de oxígeno total que necesita una persona <sup>(15)</sup>. Anatómicamente, se localiza en el cuadrante superior derecho y parte izquierdo por debajo del diafragma en la cavidad abdominal. Se considera una glándula mixta ya que posee funciones endócrinas y exocrinas. Está cubierto por la cápsula de Glisson, que es una fina cápsula de tejido conectivo, a su vez rodeada en su mayoría por el peritoneo <sup>(16)</sup>. Esta irrigado por las arterias hepáticas derecha e izquierda del tronco celiaco en un 15% y entre el 70 a 75% del riego proviene de la vena porta hepática con sangre procedente del tracto digestivo, páncreas y bazo, por lo tanto recibe los nutrientes absorbidos en el intestino (excepto lípidos que son transportados vía linfática), agentes tóxicos, fármacos, secreciones pancreáticas, productos de la degradación de las células sanguíneas del bazo. Por lo tanto las células hepáticas son las primeras en estar expuestas a una gran cantidad de compuestos tanto nutrientes como sustancias tóxicas <sup>(17)</sup>.

### 2.1.1. Componentes estructurales del hígado.

El **parénquima** que está conformado por placas de hepatocitos, el estroma de tejido conectivo que continua con la cápsula de Glisson y sostiene la estructuras de las ramificaciones de la vena porta, las arterias hepáticas y los conductos biliares así como los nervios y las venas centrales, los sinusoides hepáticos con espacios vasculares que recorren las placas de los hepatocitos y los espacios parasinusoidal de Disse que separa el endotelio de los sinusoides de los hepatocitos <sup>(18)</sup>, por otra parte se encuentra los lobulillos clásicos los cuales son unidades con forma hexagonal por donde atraviesan las arterias y las venas de las triadas portales que pasan por sinusoides hepáticos y termina en la vena centrolobulillar o en la vena hepática terminal. Los lobulillos portales son bloques triangulares de parénquima hepático de tres lobulillos clásicos que en su eje central poseen unos conductos biliares y constituyen la parte medular de los lobulillos hepáticos.

Los **acinos hepáticos** representan la unidad hepática más pequeña están formadas por tres zonas adyacentes de los lobulillos clásicos separados por los vasos sanguíneos de distribución que van de un espacio portal a otro; esta unidad correlaciona la irrigación, la histología del hígado y la actividad metabólica <sup>(19)</sup>.

Las tres zonas adyacentes de los lobulillos comprenden: la zona I que representa el área del tejido hepático que rodea en forma inmediata al dúctulo

biliar y a las ramas terminales de la vena porta y las arterias hepáticas, la zona II comprende el parénquima más alejado de estas estructuras, la región que rodea a la vena central y la zona III formada por el tejido hepático ubicado en las dos zonas anteriores.

Las **células kuppfer** son macrófagos específicos del hígado poseen forma estrellada y un núcleo oval grande, globoso y un núcleo visible, su citoplasma contiene una gran cantidad de lisosomas de tejido fagocitaria capaces de incorporar partículas grandes como eritrocitos y bacterias; también unen partículas pequeñas pero lo hacen a través de vesículas por pinocitosis. En estas células se expresa la enzima NADPH-oxidasa, la cual participa en el desarrollo de la lesión hepática inducidas por tóxicos. Tiene diversas funciones, la principal es de mantener las hemostasias hepáticas a diferentes niveles, y también a través de la liberación de citoquina tienen un papel muy relevante en los procesos inflamatorios del hígado.

Las **células estrelladas** o células de Ito se localizan en los espacios de Disse entre las células parenquimatosas y las células endoteliales de los sinusoides, su función principal es el almacenamiento de vitamina A, y también es responsable de la producción de matriz extracelular durante la fibrosis <sup>(20)</sup>. De manera normal las células estrelladas permanecen quiescentes pero pueden ser activadas por diversos factores que estimulan las lesiones hepáticas por lo que proliferan y generan matriz extracelular.

El desarrollo de fibrosis hepática esta mediado por citocinas específicas y especies reactivas de oxígeno (ROS) liberadas por los hepatocitos dañados, la células de kupffer y las células estrelladas activadas<sup>(21)</sup>.

Las células del Hoyo (Pit), son células con actividad citotóxica de forma similar a los linfocitos granulares de sangre periférica y en función parecida en la célula natural killer (asesinas naturales ) que reconocen a las células blanco a través de receptores específicos uniéndose a ellas y realizando sus funciones antitumorales por exocitosis de gránulos que contienen perforinas y granzimas, inducen apoptosis mediada por receptores y la activación de otras células del sistema inmune por la liberación de otras citocinas<sup>(22)</sup>.

Los **hepatocitos** conforman los estratos celulares de los lobulillos hepáticos, tienen forma poligonal y miden entre 20 y 30 um de diámetro y se disponen laminarmente en una o dos células de espesor de acuerdo a su localización dentro del lobulillo, constituyen aproximadamente el 80% de la población hepática y viven alrededor de 150 días. Algunos hepatocitos pueden tener dos núcleos, poseen un gran número de mitocondrias y peroxisomas, pequeños complejos de Golgi; en su citoplasma contienen el retículo endoplasmático rugoso (RER) y ribosomas libres donde se sintetizan las proteínas; además albergan inclusiones de glucógeno y depósitos. En el retículo endoplasmático liso (REL) se sintetizan los lípidos de las lipoproteínas y ahí mismo se degradan y conjugan toxinas, drogas y etanol; lo que propicia la hipertrofia de este organelo estimulando la síntesis de membrana y enzima del REL generando

tolerancia en los individuos que ingieren grandes cantidades de toxinas, drogas y etanol. Los hepatocitos poseen gran capacidad regenerativa ya que entran en mitosis cuando su población se ve afectada por cirugía, enfermedad o toxicidad<sup>(23)</sup>.

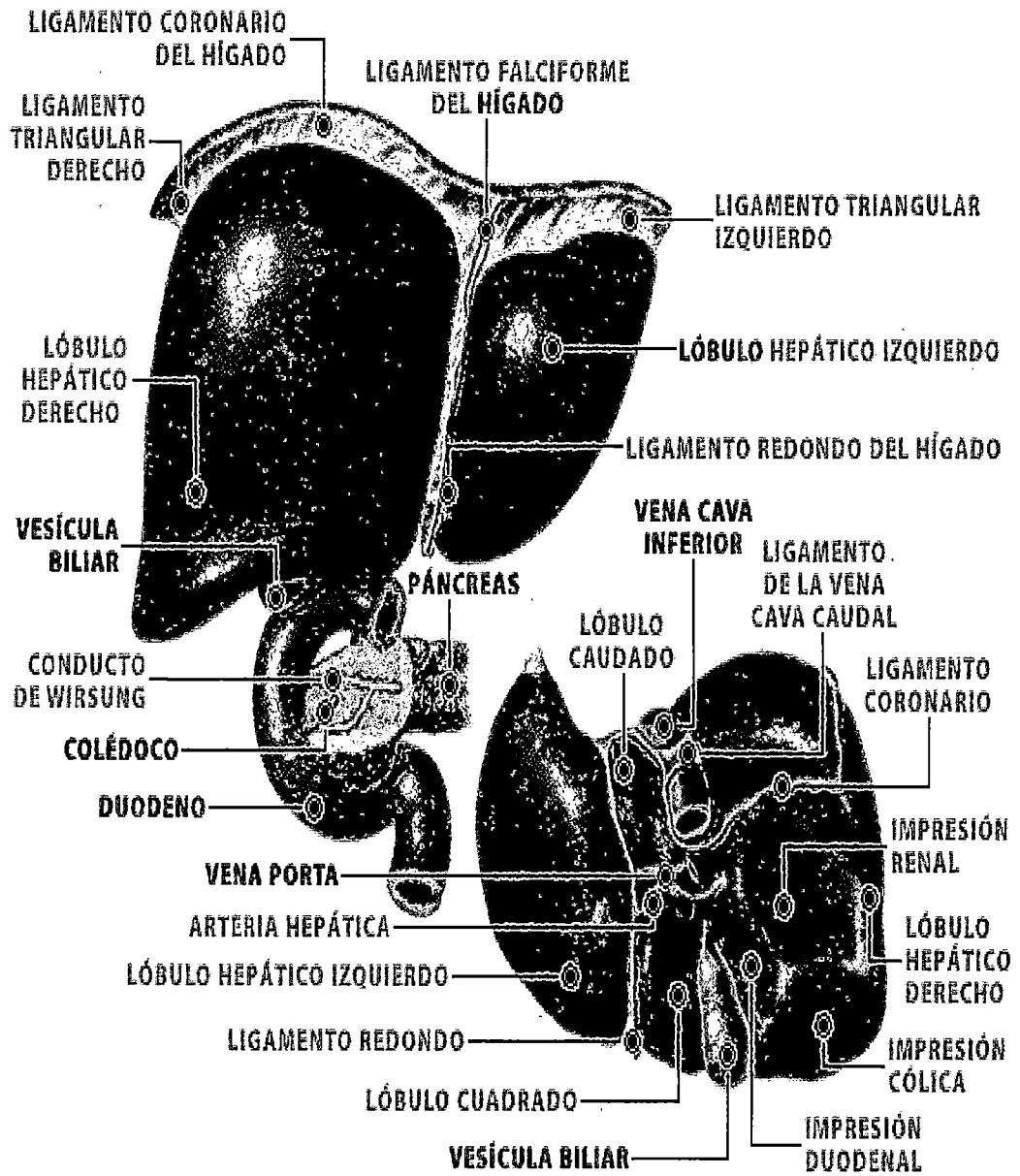


FIGURA Nº 01. Anatomía del hígado.

## 2.2. FUNCIONES DEL HÍGADO.

El hígado ejecuta un gran número de funciones y entre las más importantes están el almacenamiento y biotransformación de las sustancias que recibe por medio del torrente circulatorio y el sistema portal <sup>(24)</sup>.

Normalmente biotransforma y acumula sustancias útiles en el organismo tales como la glucosa, en forma de glucógeno, aminoácidos, grasas y vitamina A y vitamina B12 <sup>(25)</sup>.

El hígado está muy propenso a sufrir daños por la exposición a tóxicos debido a que los dos sistemas circulatorios pueden llevar hasta al hígado sustancias tóxicas o que se vuelven tóxicas con las transformaciones que tienen lugar en este órgano, a este proceso se le llama bioactivación <sup>(26)</sup>.

Algunas de las reacciones que sufren los tóxicos en el hígado de hecho los convierten en sustancias menos tóxicas o no tóxicas y más fáciles de excretar, a este proceso se le llama detoxificación. Para realizar sus funciones, el hígado cuenta con una gran cantidad de enzimas con funciones oxidativas y reductivas, entre las cuales se encuentran el sistema del citocromo de la proteína 450 (P-450), flavin-monooxigenasas, peroxidases, hidroxilasas, esterases y amilasas. Otras enzimas también presentes son las glucuroniltransferasas, las sulfotransferasas, metilasas, acetiltransferasas, tioltransferasas. Todas estas enzimas tienen gran importancia en las biotransformaciones de los tóxicos <sup>(26)</sup>.

El hígado produce y regula la concentración de ciertas sustancias de la sangre. Las sustancias producidas o controladas en el hígado son las albúminas, el

fibrinógeno y la mayoría de las globulinas y proteínas de la coagulación. Cuando hay descontrol de estas sustancias, el individuo se encuentra bajo en defensas y susceptible a problemas de coagulación. Ejemplo de sustancias reguladas por el hígado son los azúcares y los aminoácidos. Cuando se retrasa una ingesta, el hígado utiliza su almacén de glucógeno para producir glucosa y de las proteínas de reserva para producir aminoácidos. El hígado también tiene una función exocrina, produce la bilis por medio de la cual se excretan al intestino un número considerable de metabolitos <sup>(26)</sup>.

La capacidad funcional del hígado no puede medirse con porcentajes; no hay exámenes que nos permitan establecer cuál es el porcentaje de hígado sano. Se sabe que una persona sana puede tolerar resecciones de más de la mitad del hígado sin problemas. El hígado tiene la particularidad de regenerarse luego del daño causado por agentes externos o por una cirugía <sup>(27)</sup>. Mediante volumetría hepática (técnicas radiológicas para medir el volumen hepático) se ha propuesto que se puede resecar (sacar) hasta dejar el 26% del volumen del hígado residual antes de tener riesgo de insuficiencia hepática post-operatoria. Es así que habitualmente se acepta que 1/3 (33%) del volumen hepático es lo necesario para sobrevivir <sup>(27,28)</sup>.

### **2.2.1. Metabolismo de proteínas.**

La albúmina es la proteína plasmática de mayor importancia, regula el volumen sanguíneo y la presión oncótica. Las globulinas A y B transportan sustancias y regulan la presión coloidosmótica. En el hígado se degradan aminoácidos y el

amoniaco que se forma como producto del desecho altamente tóxico a través del ciclo de la urea. Se transforman los aminoácidos no esenciales en esenciales; son sintetizadas las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que transportan el colesterol desde el hígado a los tejidos del organismo, las lipoproteínas de baja densidad (VLDL) que transportan los triglicéridos desde el hígado a los tejidos y las proteínas de fase aguda importantes durante la respuesta inflamatoria<sup>(29)</sup>.

### **2.2.2. Metabolismo de los hidratos de carbono.**

En el hígado se lleva a cabo una parte importante del metabolismo de los hidratos de carbono, se inicia con la fosforilación de la glucosa a glucosa 6 fosfato, este es el primer paso de diversas rutas metabólicas y dependiendo de las necesidades energéticas de la célula, la glucosa 6 fosfato puede entrar a glucólisis para obtener energía o ser almacenada en forma de glucógeno hepático (glucogénesis) y durante un periodo de ayuno este será utilizado como combustible para la liberación de glucosa dando paso a la gluconeogénesis evento mediado por las hormonas adrenalina y glucagón<sup>(30)</sup>. Este órgano también realiza otro proceso bioenergético llamado gluconeogénesis que consiste en la obtención de glucosa a partir de otros metabolitos no hidrocarbonados y esto ocurre cuando las reservas energéticas se han agotado durante un ayuno de 12 horas o por ejercicio físico prolongado para mantener niveles normales de glucosa en sangre.

### **2.2.3. Metabolismo de los lípidos.**

En el hígado se lleva a cabo la lipogénesis o biosíntesis de ácidos grasos que consiste en una serie de reacciones cíclicas para la construcción de una molécula de ácidos grasos a través de la adición de dos moléculas de carbono derivadas de acetil CoA a una cadena de ácido graso; por otra parte, también se realiza la B-oxidación de ácidos grasos a partir de los depósitos de triglicéridos del tejido adiposo para proporcionar energía durante el ejercicio o el ayuno prolongado. En la degradación de los ácidos grasos se elimina dos unidades de carbono de la molécula de un ácido graso produciendo acetil CoA, que puede ser oxidado a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O por el ciclo de Krebs<sup>(31)</sup>.

### **2.2.4. Detoxificación de fármacos y toxinas.**

Las membranas que rodean las sinusoides están constituidas por una gran cantidad de fenestraciones o poros que permiten el paso directo de moléculas hacia los hepatocitos lo cual confiere a los hepatocitos esta capacidad de depurar fármacos, toxinas y drogas. Muchas de las sustancias no pueden ser eliminadas del organismo de manera directa por vía renal por lo que tienen que sufrir algunos procesos para convertirse en sustancias más solubles y así ser desechados. Esos procesos consisten en dos fases: oxidación y conjugación. La oxidación se realiza en el REL o en las mitocondrias de los hepatocitos y consisten en una serie de reacciones llevadas a cabo por las enzimas del citocromo P450 que oxidan a esas sustancias y las inactivan. La conjugación se

realiza con el ácido glucurónico, la glicina, taurina o radicales sulfato. En estudios se ha revelado que el consumo prolongado de ciertos fármacos genera hipertrofia del REL y por consiguiente aumentan las enzimas encargadas de estos procesos <sup>(32)</sup>.

### **2.3. MARCADORES DE LESIÓN HEPÁTICA.**

Muy frecuentemente en la práctica clínica se realizan diferentes estudios que reflejan el grado de funcionalidad del hígado. Según lo que se quiera conocer, se puede evaluar la excreción de compuestos a través de medición de bilirrubinas (total, directa e indirecta), la integridad hepatocelular (transaminasas) y síntesis de proteínas (albúmina) por mencionar algunos. La evaluación de enzimas es lo más utilizado, ya que generalmente se encuentran elevadas en presencia de lesión o enfermedad hepática <sup>(33,34)</sup>.

#### **2.3.1. Transaminasas hepáticas.**

Las transaminasas son unas enzimas, principalmente localizadas en el hígado. Para determinar las transaminasas es necesario un análisis de sangre. Es una prueba sencilla que lo único que requiere es una extracción de sangre del paciente en ayunas y que generalmente se extrae de una vena del antebrazo. Previamente a la extracción es necesario que el paciente, unos días antes, haga una dieta en la que no sobrecargue el hígado, no tomando alcohol, escasas proteínas y grasas, y también es importante no realizar esfuerzos físicos importantes <sup>(35)</sup>.

En el organismo las enzimas permiten, por ejemplo, transformar sustancias.

Dentro del grupo de las transaminasas las más importantes, ya que nos pueden indicar a través de un análisis de sangre que algo pasa en el organismo, son:

- **TGO o AST:** Transaminasa glutámico oxalacética. Está presente en casi todos los órganos, dentro de las células, y cuando se encuentra en sangre en niveles muy elevados significa que hay destrucción celular.

- **TGP o ALT:** Transaminasa glutámico pirúvica. Se localiza principalmente en el hígado y su misión es la fabricación de glucosa <sup>(35)</sup>.

### **2.3.2. Niveles normales de transaminasas.**

- Los niveles normales de AST en sangre son: 5-40 U/ml.

- Los niveles normales de ALT son: 5-30 U/ml.

Cuando realizamos un análisis de sangre la proporción que encontramos de AST en relación con ALT es: AST/ ALT: 1/3.

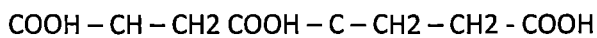
Se utilizan en la clínica para la confirmación diagnóstica del infarto agudo de miocardio (junto con la determinación de otras sustancias) y para el estudio de enfermedades hepáticas o musculares <sup>(36, 37)</sup>.

### **2.3.3. Determinación de AST/ALT en suero.**

La administración de un aminoácido con nitrógeno isotópico va seguida de la aparición de dicho nitrógeno en numerosos aminoácidos de las proteínas tisulares; es decir, el organismo utiliza el nitrógeno de un aminoácido para las síntesis de otros. Esta reacción general de traspaso de nitrógeno de uno a otro

aminoácido se denomina transaminación y en ella participan un aminoácido y un cetoácido <sup>(38)</sup>.

Las reacciones de transaminación más frecuentes son aquellas en las que participa alfa-cetoglutarato cuya aminación produce glutamato. Por consiguiente, casi todos los aminoácidos pueden ceder grupo amino al alfa-cetoglutarato, a través de una reacción de transaminación para formar el cetoácido correspondiente y glutamato. La reacción es de la siguiente forma:



La reacción precedente corresponde a la catalizada por la Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP) siendo igual para la que cataliza la Transaminasa Glutámico Oxaloacética (TGO), solamente cambiando el aminoácido por aspartato y el cetoácido por oxaloacetato, es por eso que se les llama también Alanino aminotransferasa (ALT) y Aspartato aminotransferasa (AST), respectivamente, por el aminoácido utilizado <sup>(38)</sup>.

#### **2.3.4. Elevación de AST Y ALT.**

AST y ALT son indicadores sensibles de daño hepático en diferentes tipos de enfermedades. Más debe ser enfatizado que tener niveles más altos que lo normal de estas enzimas no indica, necesariamente, una enfermedad hepática establecida. Ellas pueden indicar algún problema o no. La interpretación de los niveles altos de AST y ALT depende del cuadro clínico en general y así lo mejor es que esto sea determinado por médicos experimentados en hepatología. <sup>(39)</sup> Los niveles de estas enzimas no miden la extensión del daño

en el hígado o muestran un pronóstico de la marcha futura. Así, los niveles de AST y ALT no pueden ser usados para determinar el grado de daño hepático o indicar el futuro. En pacientes con hepatitis A aguda, las AST y ALT son muy altos (algunas veces alcanzan millares de unidades), pero la mayoría de estos pacientes con la hepatitis A recupera completamente el hígado, no quedando ningún daño.

En la hepatitis C solo es observada una pequeña elevación en las AST y ALT, siendo que algunos de estos pacientes pueden haber avanzado para una enfermedad crónica con fibrosis o cirrosis<sup>(36)</sup>.

#### **2.3.5. Fosfatasa alcalina (FA).**

La FA está comprometida en el transporte de metabolitos a través de las membranas celulares. Se le encuentra en orden decreciente de abundancia en la placenta, mucosa ileal, riñón, hueso e hígado. Los valores dependen de la técnica de laboratorio y varían poco entre las edades de 25 a 60 años. Después de los 60 se incrementan algo en la mujer por la mayor tendencia a la pérdida ósea. La colestasis estimula la síntesis de la FA por los hepatocitos. Las sales biliares detergentes u otros agentes de superficie facilitan la liberación de la FA de las membranas. Elevaciones aisladas de la FA puede observarse en otras condiciones tales como enfermedad de Hodgkin, diabetes, hipertiroidismo, insuficiencia cardíaca y enfermedad inflamatoria intestinal. La elevación de FA de origen hepático mayor de 3 veces lo normal ocurre primariamente en pacientes con enfermedad colestásica intra o extrahepática

y enfermedades infiltrativas tales como neoplasias granulomatosas, amiloidosis o enfermedad de Gaucher. Elevaciones menores de 3 veces no es específica de colestasis y puede observarse en cualquier daño hepático debido a que hay una buena correlación entre el aumento de la FA de origen hepático y otras enzimas de origen canalicular como la GTP, la elevación paralela de ambas es un buen indicador del origen hepático de la alteración ya sea colestasis aguda o crónica o enfermedades infiltrativas, lo que amerita complementar el estudio con imágenes <sup>(40)</sup>.

#### **2.3.6. Proteínas totales.**

También conocidas como proteinemia o proteínas séricas, designan la concentración de proteínas en el plasma sanguíneo. Y sus valores están entre 65 y 85 gramos por litro. Las proteínas totales están representadas por la albúmina y las diferentes globulinas, incluyendo alfa-, beta- y gamma globulinas. Hablamos de hipoproteinemia cuando la tasa de proteínas es anormalmente baja, esto se da particularmente en el caso de insuficiencia hepática, como la cirrosis, las enfermedades generadoras de mala absorción intestinal o enfermedades de los riñones que cursan con "fugas" de proteínas por la orina. En contraste, en la hiperproteinemia encontramos una dosis demasiado alta de proteínas en la sangre y puede ser debida a una deshidratación grave o indicar ciertas enfermedades como el mieloma. El estudio de las proteínas totales se realiza a través de una Electroforesis de proteínas o EPS <sup>(41)</sup>.

### **2.3.7. Albúmina.**

Es la proteína plasmática más abundante producida por los hepatocitos. La producción diaria depende de varios factores que incluyen los aminoácidos suministrados, la presión oncótica del plasma, los niveles de citoquinas inhibitorias (particularmente la IL-6) y el número de hepatocitos funcionales. Su vida media es larga entre 19 a 21 días. Por esta razón, la albúmina plasmática raramente disminuye en la hepatitis aguda, pero en la hepatitis crónica cae gradualmente con la progresión a cirrosis. Por tanto, la concentración de albúmina es un marcador de descompensación y pronóstico en cirrosis<sup>(41)</sup>.

### **2.3.8. Bilirrubinas.**

La bilirrubina es formada por la descomposición de los glóbulos rojos (grupo hemo) en el sistema retículo endotelial. La bilirrubina no conjugada se trasporta del bazo al hígado ligada a albúmina, es insoluble en agua por lo tanto no es excretada por medio de la orina. La bilirrubina conjugada puede ser excretada en la orina. Dentro del hígado es conjugada a bilirrubina glucoronido y posteriormente es secretada en la bilis y el intestino respectivamente. En el intestino la flora intestinal la degrada a urobilinógeno, el cuál cierta parte es reabsorbida y es excretada por el riñón a través de la orina o es excretada por el hígado a través del tracto gastrointestinal. El resto es eliminado por las heces y esto es lo que le da su color característico. Normalmente en el suero se encuentra en forma no conjugada reflejando el

balance entre la producción y la excreción hepatobiliar. La hiperbilirrubinemia es el resultado de un incremento de la bilirrubina en plasma. La bilirrubina total se altera por aumento de la hemólisis, alteraciones genéticas, anemia neonatal, alteraciones eritropoyéticas, presencia de drogas. La bilirrubina directa refleja colestasis hepática, alteraciones genéticas y alteraciones hepáticas.

La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílicodiazó midiéndose fotométricamente <sup>(42, 43)</sup>.

#### 2.4. VALORES NORMALES DE LAS ENZIMAS HEPÁTICAS EN LAS RATAS.

Los valores normales están dados en animales en condiciones normales, libre de cualquier situación de estrés <sup>(44)</sup>. Los valores están expuestos en la Tabla N° 01.

**TABLA N°01. Valores normales de transaminasas en ratas**

Especie	Valores normales	
Rattus novergicus	AST(U/L)	ALT(U/L)
	39-92	17-50

#### 2.5. HEPATOTOXICIDAD.

La hepatotoxicidad, también llamada enfermedad hepática tóxica inducida por drogas implica daño sea funcional o anatómico del hígado inducido por ingestión de compuestos químicos u orgánicos. El hígado está especialmente

expuesto a toxicidad por razón de su función en la biotransformación, metabolismo y eliminación de agentes potencialmente tóxicos. Ciertos productos medicinales, al tomarse en dosis elevadas o por un largo periodo de tiempo causan daños celulares, aunque la hepatotoxicidad es por lo general independiente de la concentración del fármaco, es decir, algunas drogas pueden causar daño hepático aún en dosis terapéuticas. La hepatotoxicidad puede ser causada por elementos naturales, remedios caseros o industriales, entre otros. Todo producto causante de daño al hígado se conoce como hepatotoxina <sup>(45)</sup>.

#### **2.5.1. Mecanismo de daño hepático.**

Muchas drogas son retiradas del mercado debido a un descubrimiento tardío de hepatotoxicidad. Debido a su metabolismo peculiar y a su cercana relación con el tracto gastrointestinal, el hígado es tremendamente susceptible a las injurias tóxicas. Cerca de un 75% de la sangre que llega al hígado viene directamente de los órganos gastrointestinales y el bazo por medio de la vena porta, el cual trae drogas y xenobióticos de forma concentrada. Son varios los mecanismos responsables bien sea de la inducción del daño hepático o de empeorar un proceso dañino <sup>(41)</sup>.

Muchos compuestos dañan a la mitocondria, un orgánulo intracelular que produce energía. Su disfunción libera una excesiva cantidad de oxidantes que, a su vez, causan daño a la célula hepática. La activación de algunas enzimas en el sistema citocromo P450, tales como el CYP2E1 también conllevan a estrés

oxidativo. Las lesiones a los hepatocitos y a las células del conducto biliar producen acumulación de bilis dentro del hígado. Ello promueve la aparición de daño adicional hepático <sup>(45)</sup>.

Las células que no pertenecen al parénquima hepático, como las células de Kupffer, células almacenadoras de grasa o células de Ito y leucocitos pueden tener un papel en estos mecanismos tóxicos <sup>(45)</sup>.

### **2.5.2. Agentes hepatotóxicos.**

Las sustancias hepatotóxicas son:

- El tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>).
- El cloruro de vinilo (VC).
- Los solventes orgánicos: la dimetilformamida, trinitrotolueno (TNT).
- Los metales pesados: como el Hg.
- Hierro y otros metales de transición: tales como cobre, vanadio, níquel, entre otros <sup>(46)</sup>.

Entre los medicamentos que producen hepatotoxicidad tenemos: metotrexato, isoniazida, paracetamol o acetaminofén (más de 8 pastillas de 500 mg en 7 horas), aspirina en dosis elevadas, su antídoto N-acetil cisteína, fluconazol, tamoxifeno, glucocorticoides, bloqueantes de los canales de calcio, benceno, amiodorona, antivirales, ácido valpróico, amoxicilina + ácido clavulánico, pirazinamida <sup>(46)</sup>; también las bebidas alcohólicas, ron, whisky, sake, vodka, etc.

Hay muchos más productos, lo que sucede, es que es el hígado el encargado de metabolizar la gran mayoría de drogas que entran al organismo, por lo cual, el

grado de hepatotoxicidad, también va a depender de la cantidad ingerida, si es intoxicación leve, aguda, crónica. Otro factor para la hepatotoxicidad también es la edad, fisiopatologías, situaciones de estrés<sup>(47)</sup>.

### **2.5.3. Tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>).**

Pertenece al grupo de los hidrocarburos halogenados, es poco soluble en agua y su descomposición térmica produce fosfógeno (Cl<sub>2</sub>CO), el cual es un tóxico respiratorio. El CCl<sub>4</sub> es metabolizado principalmente por la isoforma del citocromo P2E1, generando el hexacloroetano (Cl<sub>3</sub>CCCl<sub>3</sub>), el triclorometano (Cl<sub>3</sub>CH) y el fosfógeno (COCl<sub>2</sub>) entre otros productos<sup>(48)</sup>.

La administración de CCl<sub>4</sub> produce una disminución en la concentración de glutatión (GSH) debido a un incremento en su conversión a glutatión disulfuro (GSSG) durante el proceso de atrapamiento de los radicales CCl<sub>3</sub> y OOCCl<sub>3</sub> derivados de dicha hepatotoxina<sup>(49)</sup>. En consecuencia, este estado de estrés oxidativo conduce a un aumento incontrolable en la producción de radicales libres lo que conlleva a su vez aun exceso en la peroxidación de los lípidos de membrana.

### **2.5.4. Paracetamol.**

El paracetamol (acetaminofén, n acetil-p-aminofenol, 4-hidroxiacetilida, o APAP) es un analgésico antipirético que se utiliza actualmente en la clínica en humanos<sup>(50,51,52)</sup> a dosis terapéutica 1,2 g/día en hombres<sup>(53)</sup> presenta una gran seguridad farmacológica y se considera sustituto seguro y de fácil adquisición que la aspirina, ya que no presenta efectos secundarios tales como ulceración o

hemorragia gastrointestinal<sup>(54,55)</sup>, confiando en la seguridad farmacológica del APAP, inicialmente no se llevaron estudios farmacológicos serios; sin embargo, cuando se encontró que el APAP presentaba el principal metabolismo de la acetanilida y de la fenacetina dos fármacos utilizados en la clínica como analgésicos, los interés sobre sus características y propiedades fisicoquímicas y farmacológicas aumentaron considerablemente.

Uno de los hallazgos más importantes sobre la farmacología del APAP fue de Eder y Cols (1964)<sup>(56)</sup>, quienes reportaron estados necróticos hepáticos en gatos a lo que se administraron una dosis diaria de 25-50 mg/kg de paracetamol durante 26 semanas. Dos años después, en estudios de toxicidad aguda realizados en ratas Boyd y Berezky descubrieron un daño hepático extensivo<sup>(57)</sup>.

El primer caso reportado de hepatotoxicidad por paracetamol fue en el año 1966, Inglaterra. La toxicidad por paracetamol afecta mayoritariamente a personas de mediana edad (42 años), más frecuentemente en mujeres (3:2). La sobredosis con paracetamol es la causa más frecuente de insuficiencia hepática aguda (40%), seguida de las reacciones idiosincráticas (12%), desplazando a las de origen viral (HVA y HVB). En un 20% se desconoce la etiología<sup>(58,59)</sup>.

La incidencia mundial de muerte por sobredosis de APAP (dosis mayor de 15 gramos) aumentó dramáticamente durante las décadas pasadas; la necrosis hepática aguda, seguida de falla renal fulminante<sup>(60,61)</sup>.

#### **2.5.4.1. Biotransformación del paracetamol.**

El principal órgano involucrado en el metabolismo del paracetamol es el hígado.

En general, puede abordarse desde dos condiciones diferentes:

- Biotransformación a dosis terapéutica
- Biotransformación de sobredosis del paracetamol, o en estados de intoxicación <sup>(62,63)</sup>.

#### **2.5.4.2. Biotransformación de dosis terapéutica.**

El metabolismo de los xenobióticos como el paracetamol que presenta grupos fenólicos se realizan principalmente por mecanismos de conjugación con ácido glucurónico y sulfato.

Las reacciones de conjugación con glucurónico son catalizadas por la familia de enzimas de la difosfato glucoronosiltransferasa (UDP), enzima que se encuentra unida a la membrana del retículo endoplasmático. Esta familia de enzimas forman aglicones conjugados UDP- ácido glucurónico con los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos **(ver figura Nº 02)**.



Las reacciones de sulfatación, por otra parte son catalizadas por la familia de enzimas diméricas de las aril-sulfotransferasa, que utilizan al 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfano (PAPS) como donador del grupo sulfato, donando un éster sulfato fenólico, adenosin-5-monofosfato y fosfato inorgánico<sup>(44)</sup>.

La tercera ruta más importante en el metabolismo del paracetamol es la oxidación a través del sistema microsomal de las oxidasas en función mixta del citocromo P450 (CYP450), específicamente por las isoformas 2E1,1A2 y 3A4<sup>(45,46)</sup> que biotrasformaron el APAP a los derivados oxidados 3-hidroxi-APAP,3-metoxi-APAP y N-acetil-P-amino benzoquinonaimina (NAPQI)<sup>(63,64)</sup>.

La eliminación de los productos del metabolismo de conjugación de dosis terapéutica del APAP se realiza a través de los riñones, como conjugados de glucorónido o sulfato y muy pequeña cantidades como conjugados de glutatión y NAPQI; ninguno de estos metabolitos resulta tóxico para el organismo<sup>(65)</sup>. Por lo anterior, solo del 10 al 20% del APAP se metaboliza por procesos oxidativos excretando los productos de esta biotransformación (derivados 3-hidroxi o 3-metoxi) como conjugados de GSH por la orina<sup>(62)</sup>.

#### **2.5.4.3. Biotransformación a dosis tóxicas.**

Mientras que el paracetamol normalmente es biotransformado por procesos de glucuronidación, sulfatación y oxidación a dosis terapéutica, cuando la dosis es excesiva, estas rutas se saturan y el APAP excedente se metaboliza por el sistema microsomal CYP450.

En condiciones fisiológicas, la detoxificación del metabolito NAPQI, formado por la oxidación del APAP, se realiza eficazmente por el glutatión reducido (GSH), a través de la formación de conjugados 3-(GSH-S-L)-APAP<sup>(66,67)</sup> que son excretados por el riñón como conjugados de cisteína y ácido mercaptúrico <sup>(34,46)</sup>, sin embargo como consecuencia del uso crónico, de la sobredosis, o de enfermedades hepáticas, las reservas de GSH disponible para conjugación con NAPQI se agotan, ocasionando acumulación del NAPQI y con ellos, una necrosis hepática fulminante<sup>(68)</sup>. De esta forma el metabolismo del APAP relacionado con el CYP450 parece jugar un papel crítico en el daño hepático inducido por el APAP, reconociendo al NAPQI como el metabolito tóxico causante del daño.

#### **2.5.4.4. Mecanismo de hepatotoxicidad por el paracetamol.**

Las bases de la toxicidad por paracetamol están bien estudiadas. Al ingerir dosis grandes de la droga el citocromo P450 (CYP2E1, CYP1A2 y CYP3A) genera cantidades de NAPQI capaces de agotar las reservas hepáticas de glutatión. Este metabolito ejerce su toxicidad al unirse de forma covalente a macromoléculas y produciendo radicales libres, desarrollando necrosis hepática en tan sólo 12 horas<sup>(69)</sup>. En mucha menor medida, el mismo proceso puede ocurrir en el riñón y contribuirá a la nefrotoxicidad. La toxicidad es mayor cuando se asocian inductores del citocromo P450 (etanol -CYP2E y CYP3A -; fenobarbital -CYP2B y CYP3A-, carbamacepina, fenitoína, rifampicina, zidovudina) o aquellos que compiten en la conjugación (dicumarol, morfina,

prednisona, salicilatos, estrógenos) incrementando la formación del metabolito tóxico. El consumo crónico de etanol, que también provoca lesión centro lobulillar, altera el metabolismo del paracetamol por dos mecanismos. Por un lado, agota las reservas de glutatión *per se*, disminuyendo la capacidad de detoxificación del NAPQI <sup>(70,71)</sup>. Además, como inductor del citocromo P450 (CYP2E1 Y CYP1A2) incrementa la transcripción de este grupo enzimático, aumentando la proporción de la droga que es convertida en otro factor que predispone a la toxicidad por acetaminofén es el ayuno prolongado, situación frecuente en los alcohólicos crónicos, cuya fisiopatología se postula como multifactorial <sup>(72)</sup>. Además el paracetamol también es per oxidado por la mielo peroxidasa y la COX-1, produciendo también metabolitos hepatotóxicos y provocando daño hepático en pacientes con insuficiencia renal crónica y asma, en particular por la supuesta seguridad del paracetamol en estas enfermedades <sup>(73)</sup>.

La expresión fenotípica del-factor de necrosis tumoral está implicada como un factor de severidad en la toxicidad por paracetamol.

El receptor constitutivo de androstanol (RCA) mostró ser otro modulador de esta toxicidad en un estudio con ratones y potencialmente en humanos. La pérdida de este receptor resulta en resistencia a la toxicidad por paracetamol con ausencia de la inducción de las enzimas que lo metabolizan. El uso concomitante de androstanol, que bloquea al receptor, también disminuye la toxicidad en ratones, no así en humanos. La identificación de un agonista

inverso del RCA humano se propone como un nuevo objetivo para las estrategias de hepatoprotección no relacionadas con la inmunidad.

Este enfoque es parte del desarrollo de la fármaco-genética<sup>(74)</sup>. (Ver figura N° 03).

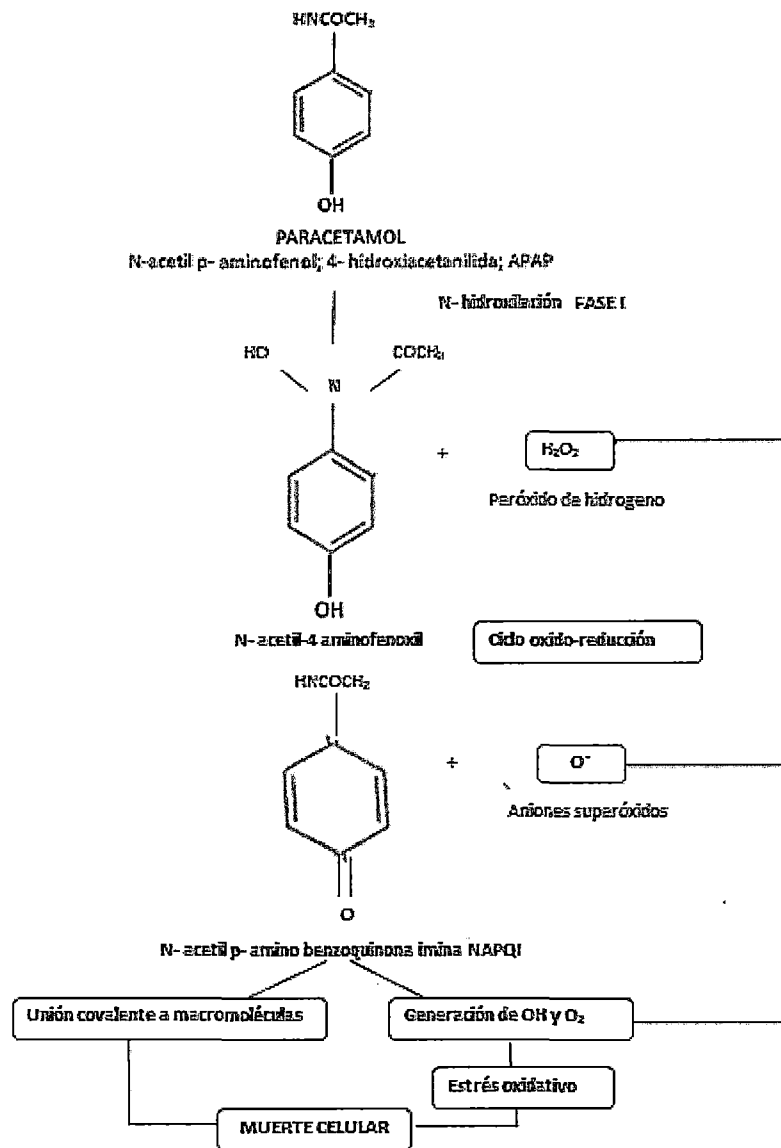


FIGURA N° 03. Mecanismo de hepatotoxicidad del paracetamol.

#### 2.5.4.5. Manifestaciones clínicas.

Si bien las manifestaciones tempranas de toxicidad por paracetamol son leves e inespecíficas (y no predicen la gravedad de la hepatotoxicidad), son importantes de reconocer tempranamente.

**Etapa I (primeras 24 h):** Puede haber náuseas, vómitos, letargia, aunque puede ser completamente asintomático.

**Etapa II (24 a 72 h):** Comienzan las evidencias de hepatotoxicidad en los exámenes de laboratorio, al mismo tiempo que los síntomas iniciales pueden cambiar por dolor en hipocondrio derecho, con hepatomegalia. Puede aparecer concomitantemente oliguria y pancreatitis.

**Etapa III (72 a 96 h):** Se llega al máximo de elevación de transaminasas, llegando en ocasiones a exceder de 10.000 IU/mL. Clínicamente puede haber ictericia, encefalopatía y coagulopatía. El 25 a 50% de los afectados presenta concomitantemente insuficiencia renal por necrosis tubular aguda.

**Etapa IV (4 días a 2 semanas):** Los pacientes que sobreviven la etapa anterior entran a una etapa de recuperación cuya duración depende de la gravedad del compromiso inicial. Los cambios histológicos afectan preferentemente a la zona III (centro lobulillar), que es la de mayor concentración de CYP2E1. No hay casos reportados de daño hepático crónico por paracetamol<sup>(75,76)</sup>.

## 2.6. TOXICIDAD AGUDA.

En la actualidad, la toxicología alcanza enorme trascendencia social debido al importante número de sustancias químicas comercializadas y su posible impacto sobre la salud pública y ambiental. Ello ha conducido al desarrollo de estrategias de evaluación de riesgos con fines normativos.

La toxicidad aguda tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia. Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal y la toxicidad aguda se expresa por la dosis letal 50, que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50% de los animales. Un solo compuesto puede generar efectos tóxicos agudos y crónicos estos dependen de la dosis y duración a la exposición. La observación de los animales se lleva a cabo después de la administración de la sustancia y dura hasta 14 días, después de los cuales los animales son sacrificados y autopsiados.

En España en 1997 el Comité para los productos medicinales (CPMP) definió la regla de las **3R** como objeto para reducir el número de animales sacrificados anualmente en los estudios de toxicidad.

**REDUCCIÓN:** Evitar duplicaciones de estudios; evitar estudios que han mostrado ser irrelevantes para el hombre por extrapolación; desarrollando estudios complementarios in vitro y ex vivo; aumentando la calidad de las pruebas; obteniendo más información con un menor número de animales <sup>(77)</sup>.

**REFINADO:** Utilizando nuevas tecnologías y definiendo nuevos "end-points" más humanos (por ejemplo, que la muerte no sea un "end-point" en los estudios de toxicidad aguda) <sup>(78)</sup>.

**REEMPLAZO:** Desarrollando métodos alternativos, como cultivos de células humanas. De hecho, en algunos países de la Unión Europea, para los productos cosméticos está prohibido el uso de animales de experimentación <sup>(78)</sup>.

## **2.7. PLANTAS MEDICINALES CON EFECTO HEPATOPROTECTOR.**

Un gran número de plantas medicinales han sido probadas encontrándose principios activos como: fenoles, cumarinas, lígnanos, aceite esenciales, carotenos, glucósidos, lípidos, alcaloides y flavonoides. Las cuales presentan propiedades curativas contra una variedad de enfermedades.

A nivel regional de Ica cabe mencionar a Simón en el 2013 <sup>(79)</sup> quien reporta que el extracto etanólico del fruto de *Corryacactus brevistylus* posee capacidad antioxidante, y a nacional tenemos plantas con actividad antioxidante y hepatoprotectora, en el 2005 Santos <sup>(80)</sup>, reporta que la especie *Gamochacta americana* posee efecto hepatoprotector en animales de experimentación; en el 2007 Troncoso <sup>(81)</sup> determinó la actividad antioxidante y efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Petrosilium sativum* en ratas con intoxicación inducida por paracetamol. En el 2008 reporta que el extracto acuoso de *Poemus boldus* posee efecto hepatoprotector en ratas con daño hepático inducido por paracetamol.

Sandoval en el 2008 <sup>(82)</sup>, reporta otras especies peruanas estudiadas, señala que el extracto de *Vitis vinifera* evidencia efecto hepatoprotector frente al daño hepático causado por etanol al 5%. En el 2012 Arnao <sup>(83)</sup>, menciona que el extracto acuoso de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* poseen efecto hepatoprotector contra el daño hepático generado por paracetamol.

En otros países se han estudiado una gran variedad de plantas medicinales con actividad antioxidante y efecto hepatoprotector algunos de los cuales son: *Abutilon indicum* <sup>(84)</sup> que muestran actividad antioxidante y efecto hepatoprotector frente a intoxicaciones inducidas por paracetamol en ratas de experimentación. También tenemos los extractos hidroalcoholicos de *Aerva lanata* <sup>(85)</sup> y de *Anogeissus latifolia* que poseen efecto hepatoprotector en ratas contra hepatotoxicidad inducida por paracetamol; las hojas de *Alchornea cardifolia* <sup>(86)</sup> poseen actividad antioxidante y efecto hepatoprotector, principalmente las fracciones de acetato de etilo y acetona del extracto metanólico.

Otra planta como *Azadirachia indica* <sup>(87)</sup> evidencia efecto hepatoprotector contra el daño hepático inducido por paracetamol en ratas por la presencia de compuestos quercetina y rutina. El extracto metanólico de las hojas de *Bauhinia purpurea* <sup>(88)</sup> ejercieron potencial efecto hepatoprotector que puede atribuirse en parte a su actividad antioxidante y alto contenido fenólico.

Otras de las plantas con efecto hepatoprotector contra lesiones hepatocelular inducida por paracetamol debido a su propiedad antioxidante es el extracto de *Melia azedarach*<sup>(89)</sup>. El extracto etanólico de las semillas de *Cleome viscove*<sup>(90)</sup> evidenció actividad hepatoprotectora contra la lesión hepática inducida por paracetamol en ratas albinas. El extracto de *Elaeis guineensis*<sup>(91)</sup> posee buena actividad antioxidante in vitro y efecto hepatoprotector in vivo en un modelo de intoxicación hepática con paracetamol, en ratones.

Entre otras de las plantas tenemos, el extracto metanólico de las raíces de *Hemidesmus indicus*<sup>(92)</sup> evidencia un potencial actividad hepatoprotectora en el daño hepático producido por paracetamol y tetracloruro de carbono en ratas; el extracto acuoso de *Physalis peruviana*<sup>(93)</sup> posee actividad antioxidante y efecto hepatoprotector potente contra el daño hepático producido por paracetamol en ratas. El extracto etanólico de las semillas de *Sesamum indicum*<sup>(94)</sup> poseen efecto hepatoprotector contra daños en el hígado inducido por paracetamol en ratas.

### **2.7.1. *Encelia canescens* Lamarck “Hierba lingo”**

#### **2.7.2. Descripción Botánica.**

*Encelia canescens* Lamarck., familia Asterácea “hierba lindo”, es una especie autóctona, arbustiva, siempre verde, de hasta 60 cm de altura, el tallo es de color verde plomizo por la presencia de pilosidad blanca y muy ramificado. Las hojas son pecioladas y alternas. Las inflorescencias son capítulos terminales con

involucro con dos filas de brácteas lanceoladas. Las flores marginales y liguladas son femeninas y de color amarillo; las flores centrales y tubulosas, de color café, pentadentadas, con receptáculo calicino gamosépalo (sin dientes) que rodea al ovario, y un penacho de pelos blancos; estambres con anteras unidas; ovario ínfero con estilo dividido en 2 ramas pilosas. El fruto es un aquenio <sup>(95)</sup>.

### **2.7.3. Distribución Geográfica.**

Se desarrolla en suelos arenosos y secos, en laderas de cerros y bordes de la carretera común a lo largo de la costa peruana, de la I hasta IV Región de Chile e interior norte de Argentina <sup>(96)</sup>. Distribución en el Perú por los departamentos de Piura, Cajamarca, Lambayeque, La Libertad, Ancash, Lima, Ica, Arequipa y Tacna.

### **2.7.4. Uso en la medicina popular.**

A la especie peruana le atribuyen propiedades como galactófora, analgésica y contra la retención de orina <sup>(97)</sup>. Otras especies del género se utilizan como analgésico para el dolor de muelas <sup>(98)</sup>. Otros lo usan como planta ornamental y apícola <sup>(99)</sup>, también forman los llamados corredores biológicos, que tienen por finalidad actuar como refugio para animales, atraer insectos benéficos y presentar un medio de protección al cultivo <sup>(100)</sup>.

### **III. MATERIALES**

**Y**

### **MÉTODOS**

### **3.1. MATERIALES.**

#### **3.1.1. Material biológico.**

- Tallos secos de *Encelia canescens* Lamarck "hierba lingo".
- Ratas albinas cepa Holtzman hembras de 120 - 210 g.
- Ratones albinos cepa Bal C hembras de 25 - 30 g.

#### **3.1.2. Materiales de vidrio.**

Los necesarios para la realización del trabajo de laboratorio.

#### **3.1.3. Reactivos y disolventes.**

Set enzimático de aminotransferasas EliTech Clinical Systems,

#### **3.1.4. Medicamentos.**

- Paracetamol (APAP).
- Silimarina (SIL).

#### **3.1.5. Equipos.**

- Equipo de reflujo.
- Balanza analítica.
- Rotavapor marca HEIDOLPH modelo LABOROTA 4000, con baño de agua termostatizable B-480 y bombas de vacío B-270.
- Analizador semi automático Microlab.
- Centrifuga universal.

## **3.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA.**

### **3.2.1. Estudio fitoquímico.**

### **3.2.2. Recolección, selección, secado y conservación de la muestra.**

Los tallos de *Encelia canescens Lamarck* "Hierba lingo" fueron recolectados de forma manual con ayuda de pobladores del lugar, en el mes de junio del 2014 en el poblado de Huarangal distrito de Yauca del Rosario, provincia de Ica, departamento de Ica, a una altitud de 750 a 1050 msnm. Una parte fue enviada al Museo de Historia Natural de la Universidad Mayor de San Marcos, para su clasificación botánica.

Luego se seleccionó los tallos enteros en buen estado, separando manualmente los deteriorados, manchados y con señales de ataques por hongos; luego fueron sometidos a sequedad sin exposición a los rayos solares en una superficie limpia por un periodo de 14 días. Se obtuvo aproximadamente 1500 g de muestra vegetal.

### **3.2.3. Clasificación taxonómica de la especie vegetal.**

La autenticidad de la especie fue confirmada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima- Perú (**anexo 01**).

### **3.2.4. Obtención del extracto etanólico.**

Se realizó por el método de reflujo, en un matraz de 2000 mL en el cual se colocaron los tallos secos de la planta en mención y etanol de 96 °C. El proceso de extracción se realizó por espacio de 4 horas.

Posteriormente el extracto fue sometido a sequedad en un evaporador rotatorio a presión reducida a una temperatura de 40 °C, obteniéndose 250 g de extracto seco de color verde oscuro. 150 g del extracto etanólico fue utilizado para realizar la toxicidad aguda y el efecto hepatoprotector, y 100 g del extracto etanólico utilizado para realizar el Screening fitoquímico.

- **Porcentaje de rendimiento del extracto etanólico seco de la obtención del extracto etanólico.**

El porcentaje de rendimiento del extracto etanólico seco (%EES) fue de 6%.

Este resultado fue obtenido con la siguiente expresión:

$$\%EES = \frac{\text{Peso final del extracto seco}}{\text{Peso inicial de la muestra seca}} \times 100$$

$$\%EES = \frac{250}{1500} \times 100$$

$$\%EES = 16.6$$

### **3.2.5. Screening Fitoquímico.**

#### **3.2.5.1. Obtención de Fracciones.**

Se utilizó 100 g del extracto etanólico la cual viene a ser la Fracción A; del cual se separó 2 mL para realizar la correspondiente reacción de identificación.

Luego se extrajo con HCl al 1% (2X20 mL) empleando una pera de bromo, se filtró y se obtuvo dos partes: la insoluble y la solución ácida (la soluble).

**Insoluble:** Se lava hasta pH neutro con agua destilada, seguidamente fue disuelta con 5 mL de diclorometano, se seca con sulfato de sodio anhidro y se filtra para obtener la Fracción B.

**Solución acida:** Se filtra y alcaliniza con Hidróxido de amonio y se extrae con diclorometano (2X25 mL) obteniéndose dos fases:

**Fase Diclorometánica:** Se lava con 10 mL de agua destilada, luego la fase diclorometánica se seca con sulfato de sodio, se filtra y se obtiene la Fracción C.

**Fase Acuosa:** Se satura con 5 g de sulfato de sodio anhidro y se extrae con diclorometano: etanol (3:2) (2X25mL) en una pera de bromo. Obteniéndose dos fases:

**Fase Orgánica:** (Diclorometánica-etanólica). Se lava con la solución de sulfato de sodio anhidro reuniendo las fases acuosas.

Seguidamente la fase orgánica se deshidrata con 1 g de sulfato de sodio anhidro.

Se filtra y esto constituye la Fracción D.

**Fase Acuosa:** A esta se adiciona los residuos acuosos obtenidos del lavado de la fase orgánica, esto constituye la Fracción E.

### **3.2.5.2. Detección de grupos funcionales y metabolitos secundarios.**

Separadas las fracciones se procedió a realizar sobre estas reacciones de coloración o precipitación para identificar grupos funcionales y metabolitos secundarios.

- **FRACCIÓN A.**

**Detección de Taninos.**

**Reacción de Gelatina – Sal:** Se vierte 0,5 mL de extracto sobre 5 mL de solución de NaCl 5%, Gelatina 1% y Gelatina – Sal la precipitación con este último reactivo o con ambos el 1º y 2º es indicativo de la presencia de taninos, si solamente ocurre con el 1º, podría ser un falso positivo.

**Reacción de Cloruro Férrico:** En un tubo de ensayo se colocó 0,5 mL de la Fracción A y se le agregó una gota de solución acuosa de FeCl<sub>3</sub> 1%.

La reacción es positiva cuando aparecen colores de azul-negro, verde o azul verdoso.

**Detección de Aminoácidos.**

**Reacción de Ninhidrina:** Sobre tiras de papel filtro se coloca con una pipeta capilar:

- a. Una gota de Fracción A + una gota del reactivo Ninhidrina al 2%.
- b. Blanco: Solución etanólica de Ninhidrina al 2%.
- c. Testigo: Una gota de solución de Metionina 5%.

Luego del secado a temperatura ambiente las tiras de papel se colocan en la estufa a 110 – 120 °C hasta la aparición de un color en el blanco. Se compara con la mancha azul violácea de la solución testigo.

La reacción es positiva si el papel de la muestra presenta un color azul violáceo.

### **Detección de Flavonoides.**

**Reacción de Shinoda:** En una placa se vertieron 3 gotas de la Fracción A, limaduras de Mg, y 2 gotas de HCl concentrado.

La reacción es positiva cuando aparecen tonos de color rojo, anaranjado y violeta.

- **FRACCIÓN B.**

### **Detección de Triterpenoides y/o Esteroides.**

**Reacción de Liebermann Burchard:** Sobre 1 mL de la fracción se vertieron 5 gotas de ácido acético y 3 mL de anhídrido acético/ácido sulfúrico (50:1).

La reacción es positiva si aparecen colores verde, azul verdoso (vías rojo o azul).

### **Detección de Antraquinonas.**

**Reacción de Borntrager:** Sobre el resto de la Fracción B se agrega 5 mL de NaOH 5% y se agita suavemente.

La reacción es positiva si la fase acuosa toma un color rojo.

- **FRACCIÓN C.**

### **Detección de Esteroides y/o Triterpenoides.**

#### **Reacción de Liebermann Burchard.**

### **Detección de Cardenólidos.**

**Reacción de kedde:** Solución A: ácido 3,5-dinitrobenzoico 2% en metanol. B: Hidróxido de potasio 5,7% en agua. Mezclar a + b, volúmenes iguales esto constituye el reactivo (R).

Colocar en un tubo de ensayo 1 mg de muestra + 2 gotas del reactivo.

Si la reacción es positiva se formará un color púrpura o violáceo.

#### **Detección de Alcaloides.**

El resto de la Fracción C se evapora a sequedad y luego se agrega 2 mL de HCl 1%, filtrar. Se realizan las reacciones de precipitación, de Dragendorff, Mayer, Hager y Wagner.

La reacción es positiva si aparece un precipitado.

#### • **FRACCIÓN D.**

Se evaporó a sequedad y luego se agregó 2,5 mL de etanol, efectuándose las siguientes reacciones.

**Detección de Flavonoides:** Reacción de Shinoda.

**Detección de Leucoantocianidinas y Catequinas.**

**Reacción de Rosenheim:** A 2 mL de la Fracción D se agregó 0,1 mL de HCl concentrado, se calienta durante 10 minutos a 100 °C, se enfría y se adiciona 2 mL de agua y 0,4 mL de alcohol amílico; agitar y observar el color en la fase amílica.

La reacción es positiva si aparece un color que va desde el rosado débil hasta carmesí oscuro.

Si es rojo indica presencia de Antocianidinas. Si es marrón indica la presencia de Catequinas.

**Detección de Cardenólidos:** Reacción de Kedde.

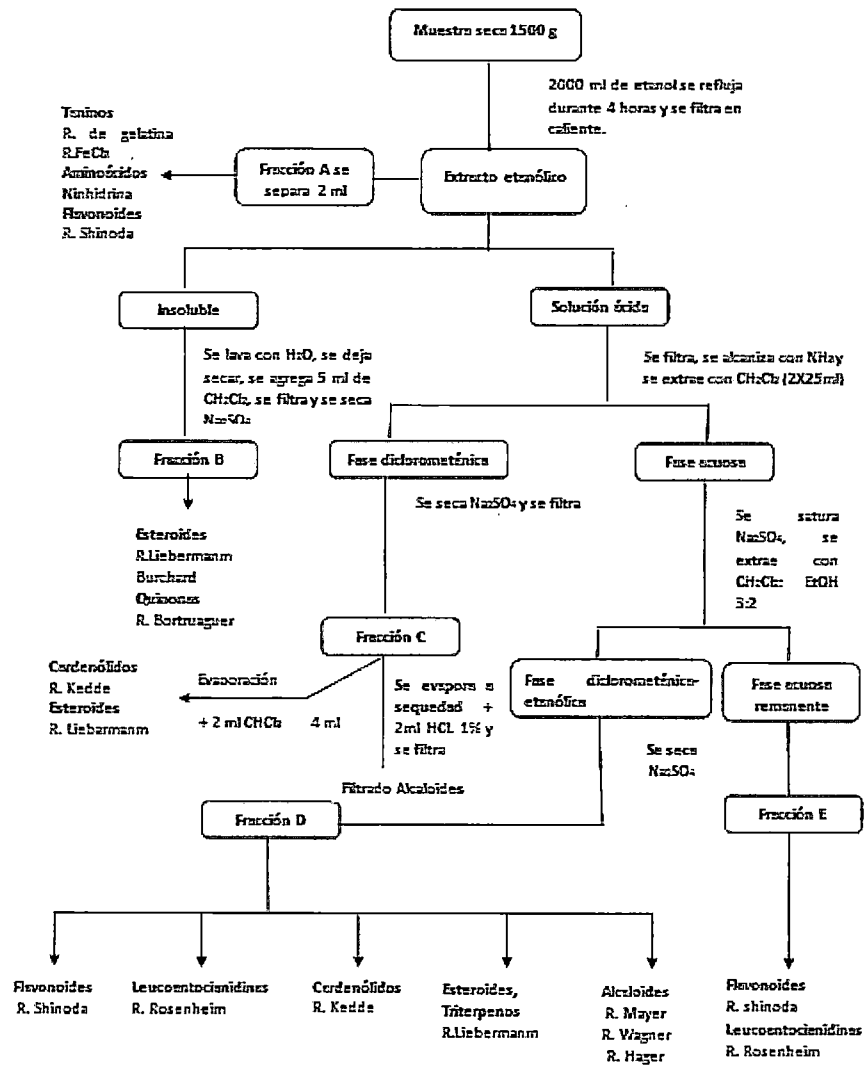
**Detección de Esteroides y/o Triterpenoides:** Reacción de Liebermann Burchard.

**Detección de Alcaloides:** Reacción de Mayer, Dragendorff, Hager y Wagner.

• **FRACCIÓN E.**

**Detección de Flavonoides:** Reacción de Shinoda.

**Detección de leucoantocianidinas:** Reacción de Rosenheim.



**FIGURA Nº 04. Screening Fitoquímico** <sup>(101)</sup>.

### 3.3. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA.

Para la evaluación de la toxicidad aguda se tuvo en cuenta el principio de las 3Rs<sup>(102,103)</sup> Se emplearon ratones albinos hembras, sanas con un peso de 20 – 30 g, provista por el bioterio de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Se utilizaron 2 ratones de control y 5 ratones tratados. Los animales se mantuvieron durante el ensayo (14 días) con alimentación peletizada y agua *ad libitum*, en condiciones ambientales estandarizadas.

#### 3.3.1. Método Experimental.

Para el ensayo se empleó la dosis límite, metodología y diseño experimental descrito por las normas EPA (Agencia de Protección Ambiental) 870.1100, OECD 425 (Organización Económica para el Comercio y Desarrollo)<sup>(104,105)</sup>. El extracto etanólico de *Encelia canescens Lamarck* “hierba lingo” fue administrada a una dosis de 2000 mg/Kg de peso por única vez por vía oral. El alimento fue retirado 12 horas antes de comenzar el experimento y vuelto a suministrar 3 horas después de la administración. Durante el período de ensayo los animales fueron observados individualmente durante los primeros 30 minutos, 2 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas, 7 días hasta los 14 días del experimento; para de esta forma llevar a cabo el control de la mortalidad, comportamiento, consumo de alimento y síntomas clínicos de toxicidad evidente.<sup>(106)</sup> La evaluación incluyó la relación que puede existir entre los ratones tratados y grupo control que recibió el vehículo (tween 10%). Dentro de las observaciones de signos y síntomas de toxicidad se determinó: Ataxia, parálisis de patas anteriores y

posteriores, alarma, piloerección, equilibrio, palidez, erección de la cola, actividad motora, reflejo corneal. Se controló el peso vivo de los animales en los días 1, 7 y 14 días del experimento como uno de los parámetros demostrativos de toxicidad. Al finalizar el experimento se procedió al sacrificio de los animales por inhalación de éter etílico para el estudio anatomopatológico macroscópico del cerebro, estómago hígado, bazo, pulmones, riñones, e intestinos.

### **3.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR.**

Para el estudio se usó ratas hembras, raza Holtzman, con un peso promedio de 120 a 210 g, procedentes del bioterio de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Los animales se aclimataron una semana y se les pesó cada dos días. Se les alimentó con dieta obtenida de UNALM y agua *ad libitum*, en condiciones ambientales estandarizadas.

#### **3.4.1. Método experimental.**

Se procedió a formar aleatoriamente los cinco grupos de estudio (n=5). Antes del tratamiento con el extracto etanólico, se les retiró el alimento y recibieron por vía orogástrica durante cinco días lo señalado:

Grupo I (control normal) y grupo II (control APAP) se les administró Tween 10%. A los grupos III, IV se les administró por vía orogástrica el extracto etanólico de los tallos de *Encelia canescens Lamarck* a dosis de 200 y 400 mg/Kg respectivamente, mientras que a los animales del grupo V se les administró SIL a dosis de 300 mg/Kg. Pasado 1 hora a todos los grupos II, III, IV y V, se les

administró APAP a dosis de 250 mg/Kg. Después de 1 hora se procedió a la realimentación.

Al sexto día, después de la administración de los respectivos tratamientos a todos los animales se les extrajo sangre por punción cardiaca para los ensayos bioquímicos.

### 3.4.2. Ensayos Bioquímicos.

Se recolectaron muestras de sangre, se centrifugaron a 3000 r.p.m durante 10 minutos para obtener el suero, el cual se sometió a continuación a la determinación de los niveles de las enzimas transaminasas: alanina aminotransferasa (ALT o TGP), aspartato aminotransferasa (AST o TGO), fosfatasas alcalina (FAL), proteínas totales y albúmina.

#### 3.4.2.1. Determinación de la alanina aminotransferasa (ALT o TGP).

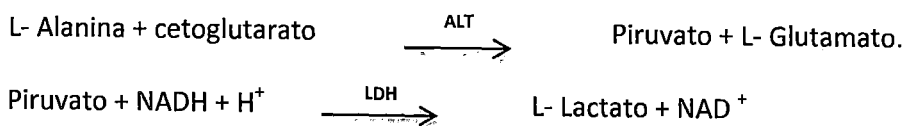
##### Método.

Método IFCC (Federación Internacional de Química Clínica) sin fosfato de piridoxal.

Cinético UV.

##### Fundamento del método.

Determinación cinética de la actividad de la alanina aminotransferasa (ALT)



LDH: Lactato deshidrogenasa.

**Composición de los reactivos.**

**Reactivo 1: R1**

Tampón Tris, pH 7.50 (30 °C), L-Alanina, LDH.

**Reactivo 2: R2**

Cetoglutarato, NaOH.

**Muestra.**

Suero

**Material requerido.**

Analizador semi automático, Micropipetas, cronómetro.

**Condición de la reacción.**

Longitud de onda 340 nm, temperatura 37°C.

**Procedimiento.**

Programar en el analizador la enzima que se va analizar, la longitud de onda y temperatura. En primer lugar leer con agua destilada, en un tubo mezclar 200 uL del reactivo 1 y 50 uL del reactivo 2, esperar 25 segundos y agregar 25 uL de la muestra; mezclar y después de 50 segundos de incubación medir el cambio de absorbancia por minuto (A/min) durante 150 segundos.

**Cálculos de los resultados.**

$ALT (U/L) = A/min \times 1746$

### 3.4.2.2. Determinación de aspartato aminotransferasa (AST o TGO).

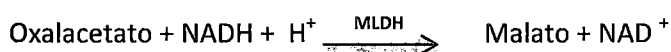
#### Método.

Método IFCC (Federación Internacional de Química Clínica) sin fosfato de piridoxal.

Cinético UV.

#### Fundamento del método.

Determinación cinética de la actividad de aspartato aminotransferasa (AST).



MLDH: Malato deshidrogenasa.

#### Composición de los Reactivos.

##### **Reactivo 1: R1**

Tampón Tris, pH 7.80 (30 °C), L-Aspartato, MLDH.

##### **Reactivo 2: R2**

Cetoglutarato, NaOH.

#### Muestra.

Suero

#### Material Requerido.

Analizador semi automático, Micropipetas, cronómetro.

#### Condición de la Reacción.

Longitud de onda 340 nm, temperatura 37°C.

### **Procedimiento.**

Programar en el analizador la enzima que se va analizar, la longitud de onda y temperatura. En primer lugar leer con agua destilada, en un tubo mezclar 200 uL del reactivo 1 y 50 uL del reactivo 2, esperar 25 segundos y agregar 25 uL de la muestra; mezclar y después de 50 segundos de incubación medir el cambio de absorbancia por minuto (A/min) durante 150 segundos.

### **Cálculos de los resultados.**

$$\text{AST (U/L)} = \text{A/min} \times 1746$$

#### **3.4.2.3. Determinación de fosfatasa alcalina (FA).**

##### **Método.**

Basados en las recomendaciones de la DGKC (Sociedad Alemana de Química Clínica) y de la SCE (Comisión de Enzimas de la Sociedad Escandinava de Química Clínica y Fisiología Clínica), enzimático cinético.

##### **Fundamento del método.**

En presencia de iones de  $\text{Mg}^{2+}$  y diatanolamida como aceptor de fosfatos, el p-Nitrofenilfosfato es hidrolizado por las fosfatasas en fosfato y p-Nitrofenol (sustancia de color amarillo).



##### **Composición de los reactivos.**

###### **Reactivo 1:R1**

Dietanolamida, pH 10.2, Cloruro de magnesio.

**Reactivo 2:R2**

p-Nitrofenilfosfato

**Muestra.**

Suero

**Procedimiento.**

En el analizador programar la longitud de onda 405 nm, temperatura 37 °C. En primer lugar leer con agua destilada, en un tubo mezclar 250 uL del reactivo 1 y 80 uL del reactivo 2, esperar 25 segundos y agregar 5 uL de la muestra; mezclar y después de 50 segundos de incubación medir el cambio de absorbancia por minuto (A/min) durante 75 segundos.

**Cálculo.**

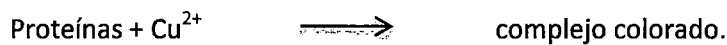
$$\text{FAP U/L} = \text{A/min} \times 2750$$

**3.4.2.4. Determinación de proteínas totales.****Método.**

Biuret.

**Fundamento del método.**

Las proteínas séricas forman un complejo colorado en presencia de sales de cobre en un medio alcalino.

**Composición de los reactivos.**

**Reactivo: R**

Yoduro de potasio, tartrato de potasio y sodio, sulfato de cobre, hidróxido de sodio, estándar y albúmina.

**Muestra.**

Suero.

**Procedimiento.**

En el analizador programar la longitud de onda 546 nm, temperatura de 37 °C.

Se procede como se muestra en la tabla N° 02.

**TABLA N° 02. Preparación de la muestra.**

	Blanco	Calibración	Prueba
Reactivo R	300 uL	300 uL	300 uL
Agua destilada	3 uL	-	-
Estándar	-	3 uL	-
Muestra	-	-	3 uL

Mesclar y leer la absorbancia (A) tras 11 minutos y 30 segundos de incubación.

**Cálculo de resultados.**

$A$  de la muestra.

$$\frac{A \text{ de la muestra.}}{A \text{ de estándar.}} \times n \quad n = \text{Concentración del estándar.}$$

**3.4.2.5. Determinación de albúmina.**

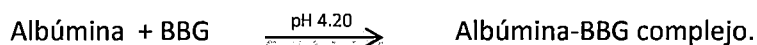
**Método.**

Colorimétrico.

BBG (verde de bromocresol)

### **Fundamento del método.**

Determinación colorimétrica de la albúmina utilizando verde de bromocresol a pH 4,20.



### **Composición de los reactivos.**

#### **Reactivo R**

Tampón de succinato pH 4.20, verde de bromocresol, Bnj 35 estándar, albúmina bovina.

#### **Muestra.**

Suero.

#### **Procedimiento.**

Programar la longitud de onda 800 nm, temperatura de 37 °C.

Proceder como se muestra en la tabla N° 03.

**TABLA N° 03. Preparación de la muestra.**

	Blanco	Calibración	Prueba
Reactivo R	310 uL	310 uL	310 uL
Agua destilada	2 uL	-	-
Estándar	-	2 uL	-
Muestra	-	-	2 uL

Mezclar y leer la absorbancia después de 25 segundos de incubación.

#### **Cálculo de los resultados.**

$\frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{estándar}}} \times n = X$  n = concentración del estándar.

$A_{\text{estándar}}$

#### **3.4.2.6. Análisis histopatológico.**

Para la evaluación histopatológica las muestras de hígados extraídas de las ratas tratadas fueron fijadas en formol al 10%, luego se hicieron los correspondientes cortes histopatológicos.

#### **3.4.3. Análisis estadístico.**

Los resultados obtenidos en este estudio se expresaron en valores promedios y sus desviaciones estándar, efectuándose además pruebas inferenciales entre los grupos experimentales, paramétricas y no paramétricas. Se trabajó con un nivel de significación de 0,05; considerándose significativo un  $p < 0,05$ . El análisis de los resultados se realizó usando los programas Stata for Windows (versión 12,0) y Graph Pad Prism for Windows (versión 6,05).

## **IV. RESULTADOS**

#### **4.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO.**

#### **4.2. Clasificación taxonómica.**

Como resultado de la clasificación Taxonómica según la Clasificación de Cronquist (1988) y determinado por el Mag. Hamilton Beltran.

División: Magnoliophita

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Encelia*

Especie: *Encelia canescens Lamarck*

Nombre vulgar "hierba lingo"

### 4.3. Scring Fitoquímico.

TABLA Nº 04. Resultados del Screening Fitoquímico del extracto etanólico de *Encelia canencens Lamarck*.

FRACCIONES	METABOLITOS	RESULTADOS
A	Taninos	-
	Aminoácidos	+
	Flavonoides	+
B	Esteroides/Triterpenos	+
	Antraquinonas	+
C	Cardenólidos	-
	Esteroides/Triterpenos	+
	Alcaloides	-
	Flavonoides	+
D	Leucoantocianidinas	-
	Cardenólidos	-
	Esteroides/triterpenos	+
	Alcaloides	-
E	Flavonoides	+
	Leucoantocianidinas	-

Fuente: los autores; Signo + indica presencia, Signo – indica ausencia.

#### 4.4. TOXICIDAD AGUDA.

##### 4.4.1. Comportamiento del peso corporal.

La administración del producto a dosis límite 2000 mg/Kg no afectó el incremento de peso de los animales respecto al grupo control, comportándose dentro de los parámetros establecidos del modelo biológico, como se puede apreciar en las **Tablas N° 05 y 06**.

**TABLA N° 05. Relación de la media de pesos corporales y su variación en el grupo control.**

Grupo	Peso corporal en (g)			
	Día 1	Día 7	Día 14	$\Delta P$
control				
1	25	26	27	2
2	27	29	29	2
<b>Promedio</b>	<b>26</b>	<b>27,5</b>	<b>28</b>	<b>2</b>

**TABLA N° 06. Relación de la media de pesos corporales y su variación en los grupos tratados.**

Grupos tratados	Peso corporal en (g)			
	Día 1	Día 7	Día 14	$\Delta P$
1	25	26	27	2
2	24	25	28	4
3	28	28	30	2
4	27	29	30	3
5	26	27	29	3
<b>Promedio</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28,8</b>	<b>2,8</b>

#### 4.4.2. Síntomas clínicos.

Las observaciones clínicas durante el período de ensayo no arrojaron alteraciones en los diferentes sistemas estudiados. Los parámetros evaluados permanecieron normales en los animales tratados como: actividad motora, reflejo corneal, consumo de alimento y agua, y ausencia de ataxia, parálisis de patas anteriores y posteriores, alarma, piloerección, palidez, erección de la cola. La supervivencia fue de un 100 por ciento.

#### 4.4.3. Exámen anatomopatológico macroscópico

El estudio del exámen anatomopatológico macroscópico de los órganos cerebro, estómago hígado, pulmones, riñones, e intestinos, buscando posibles signos de toxicidad, no evidenciaron alteraciones patológicas en los órganos analizados en comparación con el grupo control.

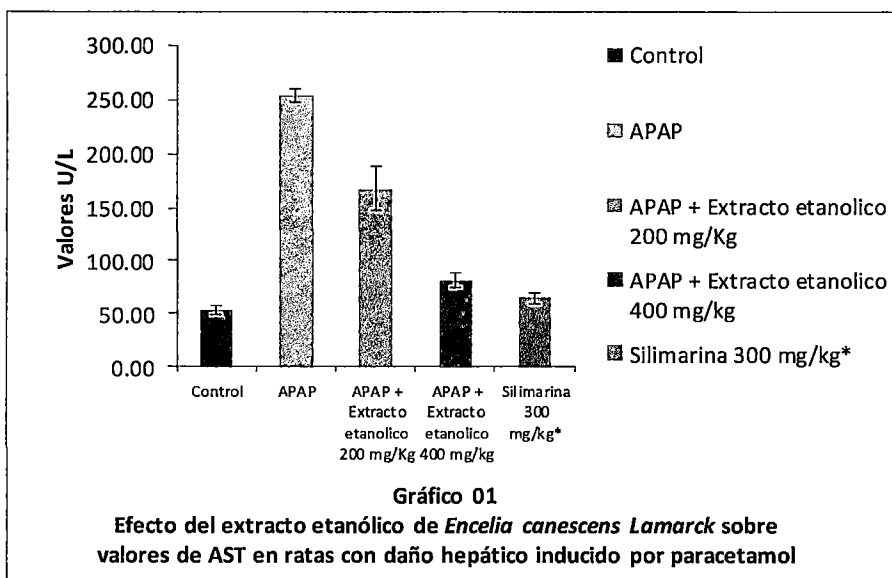
#### 4.5. EFECTO HEPATOPROTECTOR.

TABLA Nº 07. Efecto del extracto etanólico de *Encelia canescens Lamarck* sobre valores de AST en ratas con daño hepático inducido por paracetamol.

Grupo Experimental	Valores de AST U/L Promedio ± D.E.		
Control <sup>(I)</sup>	54	±	4,3
APAP 250 mg/Kg <sup>(I,II)</sup>	254,6	±	6,0
APAP + Extracto etanólico de <i>Encelia canescens Lamarck</i> 200 mg/Kg <sup>(I)</sup>	168,2	±	20,4
APAP + Extracto etanólico de <i>Encelia canescens Lamarck</i> 400 mg/kg <sup>(I)</sup>	81,6	±	6,8
APAP + Silimarina 300 mg/Kg <sup>(I,II)</sup>	65	±	5,4

(I) Hay diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos a un  $p < 0,05$  Test de Kruskal Wallis.

(II) Posee diferencia significativa con respecto al APAP  $p < 0,05$  Test de Dunns.



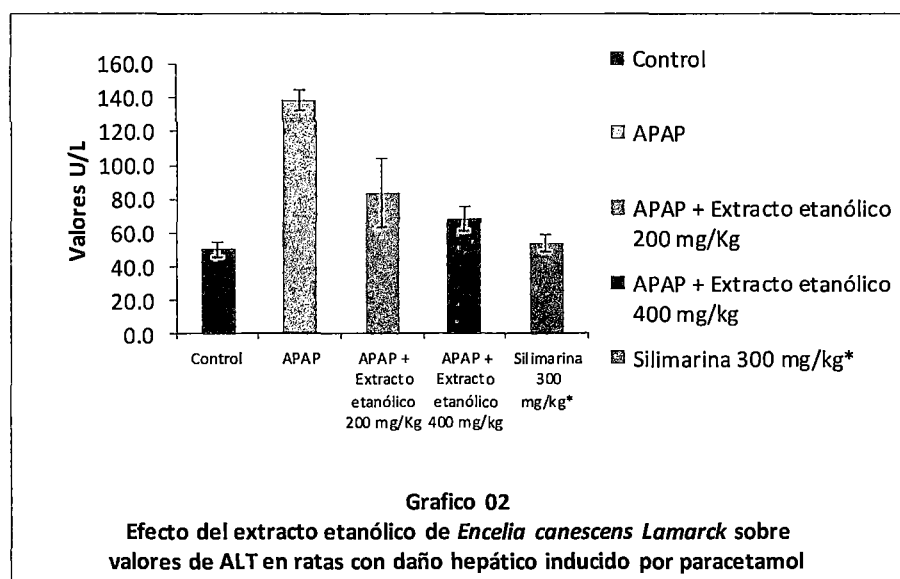
En la Tabla Nº 07. se observa los niveles séricos de AST, en donde se observa una diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos a un  $p < 0,05$  (Test de Kruskal Wallis), se observa que el grupo APAP produjo mayores niveles (254,6 U/L) que el grupo control (54 U/L) y el grupo del extracto etanólico de *ECL* de 400 mg/Kg produjo menores niveles (81,6 U/L). Sin embargo, al comparar el grupo de Silimarina a 300 mg/Kg (65 U/L) con grupo APAP tuvo una diferencia significativa a un  $p < 0,05$  (Test de Dunns).

**TABLA N° 08. Efecto del extracto etanólico de *Encelia canescens* Lamarck sobre valores de ALT en ratas con daño hepático inducido por paracetamol.**

Grupo Experimental	Valores de ALT U/L		
	Promedio ± D.E.		
Control <sup>(I)</sup>	50,0	±	4,8
APAP 250 mg/Kg <sup>(I,II)</sup>	139,0	±	9,2
APAP + Extracto etanólico de <i>Encelia canescens</i> Lamarck 200 mg/Kg <sup>(I)</sup>	83,4	±	6,5
APAP + Extracto etanólico de <i>Encelia canescens</i> Lamarck 400 mg/kg <sup>(I)</sup>	68,2	±	4,7
APAP + Silimarina 300 mg/Kg <sup>(I,II)</sup>	53,8	±	6,8

(I) Hay diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos a un  $p < 0,05$  Test de Kruskal Wallis.

(II) Posee diferencia significativa con respecto al APAP  $p < 0,05$  Test de Dunns.



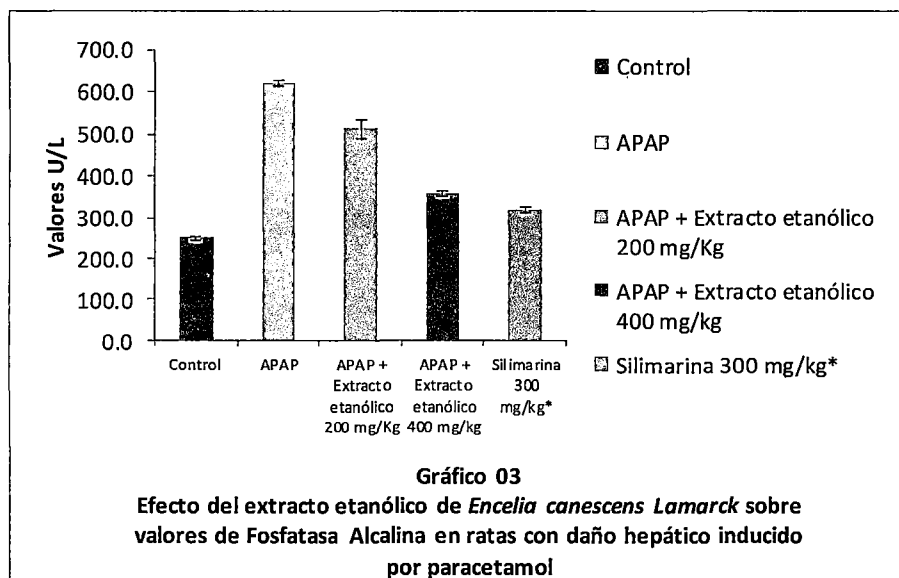
En la **Tabla Nº 08**, se observa los niveles séricos de ALT, en donde se observa una diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos a un  $p < 0,05$  (Test de Kruskal Wallis), se observa que el grupo APAP produjo mayores niveles (139.0 U/L) que el grupo control (50 U/L), y el grupo del extracto etanólico de *ECL* de 400 mg/Kg produjo menores niveles (68,2 U/L). Sin embargo, al comparar el grupo de Silimarina a 300 mg/Kg (53,8 U/L) con grupo APAP tuvo una diferencia significativa a un  $p < 0,05$  (Test de Dunns).

**TABLA Nº 09. Efecto del extracto etanólico de *Encelia canescens* Lamarck sobre valores de Fosfatasa Alcalina en ratas con daño hepático inducido por paracetamol.**

Grupo Experimental	Valores de Fosfatasa Alcalina		
	U/L Promedio $\pm$ D.E.		
Control <sup>(I)</sup>	250,6	$\pm$	9,9
APAP + 250 mg/Kg <sup>(I,II)</sup>	620,0	$\pm$	52,9
APAP + Extracto etanólico de <i>Encelia canescens</i> Lamarck 200 mg/Kg <sup>(I)</sup>	511,8	$\pm$	14,1
APAP + Extracto etanólico de <i>Encelia canescens</i> Lamarck 400 mg/kg <sup>(I)</sup>	358,0	$\pm$	8,6
APAP + Silimarina 300 mg/Kg <sup>(I,II)</sup>	317,6	$\pm$	31,6

(I) Hay diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos a un  $p < 0,05$  Test de Kruskal Wallis.

(II) Posee diferencia significativa con respecto al APAP  $p < 0,05$  test de Dunns.



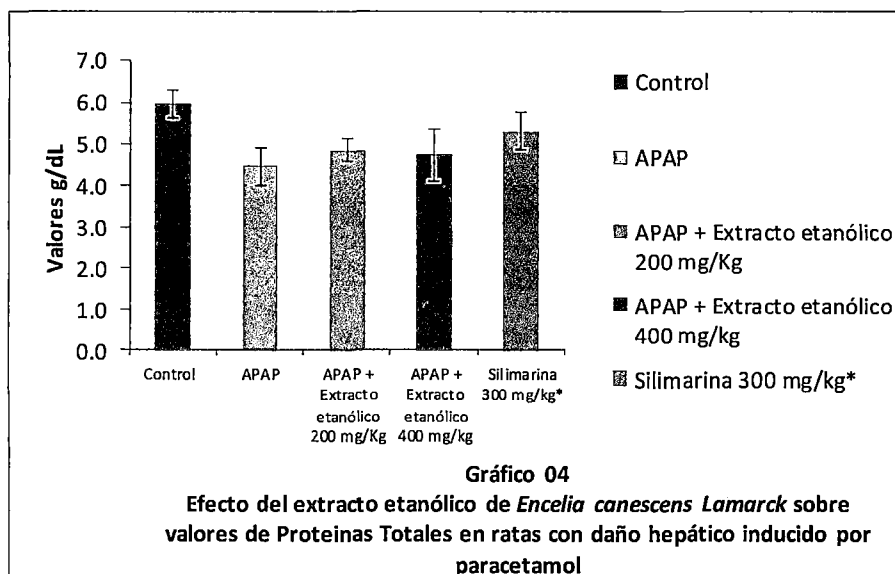
EN LA TABLA Nº 09. se observa los niveles séricos de FA, en donde se observa una diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos a un  $p < 0,05$  (Test de Kruskal Wallis), se observa que el grupo APAP produjo mayores niveles (620,0 U/L) que el grupo control (250,6 U/L), y el grupo del extracto etanólico de ECL de 400 mg/Kg produjo menores niveles (358,0 U/L). Sin embargo, al comparar el grupo de Silimarina a 300 mg/Kg (317,6 U/L) con grupo APAP tuvo una diferencia significativa a un  $p < 0,05$  (Test de Dunns).

**TABLA Nº 10. Efecto del extracto etanólico de *Encelia canescens* Lamarck sobre valores de Proteínas Totales en ratas con daño hepático inducido por paracetamol.**

Grupo Experimental	Valores de Proteínas totales g/dL		
	Promedio ± D.E.		
Control <sup>(I)</sup>	6,0	±	0,3
APAP 250 mg/Kg <sup>(I,II)</sup>	4,5	±	0,5
APAP + Extracto etanólico de <i>Encelia canescens</i> Lamarck 200 mg/Kg <sup>(I)</sup>	4,9	±	0,3
APAP + Extracto etanólico de <i>Encelia canescens</i> Lamarck 400 mg/kg <sup>(I)</sup>	4,7	±	0,6
APAP + Silimarina 300 mg/kg <sup>(I,II)</sup>	5,3	±	0,4

(I) Hay diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos a un  $p < 0,05$  Test de ANOVA.

(II) Posee diferencia significativa con respecto al APAP  $p < 0,05$  test de Tukey



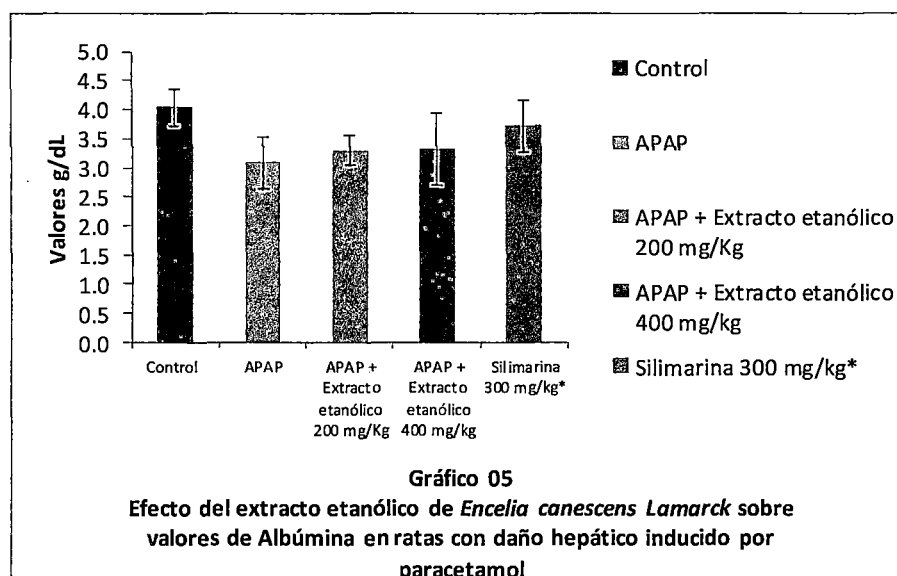
En la Tabla N° 10. se observa los niveles séricos de Proteínas Totales, en donde se observa una diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos a un  $p < 0,05$  (Test de ANOVA), se observa que el grupo APAP produjo menores niveles (4.5 g/dL) que el grupo control (6.0 g/dL), y el grupo del extracto etanólico de *ECL* de 400 mg/Kg produjo mayores niveles (4.7g/dL). Sin embargo, al comparar el grupo de Silimarina a 300 mg/Kg (5.3 g/dL) con grupo APAP tuvo una diferencia significativa a un  $p < 0,05$  (Test de Tukey).

**TABLA Nº 11. Efecto del extracto etanólico de *Encelia canescens Lamarck* sobre valores de Albúmina en ratas con daño hepático inducido por paracetamol.**

Grupo Experimental	Valores de Albúmina g/dL		
	Promedio ± D.E.		
Control <sup>(I)</sup>	4,0	±	0,5
APAP + 250 mg/Kg <sup>(I,II)</sup>	3,1	±	0,6
APAP + Extracto etanólico de <i>Encelia canescens Lamarck</i> 200 mg/Kg <sup>(I)</sup>	3,3	±	0,4
APAP + Extracto etanólico de <i>Encelia canescens Lamarck</i> 400 mg/kg <sup>(I)</sup>	3,3	±	0,2
APAP + Silimarina 300 mg/Kg <sup>(I,II)</sup>	3,7	±	0,4

(I) Hay diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos a un  $p < 0,05$  Test de ANOVA.

(II) Posee diferencia significativa con respecto al APAP  $p < 0,05$  test de Tukey.



En la **Tabla Nº 11**, se observa los niveles séricos de Albúmina, en donde se observa una diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos a un  $p < 0,05$  (Test de ANOVA), se observa que el grupo APAP produjo menores niveles (3.1 g/dL) que el grupo control (4.0 g/dL), y el grupo del extracto etanólico de *ECL* de 400 mg/Kg produjo mayores niveles (3.3 g/dL) que el grupo APAP. Sin embargo, al comparar el grupo de Silimarina a 300 mg/Kg (3.7 g/dL) con grupo APAP tuvo una diferencia significativa a un  $p < 0,05$  (Test de Tukey).

#### **4.6. ANÁLISIS ANATOMOPATOLÓGICO E HISTOPATOLÓGICOS.**

Los resultados de los pesos se muestran en la **Tabla Nº 12**.

En el análisis histopatológico se observaron por cada lámina en el microscopio de luz a 10X y 40X. Los hallazgos microscópicos se analizaron por campos y se compararon con patrones de morfología tisular y celular de hígado normal de rata. (Ver **Tabla Nº 12 y 13**).

**TABLA Nº 12. Examen macroscópico y microscópico de las muestras de hígados de los diferentes grupos.**

<b>MUESTRA</b>	<b>EXAMEN MACROSCOPICO.</b>	<b>EXAMEN MICROSCOPICO HISTOLOGIA.</b>	<b>DIAGNOSTICO.</b>
<b>Control</b>	Hígado que pesa 4 g Mide 3.5x3x1cm se incluye muestra representativa 1c	Arquitectura hepática conservada	Sin lesión celular
<b>APAP 250 mg/Kg</b>	Hígado que pesa 9 g. Mide 3x2.5x1cm, se incluye muestra representativa 1c.	Arquitectura hepática conservada Degeneración vacuolar en el 100% y macroestatis (70%).	Estatosis de grado moderado (70%) Lesión celular reversible en el 100%.
<b>APAP + Extracto 200 mg/Kg.</b>	Hígado que pesa 7 g. Mide 4.5x2.5x1.5cm se incluye muestra representativa 1c.	Arquitectura hepática conservada. Centro lobulillar conservado. Zona portal normal Hepatositos con degeneración vacuolar en un 100%.	Lesión celular reversible de los hepatocitos (100 %).
<b>APAP + Extracto 400 mg/Kg.</b>	Hígado que pesa 6 g. Mide 4.5x2.5x1se incluye muestra representativa 1c.	Arquitectura hepática conservada. Central lobulillar: conservado Zona portal normal degeneración vacuolar en el 20%.	Microestatis 30%.
<b>Silimarina 300 mg/Kg.</b>	Hígado que pesa 5 g. Mide 2.5x2x1cm, se incluye muestra representativa 1c.	Arquitectura hepática conservada. Degeneración vacuolar (30%).	Lesión celular reversible de los hepatocitos (20%).

**TABLA Nº 13. Cambios histopatológicos de muestras de hígado de los diferentes grupos.**

Cambios Histopatológicos	Control	APAP 250 mg/kg	APAP + extracto etanólico ECL 200 mg/kg	APAP + extracto etanólico ECL 400 mg/kg	APAP + Silimarina 300mg/kg
Esteatosis Microvesicular	Ausente	Presente +++	Ausente	Presente +	Presente +
Esteatosis Macrovesicular	Ausente	Presente++	Ausente	Ausente	Ausente
Colestasis	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Apoptosis	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
Degeneración Vacuolar	Ausente	Presente +++	Presente++	Presente+	Presente +
Daño celular	Ausente	Lesión celular hepática reversible 100% esteatosis 70%.	Lesión celular hepática reversible de grado severo (100%)	Colestasis de grado leve esteatosis 30%lesion celular hepática reversible 30%	Lesión celular hepática reversible 10% esteatosis 20%

## **V. DISCUSIÓN**

La *Encelia canescens* Lamarck tiene propiedades galactófora, analgésica y contra la retención de orina <sup>(97)</sup>.

En cuanto a la determinación de los metabolitos secundarios se obtuvieron a partir del extracto etanólico mediante un esquema de screening fitoquímico descrito por Look en 1994 <sup>(101)</sup>; como se puede apreciar en la tabla N° 04, casi todas las fracciones presentan grupos de compuestos con reconocida actividad hepatoprotectora como flavonoides.

Para el estudio de toxicidad aguda se plantea que si no existe informes anteriores de toxicidad de la sustancia que se investiga es posible utilizar una dosis límite de 2000 mg/Kg de masa corporal para determinar la dosis letal <sub>50</sub> lo que se ajusta nuestro estudio dado que la sustancia en estudio no tuvo toxicidad en su extenso de uso tradicional.

En lo referente al daño hepático, el paracetamol se metaboliza de un 90-95% a nivel hepático y su excreción es por el riñón, además es un medicamento que administrado a elevadas dosis o el uso crónico se asocia comúnmente con la hepatotoxicidad y nefrotoxicidad en los seres humanos y los animales <sup>(107)</sup>. La toxicidad hepática producida por el paracetamol ha sido descrita por diversos autores <sup>(9, 51, 54, 53, 56, 64)</sup>. Según Boyd, 1966 y Goldstein, 2002 el daño a nivel hepático puede ser evaluado de diversas formas; una de ellas la constituye la medición de la actividad de enzimas como transaminasas, fosfatasa alcalina, proteínas totales y albúmina, cuya elevación en suero evidencia el daño celular que causa el paracetamol.

En nuestro estudio se evidencia una marcada elevación séricos de AST, ALT, FA; y una disminución de Proteínas totales y Albúmina en las ratas tratadas con APAP a dosis de 250 mg/Kg de peso, indicando la generación de daño hepático que pudo ser corroborado por el estudio histopatológico donde se muestra que los hígados de las ratas que recibieron solamente paracetamol fueron los que presentaron mayores signos de daño celular. Sin embargo, las enzimas séricas están cerca del valor normal en los grupos tratados con el extracto etanólico de *Encelia canescens Lamarck*; el extracto de 400 mg/Kg posee un efecto similar a la Silimarina a dosis de 300 mg/Kg. En comparación con los otros estudios como de Arnao-Salas y col en el 2012 <sup>(83)</sup> determinaron el efecto hepatoprotector del extracto acuoso de Yacón, no observaron efecto sobre el nivel de AST pero si de otras enzimas concluyendo que poseía un efecto hepatoprotector similar al Fármaco Silimarina.

Sin embargo Troncoso y col en el 2007 <sup>(81)</sup>, evaluaron el efecto hepatoprotector del perejil midiendo las enzimas transaminasas y otras cuyos valores disminuyeron en comparación con el fármaco Purinor.

Resumiendo los datos obtenidos hasta aquí, podemos decir que la intoxicación con paracetamol a la dosis de 250 mg/kg en ratas hembras, evidenciada por las actividades aumentadas de AST, ALT, FA y disminuidos de Proteínas totales y Albúmina fue atenuada por la administración de *ECL*.

La eficacia del efecto hepatoprotector se le puede atribuir principalmente a la presencia de compuestos fenólicos entre ellos los flavonoides <sup>(106, 108, 109, 110)</sup> en

La eficacia del efecto hepatoprotector se le puede atribuir principalmente a la presencia de compuestos fenólicos entre ellos los flavonoides <sup>(106, 108, 109, 110)</sup> en sinergismo con otros metabolitos como esteroides, triterpenos y Antraquinonas. Por otra parte se ha demostrado la fuerte relación entre los fenoles y la actividad antioxidante <sup>(111, 112, 113)</sup>, los cuales podrían secuestrar los radicales libres generados durante el metabolismo del paracetamol.

Estos estudios proporcionan una base científica para comprender uno de los posibles mecanismos de acción de *Encelia canescens* Lamarck "hierba lingo", en el uso de la medicina tradicional y abren el camino a futuras investigaciones.

# **CONCLUSIONES**

1. Como resultado del screening fitoquímico realizado al extracto etanólico de *Encelia canescens Lamarck* "hierba lingo" hemos determinado la presencia de los siguientes grupos de metabolitos secundarios: flavonoides, aminoácidos, antraquinonas, triterpenos y esteroides.
2. En la determinación de la toxicidad aguda a dosis límite, la dosis letal  $LD_{50}$  se encuentra por encima de 2000 mg/kg, clasificándose el producto como no tóxico según la tabla de Williams publicada en el Manual de Técnicas de Investigación CYTED 1995 para productos naturales administrados por vía orogástrica en ratones.
3. En la evaluación del efecto hepatoprotector, el extracto etanólico de *Encelia canescens Lamarck* a dosis de 400 mg/Kg fue el que presentó mayor actividad.
4. Al comparar el efecto hepatoprotector del extracto etanólico de *Encelia canescens Lamarck* y de la Silimarina, se puede observar que la dosis de 400 mg/Kg del extracto etanólico de *Encelia canescens Lamarck* posee un efecto similar en comparación con el fármaco de control.
5. En los estudios histopatológicos se pudo corroborar las lesiones hepáticas que presentó el grupo tratado con APAP, mientras que estas lesiones están disminuidas en el grupo tratado con el extracto etanólico de *Encelia canescens Lamarck*, lo cual se estaría evidenciando el gran efecto hepatoprotector de la planta.

# **RECOMENDACIONES**

- Aislar y elucidar los compuestos del extracto etanólico *ECL* "hierba lingo" para determinar los posibles metabolitos responsables del efecto hepatoprotector.
- Realizar ensayos biológicos con extracto de flavonoides purificado para comprobar el efecto hepatoprotector.
- Determinar la actividad antioxidante con los compuestos fenólicos aislados.

**REFERENCIAS**  
**BIBLIOGRÁFICAS**

1. Sugiyama k, He P, Wada S, Saeki S. Teas and other beverages suppress D-galactosamine induced liver injury in rats.J.Nutr.1999 [citado 14 setiembre 2014]; 129:1361-67.disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395599>.
2. Amacher D. A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. Hum Exp toxicol.2002; 21(5):253-62.
3. Bozzo J. Implementación y desarrollo de una planta elaboradora de extracto de hierbas (Boldo y Rosa Mosqueta). Santiago de Chile; 2006. Pp. 21-29.
4. Cárdenas M. Farmacología. Riobamba – Ecuador. Workcenter; 2011. Pp. 501-511.
5. Jefferies S, Saxema M, Young P. Paracetamol in critical illness. Crit Care Resusc. 2012; 14(1):74-80.
6. Larson A, Polson J, Fontana R, Davem T, Lalani E, HynamL, et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study.Hepatology.2005[citado 22 setiembre 2014];42:1364-72.Disponible en:  
<http://files.bvs.br/upload/S/0101-7772/2011/v30nSupl.1/a2375.pdf>.
7. Davem T, Timothy J, James L, Hinson J, Larson A, Fontana R, et al. Measurement of serum acetaminophen-protein adducts in patients with acute liver failure.Gastroenterology.2006.[citado 10 octubre 2014];130:94-687.disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16950959>.

8. Nassini R, Materazzi S, Andre E, Sartiani L, Aldini G, Trevisani M, et al. Acetaminophen, via its reactive metabolite N-acetyl-p-benzo-quinoneimine and transient receptor potential ankyrin-1 stimulation, causes neurogenic inflammation in the airways and other tissues in rodents. *FASEB J.*2010.[citado 12 octubre 2014];24(12):4904-16.Disponible en:  
<http://www.fasebj.org/content/24/12/4904.full.pdf>.
9. Jaeschke H, Knight T, Bajt M. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Lett.*2003; 144(3):279-88.
10. FDA. Acetaminophen and liver injury: Prescription Acetaminophen Products Health information. 2011. Disponible en :  
<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm239821.htm>.
11. Avalos A, Pérez –Urría E. Metabolismo secundario de plantas. Serie Fisiología Vegetal .2009; 2(3):119-145.
12. Rodríguez A, Escalona J, Arrauz J, Lafourca PA, Pérez R, Licea I. Desarrollo Tecnológico y evaluación Tóxico-farmacológica de formas farmacéuticas sólidas a partir de extractos de las hojas de la especie *Tamarindus Indica* L. *Rev. Latinoamericana Química.* 2011,38 (Suplemento especial) Cuba.
13. Morón FJ. Plantas medicinales y medicamentos herbarios. En: Morón FJ, Levy M. *Farmacología general.* La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2002. p. 195-205.

14. Morón F, Villán J, Martínez M.J. Toxicidad Aguda. Rev. Cubana Med. Gen. 1991; 7:276-84.
15. Bertram G, Farmacología Básica y Clínica. 8a ed. México D.F - México. El Manual Moderno; 2003. Pp. 71.
16. Cárdenas M. Farmacología. Riobamba – Ecuador. Workcenter; 2011. Pp. 490-493.
17. Finkel R. Farmacología. Barcelona - España. Lippincott; 2009. Pp. 530-531.
18. Calleja E. el hígado: Alcohol, alcoholismo y cirrosis. 1ra ed. México: pachuca Editores; 2007:71-82.
19. Vera M. Hepatic stellate cells and alcoholic liver disease. Rev Esp. Enferm. dig. 2006; 98:674-84.
20. Bian Z, Ma X. Liver fibrogenesis in non-alcoholic steatohepatitis. Front physiol. 2012; 3:248.
21. Urtasun R, Nieto N. Hepatic stellate cells and oxidative stress. Rev Esp. Enferm. Dig. 2007; 99:223-30.
22. Nakatani k, Seki S, Nakajima Y. Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. Med Electron Microsc. 2004; 37:29-36.
23. Kasper C. Biochemical distinction between the nuclear and microsomal membranes from rat hepatocytes. J Biol Chem. 1971; 246:577-581.
24. Florez J. Farmacología Humana. México D.F – México; 2003. Pp. 204-205
25. Guyton A. Tratado de Fisiología Médica. 10a ed. México D.F - México. Mc Graw - Hill Interamericana; 2001. Pp. 961-966.

26. Guímaro A. Enciclopedia de las Plantas que curan., 2a ed., Sao Paulo - Brasil. Conselho; 1994. Pp. 184-185.
27. Friedman SL, Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. Journal of Biological Chemistry, 2000; 275: 4. 2247-2250.
28. Prives M. Anatomía Humana. 5a ed. Mir-Moscú; 1995. P. 238-240.
29. Roach J, Benyon S. Metabolismo de las proteínas: Lo esencial del metabolismo y nutrición. España.Elsevier.2004; 83-106.
30. Roach J, Benyon S. Metabolismo de las proteínas: Lo esencial del metabolismo y nutrición. España.Elsevier.2004; 7-45.
31. Roach J, Benyon S. Metabolismo de las proteínas: Lo esencial del metabolismo y nutrición. España.Elsevier.2004; 55-82.
32. Malhi H, Kaufman R. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. J Hepatol 2011; 54:795-809.
33. Grattagliano I, Ubaldi E, Portincasa P, palasciano G. Liver disease: early signs you may be missing. J Fam Pract.2009; 58:514-21.
34. Stransky J, Ryzlova M, Stritesky J, Horak J. Aspartate aminotranferse(AST) more than alanine aminotransferase (ALT) levels predict the progrsion of liver fibrosis in chronic HCV infection. Vniter Lek.2002; 48:924-28.
35. Lindi J, Hyde G. Evaluation of abnormal liver function tests. Postgrad Med. 2003; 79:307-12.

36. Grattagliano I, Ubaldi E, Bonfrate L, Porticasa P. Management of liver cirrhosis Between primary care and specialists. *World J Gastroenterol.* 2011; 79:307 - 12.
37. Minuk G. Canadian Association of Gastro enterology Practice Guidelines: Evaluation of abnormal liver enzyme. *Canad J Gastroent;* 1998. 12(6).
38. Mejía G. Interpretación Clínica de Laboratorio. 5a ed. Bogotá-Colombia., Médica Panamericana; 1996. Pp. 270-273.
39. Paltan J. Anatomía. Fisiología e Higiene. 17a ed., Quito - Ecuador. HOLOS; 2004. Pp. 96-97.
40. Pratt D, Kaplan M. Evaluation of abnormal liver enzyme results in asymptomatic patients. *N Eng J Med* 2000; 342:1266-1271.
41. Dufour R. Laboratory guidelines for screening. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. *The National Academy of Clinical Biochemistry* 2000, Vol. 12.
42. Sohn D, Yun Y, Park K, veech R, song B. Post-traslational reduction of cytochrome P45011E. *Res Commun.*1991; 179:449-54.
43. Saito M, Obi M, Kimura M. Infantile hepatic dysfunction of cow's milk formulas. *Pediatr Allergy Imunol.*2005; 16: 445-8.
44. Murray, Robert K., Mayes, Meter A. *Bioquímica de Harper: Porfirinas y Pigmentos Biliares; Manual Moderno, 13va edición. México, D.F. Págs. 393-409.*

45. Martín D, Genoveva. Apuntes de Bioquímica No. 4. Manual Complementario de Procesos Bioquímicos del Organismo II: Bilirrubina en Suero. Editora UASD; 1998. Pp.19-34.
46. Gibson J, pumford N, Samokyszyn V, Hinson J. Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: covalent binding versus oxidative stress. Chem. Res.Toxicol.1996; 9:580-85.
47. Muñón M J, Álvarez M, Culebras J M, González-Gallego Modelos animales de fallo hepático fulminante. Nutr Hosp.2007; 22(2):199-204.
48. Soza A. Hepatitis tóxica: acetaminofeno y otras. Gastr Latinoam. 2004; 15 (2):158-162.
49. Selema G, Martínez J. Efecto hepatoprotector inducido por el flavonoide Astilbina frente a un modelo animal tratado con tetracloruro de carbono. Rev Cubana Plant Med. 1999; 4(1):36-9.
50. Valcheva-kuzmanova S, Borisaba P, Galunska B. Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from Aroniamelanocarpa on carbón tetrachloride-induced acute liver damage in rats. Exp.Toxicol.pathol.2004; 56:195-201.
51. Mitchell J, Jollow D, Potter W, Davis D, Gillette J, Brodie B. Acetaminophen induced hepatic necrosis y role of drug metabolism. Of pharmacology and experimental Therapeutics.1973a; 187(1):185-194.
52. Mitchell J, Jollow D, Potter D, Gillete J, Brodie B. Acetaminophen induced hepatic necrosis. IV protective role of glutathione. The journal of pharmacology and Experimental Therapeutics.1973b; 187(1):211-17.

53. Benito M, Fernández C. Protocolo por intoxicación por paracetamol. Hospital Clínico Universitario de Valladolid. SECIP; 2013.
54. Al-Obaidy S, Mckiernam P, Li-Wan P ,Glasgow J, Collier P. Metabolism of paracetamol in children with chronic liver disease. Eur. J. Clin. pharmacol.1996; 50:69-76.
55. Al-Obady S, Li-Wan p, Mckierman P, Glasgow J, Millership J. Assay of paracetamol and its metabolites in urine, plasma and saliva of children with chronic liver disease. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.1995; 13:1033-39.
56. Prescott L, Roscoe P, Wright N, Browns S. Plasma paracetamol half-life and hepatic necrosis in patients with paracetamol overdose. The lancet.1971; 519-52.
57. Prescott L, Critchley A. The treatment of acetaminophen poisoning. Ann. Rev. Pharmacol. toxicol.1983; 23:87-101.
58. Keith H, Ellen T. Effects of legislation restricting pack sizes of paracetamol and salicylate on self-poisoning in the united kingdom: before and after study BMJ. 2001; 322:17.
59. Bernal W. Changing Patterns of Causation and the use of transplantation in the United Kingdom. Seminars in Liver Disease. Fulminant Hepatic Failure 2003; 23(3):227-37.
60. Whitcomb DC, Block GD. Association of acetaminophen hepatotoxicity with fasting and ethanol use. JAMA 1994; 272(23):1845-50.

61. Graham G, Scott K, Day R. Tolerability of paracetamol. *Drugs* 2003; 63 (Special Issue 2):39-42.
62. Chen L, Lin S. Acetaminophen alters antioxidant defense enzyme activities in hepatocyte culture. *Biochemical Archives*.1996; 12:33-42.
63. Gibson J, Pumphord N, Samokyszyn V, Hinson J. Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: covalent binding versus oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.*1996; 9:580-85.
64. Liu L, Klaassen CD. Different mechanism of saturation of acetaminophen sulfate conjugation in mice and rats. *Toxicology and applied pharmacology*.1995; 47:949-56.
65. Halmes, N, Hinson J, Martin B, Pumphord N. glutamate dehydrogenase se covalently binds to a reactive metabolite of acetaminophen. *chem. Res. toxicol.*1995; 9(2):541-46.
66. Webster P, Robert D, Benson R, Kearns G. Acetaminophen toxicity in children: Diagnostic confirmation using a specific antigenic biomarker. Lippincott-Raven Publishers. 1996; 36(5):397-402.
67. Roberts M Ballinger L, Cross S. Availability and mean transit times of phenol and its metabolites in the isolated perfused rat liver: Normal and retrograde studies using tracer concentrations of phenol *J.Pharm.Pharmacol.*1995; 47:949-56.

68. Kikkawa R, Fujiyama M, Yamamoto T, Hamada Y, Yamada H, Horuu I. In vivo hepatotoxicity study of rats in comparison with in Vitro hepatotoxicity screening system. *The journal of Toxicological sciences*. 2006; 31(1):23-34.
69. Insel PA. Acetaminophen. *Goodman & Gilman. Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 10ma Ed. McGraw-Hill 2000; 677.
70. Thummel KE, Slattery JT. Ethanol and production of the hepatotoxic metabolite of acetaminophen in healthy adults. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2000; 67(6):591-9.
71. Takahashi T, Lasker JM, Rosman AS, et al. Induction of cytochrome P-4502E1 in the human liver by ethanol is caused by a corresponding increase in encoding messenger RNA. *Hepatology*. 1993; 17(2):236-45.
72. Whitcomb DC, Block GD. Association of acetaminophen hepatotoxicity with fasting and ethanol use. *JAMA* 1994; 272(23):1845-50.
73. Graham G, Scott K, Day R. Tolerability of paracetamol. *Drugs* 2003; 63 (Special Issue 2):39-42.
74. Zhang J, Huang W, Chua S. Modulation of acetaminophen-induced hepatotoxicity by the xenobiotic receptor CAR. *Scienc* 2002; 298(5592):422-4.
75. William ML. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2003; 349:474-85.
76. Farrel GC. Liver disease caused by drugs, anesthetics and toxins. *Sleisenger & Fordtran. Gastrointestinal and Liver disease*. 6ta Edición. Ed Saunders 1998; 1232.

77. Clemedson C, McFarlane-Abdulla E, Andersson M. MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity. *ATLA* 1999; 24:273-311.
78. Halder M, Balls M. Implementation of three Rs alternatives in regulatory testing: possibilities and obstacles-the view of the validator. *Developmental Biology (Basel)* 2002; 111:199-206.
79. Simon MG, Ventura EE, Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto etanólico de frutos de *Corryacactus brevistylus*. Facultad Farmacia ICA.2013.
80. Santos J, Arana J. estudio del efecto hepatoprotector de la especie *Gamochaeta americana* (quetoqueto) en animales de experimentación. *Revista Universita: premio de la investigación. Universidad Católica de Santa Maria.*2005; 9(1).
81. Troncoso L. Guija E. Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por el paracetamol. *Anales de la facultad de medicina: 2007; 68(4):333-43.*
82. Sandoval M. Lazarate K, Amao I. Hepatoprotección antioxidante de las cascarras y semillas de *Vitus vinífera* L.(uva)*Anales de la facultad de medicina 2008;69(4):240-9.*
83. Arnao A, Soares S, Cisneros R, rodrigo M. Efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Smallantuss onchifolius* (yacón) en un modelo de intoxicación con acetaminofén. *Anales de la facultad de medicina ,2012; 73(3):239-44.*
84. Porchezian E, Ansari SH. Hepatoprotective activity of *Abutilon indicum* on experimental liver damage in rats. *Phytomedicine* 2005; 12(1-2):62-6.

85. Manokaran S, Jaswanth A, Sengottuvelu S, Nandhakumar J, Duraisamy R, karthikeyam D, Mallegaswari R. Hepatoprotective activity of *Aerva lanata* Linn. Against paracetamol induced hepatotoxicity in rats. Research. Pharm. and tech .2008; 1(4).
86. Patienceosadebe, et al. phytochemical analysis, hepatoprotective and antioxidant activity of *Alchornea cordifolia* methanol leaf extract on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. Asian pacific journal of tropical medicine .2012; 289-93.
87. Chattopadhyay RR, Bandyopadhyay M. Possible mechanism of hepatoprotective activity of *Azadirachta indica* leaf extract against paracetamol –induced hepatic damage in rats: part III. indian J Pharmacol 2005;37:184-5.
88. Yahya F. Hepatoprotective Activity of metabolic extract of *bauhinia purpurea* leaves against paracetamol. Induced hepatic damage in rats. Journal evidence –based complementary and alternative medicine.2013:10.
89. Chelvan V.K, Ramaanathan T, Manavalan R, BalamuruganK. Hepatoprotective activity of *Melissa zedarach* Linm .flower extract against paracetamol induced hepatic damage in albino rats. Plant archives 2008; 8(2):1003-1005.
90. Ashok M. Hepatoprotective effect of cleome viscosa L. seeds in paracetamol. IJBA 2010; 1(4).
91. Soudararajam V. in vitro antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Elaeis guineensis* leaf against paracetamol induced damage in Mice. International journal of chemical and applications. August 2012; 3(4).

92. Baheti JR, Goyal RK, Shah G B. Hepatoprotective activity of *Hemidesmus indicus* R Br. In rats. IJEB 2006; 44(5):399-402.
93. Chang J, et al antioxidative and hepatoprotective effects of *Physalis peruviana* extract against Acetaminophen- induced liver injury in rats. Journal Pharmaceutical biology .2008; 46(10-11):724-31.
94. Kumar M, Sisodia S, Kamboy A, Rathi V. Evaluation of hepatoprotective effect of *Sesamun indicun limm* sed extract against paracetamol induced hepatotoxicity in rats. IJPCR 2011; 49(8):826-32.
95. Linares E. Etnobotánica del transecto Yura-Chivay, departamento de Arequipa, Perú., Chlorischilensis revista chilena de flora y vegetación, 200 Año 3. N°1.
96. Weberbauer A. El mundo vegetal de los andes peruanos. Ministerio de Agricultura.Lima. Perú, 1945.
97. Soukup, J. Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y catálogo de los géneros. Edit. Salesiana. Lima, 1984.
98. Moerman. D. Native American Ethnobotany Timber Pres, Oregon 198.
99. Ríos C. Caracterización Ecomorfológica del matorral costero árido del norte de Chile y la potencialidad del Germoplasma nativo. Tesis presentada como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Vegetales, 204.
100. Yáñez P. Caracterización técnico-Económica de la implementación de un sistema biodinámica en un viñedo convencional cv. Cabernet Sauvignon en el Vale de Limarí. Memoria para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo, 206.

101. Lock O. Investigación Fitoquímica. Perú: Fondo Editorial PUCP; 1994: 7-10.
102. Clemedson C, McFarlane-Abdulla E, Andersson M. MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity. ATLA 1999; 24:273-311.
103. Halder M, Balls M. Implementation of three Rs alternatives in regulatory testing: possibilities and obstacles-the view of the validator. Developmental Biology (Basel) 2002; 111:199-206.
104. OECD. Guideline no. 420 acute oral toxicity – fixed Dose Procedure. Francia: Guideline for Testing of Chemicals, Inc.; 2007 (Actualizado 26 Jun 2007).
105. OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for testing of chemicals. Guideline no. 420: Acute oral toxicity class method, Paris; 2002; 5-6.
106. Koser E, Evans S, Barr J, Greenberg R, Soriana I, Bulkowsteim M. Glutathione, Glutathione-dependent enzymes and antioxidant status in erythrocytes from children treated with high dose paracetamol. Brit j Clin pharmacol.2003; 55:234-40.
107. Boyd E, Bereczky G. Liver necrosis from paracetamol. Brit J Pharmacol Chemother. 1966; 26: 606-14.
108. Bosa J. Alimentacion y enfermedad. Anales de la real academia de ciencias Veterinarias de Andalucia Oriental. 2003; 16(1):163-97.
109. Olaleye M, Rocha B. Acetaminophen-induced liver damage in mice: effects of some medicinal plants on oxidative defense system. Exp Toxicol pathol.2008; 59:319-27.

110. Hayes F, Kato H. Antioxidant components of sweet potatoes. *J Nutr Sci Vitaminol*.1984; 30:37-46.
111. Yen G, Duh P. Antioxidative properties of methanolic extracts from Peanut hulls. *JAOCS*. 1993; 70: 383-86.
112. Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. *JAOCS*.1981; 58:966-68.
113. Udomchotphruet S, Phuwapraisirisan P, Sichaem J, Tip-pyang S. Xanthones from the stems of *Cratogeomys cochinchinense*. *Phytochemistry*.2012; 73:148-51.

# **ANEXOS**

## Anexo Nº 01. Clasificación taxonómica de la planta

*Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático*

**CONSTANCIA Nº 328-USM-2014**

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (tallo, hoja y flor) recibida de **Deissy FERNANDEZ LANDA y Yasmina COCHACHI ALFARO** ha sido estudiada y clasificada como: ***Encelia canescens Lamarck*** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: ASTERIDAE**

**ORDEN: ASTERALES**

**FAMILIA: ASTERACEAE**


**GENERO: *Encelia***

**ESPECIE: *Encelia canescens Lamarck***

Nombre vulgar: "hierba lingo"  
Determinado por Mag. Hamilton Beltrán.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 10 de octubre del 2014



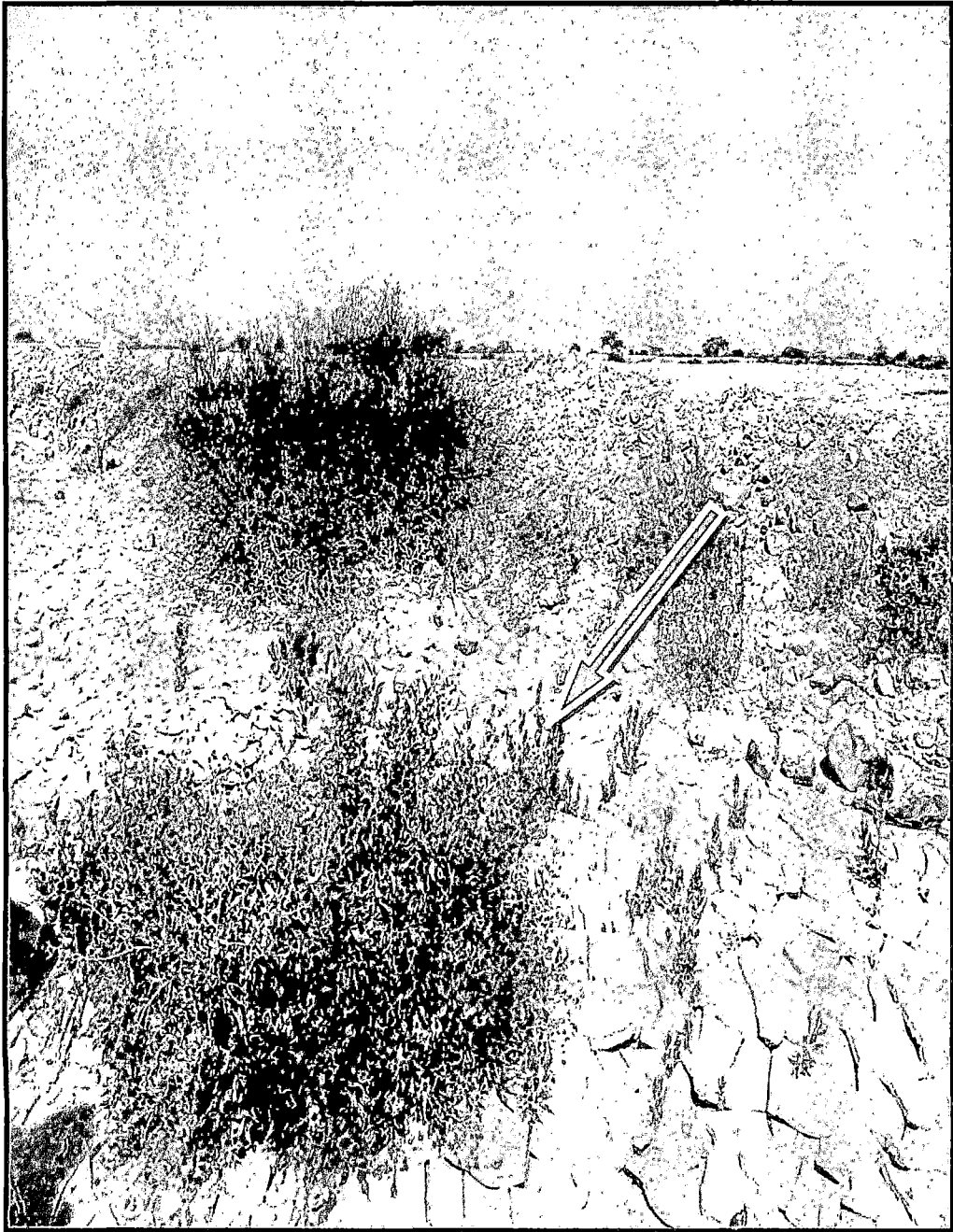
**JEFE** *Dr. Haydee Montoya Terreros*  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Av. Alameda 1229, Jesús María  
Lima 11714, Lima 14, Perú

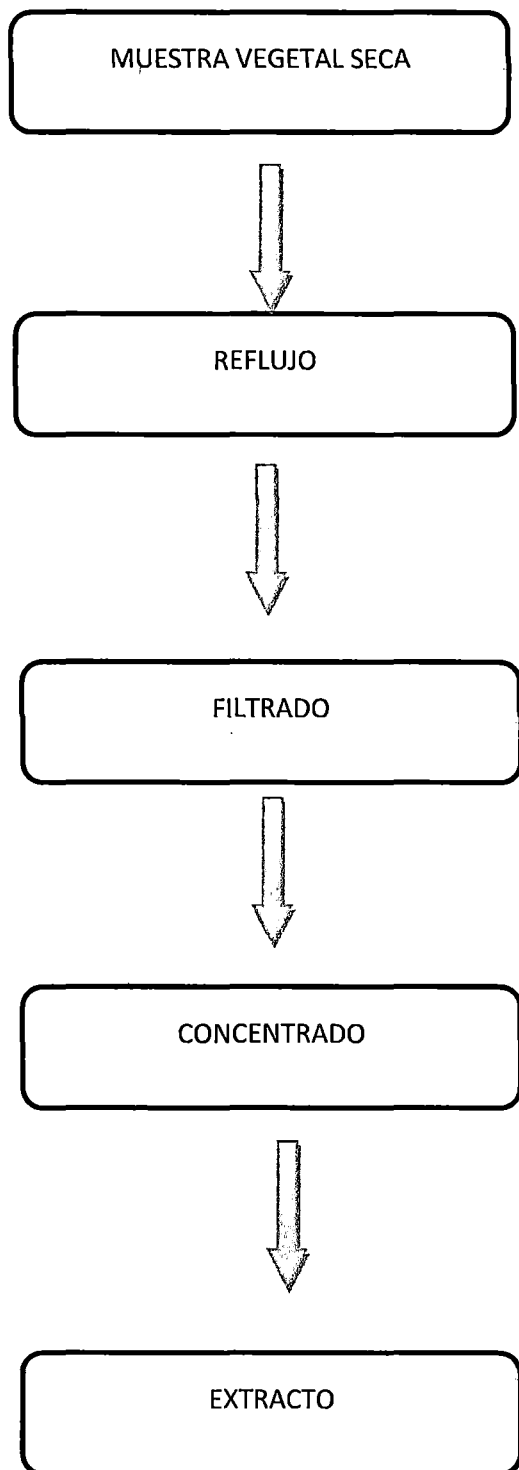
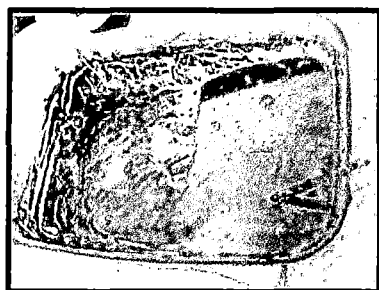
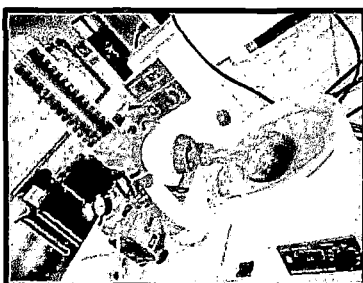
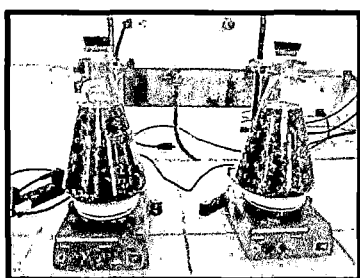
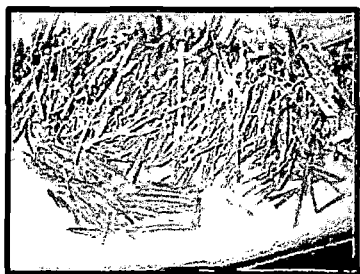
Teléfono: (51) 011 710 4471  
470 7118; 011 710 4471 ext. 5011

correo: [herbario@unmsm.edu.pe](mailto:herbario@unmsm.edu.pe)  
<http://unmsm.edu.pe/herbario>

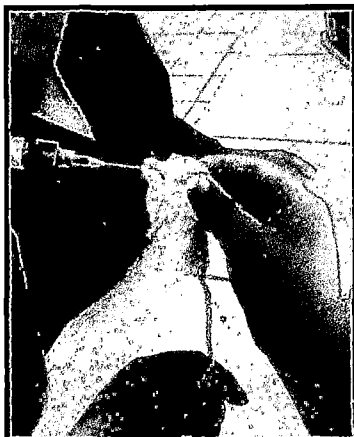
**Anexo Nº 02.** Ubicación en los campos de *Encelia canescens* Lamarck.



ANEXO N° 03. Obtención del extracto etanólico *Encelia canescens* Lamarck.



**ANEXO Nº 04. Experimento de toxicidad aguda.**



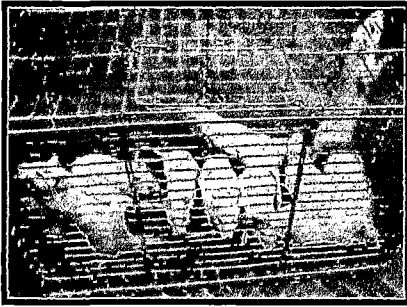
ADMINISTRACIÓN DEL  
EXTRACTO A 2000 mg/Kg



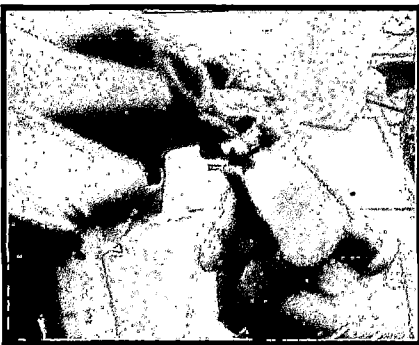
EVALUACIÓN DEL  
COMPORTAMIENTO



**Anexo Nº 05. Experimento de Efecto hepatoprotector.**



RATAS



ADMINISTRACIÓN DEL  
EXTRACTO Y APAP

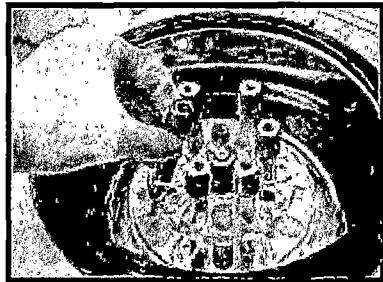


EXTRACCIÓN DE SANGRE  
POR PUNCIÓN CARDIACA

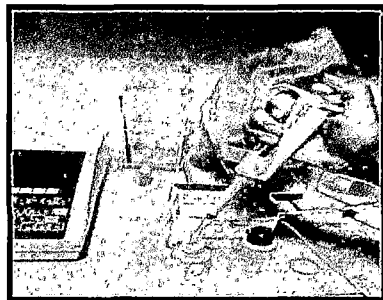


OBTENCIÓN DE LA  
SANGRE

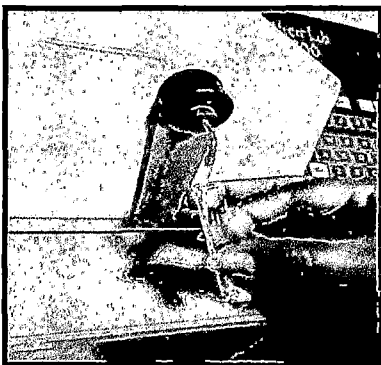
**Anexo Nº 06. Determinación de las distintas enzimas.**



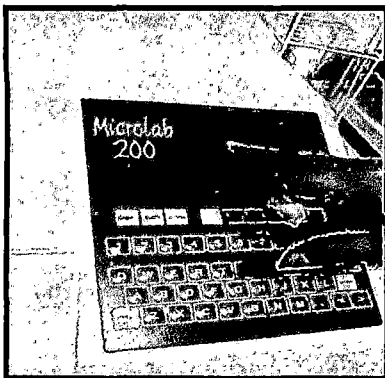
CENTRIFUGAR LA MUESTRA



EXTRACCIÓN DEL  
SUERO



MEZCLAR CON LOS  
REACTIVOS



LECTURA DE LA  
MUESTRA



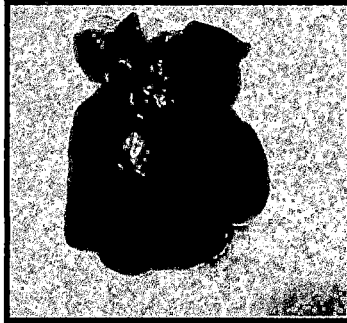
RESULTADOS

**ANEXO N° 07. Disección de las ratas.**

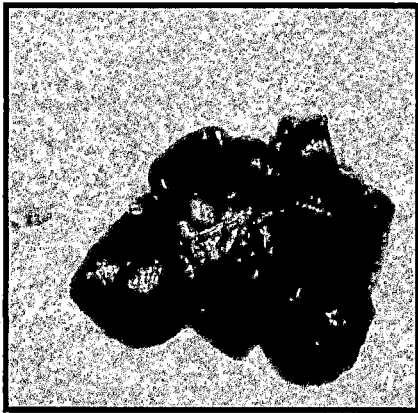


**ANEXO N° 08. Muestras de hígados de los diferentes grupos tratados.**

**CONTROL**



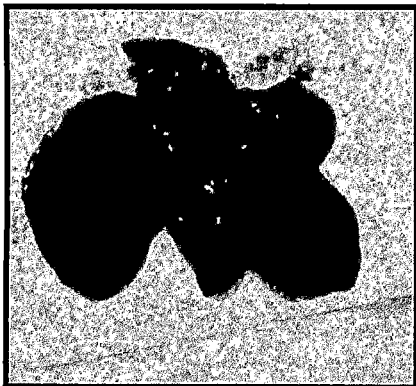
**EXTRACTO  
200 mg/Kg**



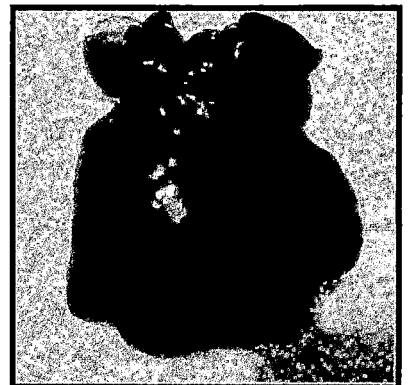
**APAP**



**EXTRACTO  
400 mg/Kg**



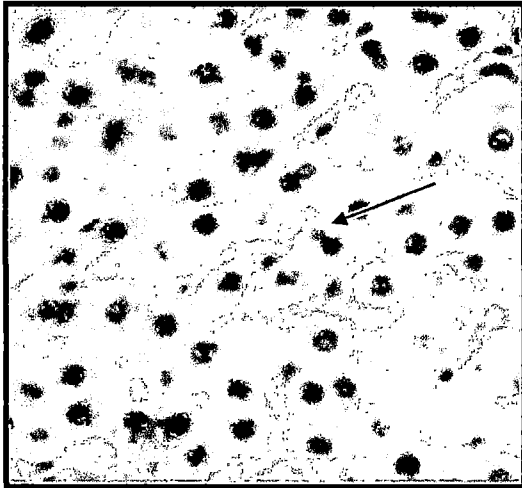
**SILIMARINA**



**ANEXO N° 9. Conservación de los hígados en formol al 10 % para el estudio.**



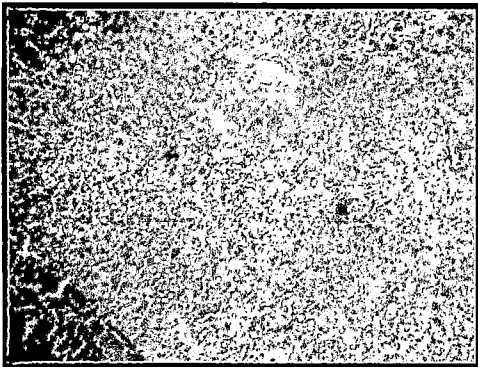
**Anexo Nº 10. Cortes histopatológicos.**



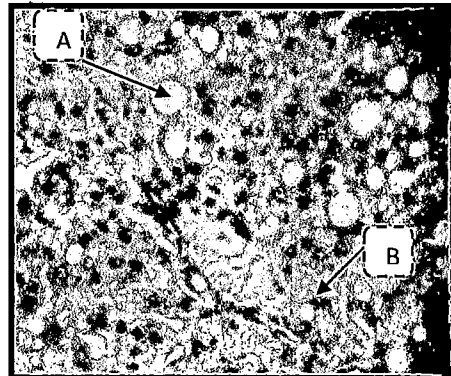
**GRUPO CONTROL**  
Hígado normal. 40X  
Arquitectura hepática  
conservada.

**APAP 250 mg/Kg**

10 X

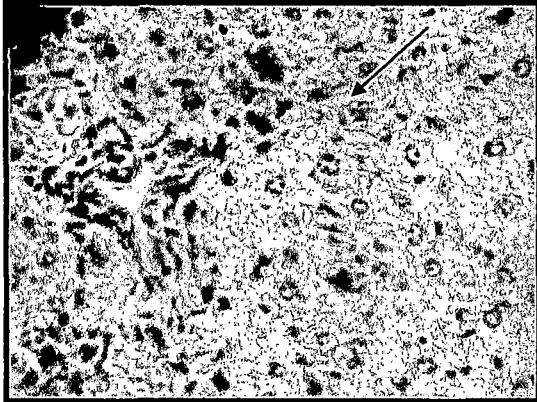


40 X



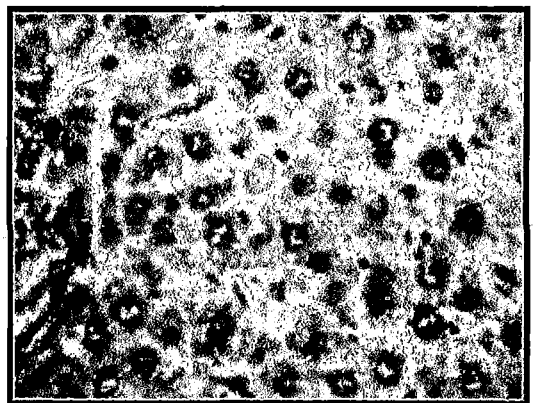
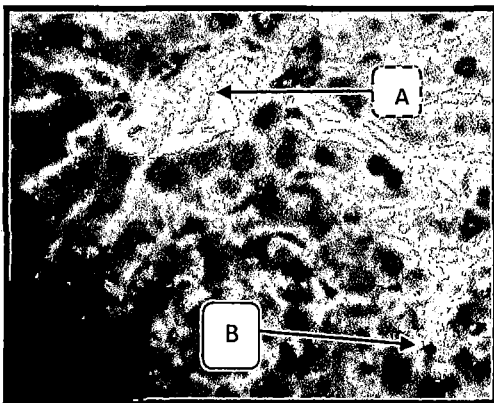
- a. Presencia de esteatosis,  
Hígado graso.
- b. Degeneración vacuolar.

**Extracto de 200 mg/Kg**



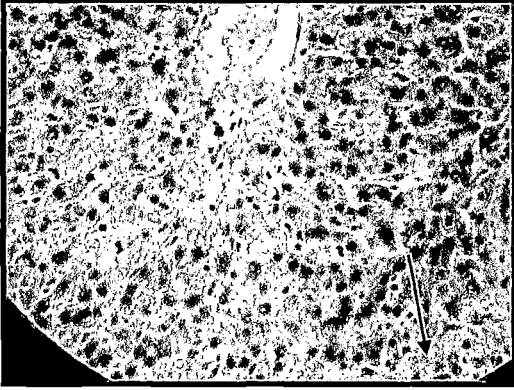
Sinoides hepáticos dilatados.

**Extracto de 400 mg/Kg**



- a. Zona portal normal
- b. Microesteatosis (20 %)

**Silimarina 300 mg/Kg**



Microsteatosis.

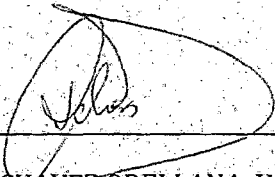
## CONSTANCIA

Los Químicos Farmacéuticos que suscriben:

### HACEN CONSTAR QUE:

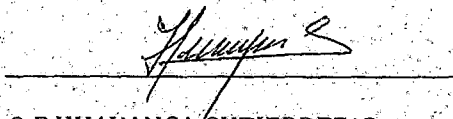
Han revisado el borrador de tesis "Toxicidad aguda y efecto hepatoprotector del extracto etanólico de los tallos de *Encelia canescens Lamarck.*, en ratas en un modelo de intoxicación con acetaminofén." que desarrollaron los Bachilleres COCHACHI ALFARO Yasmina y FERNÁNDEZ LANDA Deissy Liz. Y los consideran apto para la presentación y para que previo tramite le emita la resolución de aprobación.

Ica 28 de noviembre del 2014



Dra. CHAVEZ ORELLANA, Hayde

ASESORA



Q.F HUAYANCA GUTIERREZ, Carmen

ASESORA