



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA
DE BOLDO (*Peumus boldus*) EN RATAS (*Rattus norvegicus*) CON
INTOXICACIÓN HEPÁTICA INDUCIDA POR PARACETAMOL.”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICA FARMACEÚTICA

PRESENTADO POR

DORYS KARYNA VELOZ VILLACRÉS

RIOBAMBA – ECUADOR

2013

DEDICATORIA

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 mi madre Aida.

Por haberme apoyado en todo momento, 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 mi padre Armando

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mi hermano y mi sobrino

Siendo ellos mi impulso para continuar día a día.

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

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en especial a la Escuela de Bioquímica y Farmacia por los conocimientos impartidos durante mi época estudiantil.

Al BQF Diego Vinuesa, un gran profesor y amigo, por la paciencia y su apoyo brindado.

Al Director de esta tesis Dr. Oswaldo Duque y colaboradora Dra. Susana Abdo, gracias por sus enseñanzas, doctrinas y apoyo incondicional.

A Mario el amor de mi vida, por acompañarme durante todo este arduo camino y compartir conmigo alegrías fracasos.

A mis amigas del colegio, y de la politécnica por la solidaridad y cariño que me han demostrado.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que El trabajo de investigación:

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DE BOLDO (*Peumus boldus*) EN RATAS (*Rattus norvegicus*) CON INTOXICACIÓN HEPÁTICA INDUCIDA POR PARACETAMOL.” de responsabilidad de la señorita egresada Dorys Karyna Veloz Villacrés, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dr. Silvio Álvarez DECANO FAC. CIENCIAS	-----	-----
Dr. Iván Ramos DIRECTOR ESCUELA BIOQUÍMICA Y FARMACIA	-----	-----
Dr. Oswaldo Duque DIRECTOR DE TESIS	-----	-----
Dra. Susana Abdo MIEMBRO DEL TRIBUNAL	-----	-----
Dra. Ana Albuja MIEMBRO DEL TRIBUNAL	-----	-----
Tc. Carlos Rodríguez DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	-----	-----
NOTA DE TESIS	-----	

Yo Dorys Karyna Veloz Villacrés, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados, expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

DORYS KARYNA VELOZ VILLACRÉS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ALAT	Alanina aminotransferasa
ANOVA	Análisis de varianza
ASAT	Aspartato de aminotransferasa
°C	Grados Centígrados
cm	Centímetros
mg	Miligramos
g	Gramos
Kg	Kilogramo
L	Litro
M	Muestra
Ms	Masa seca
min	Minutos
mL	Mililitro
NAC	N-acetilcisteina
NAPQI	N – acetil p-benzoquinoneimina
%	Porcentaje
S.T	Sólidos totales
OMS	Organización mundial de la salud
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica
T max	Temperatura máxima
C max	Concentración máxima
OPS	Organización panamericana de la salud
Rf	Franja de referencia
Nm	Nanómetro
mm	Milímetro
%H	Porcentaje de Humedad
%C.T.	Porcentaje de cenizas totales
ρ	Densidad relativa
Log	Logaritmo

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

INDICE DE TABLAS

INDICE DE CUADROS

INDICE DE GRAFICOS

INDICE DE ANEXOS

1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 PARACETAMOL.....	1
1.1.1. Mecanismo de acción del paracetamol	1
1.1.1.1. Manifestaciones clínicas	2
1.1.1.3 Trastornos histopatológicos por paracetamol.....	3
1.1.2 Metabolismo hepático de las drogas.....	4
Fase 1	4
Fase 2	4
Citocromo P450	5
1.2. HEPATOTOXICIDAD	5
1.2.1 Clasificación de Hepatotoxicidad	6
1.2.3 Compuestos Hepatotóxicos	7
1.2.3.1 Fármacos asociados a la toxicidad hepática:	7
1.2.3.2 Algunos complementos nutricionales asociados a la toxicidad hepática:	8
1.2.3.3 Factores de riesgo para daño hepático inducido por fármacos.....	8
1.2.4 Mecanismo de Daño Hepático.....	8
1.3. HÍGADO.....	9
1.3.1 Anatomía Hepática.....	10
1.3.2 Histología Hepática.	10
1.3.2.1. Estroma:	11
1.3.2.2. Parénquima hepático:	11
1.3.2.3. Espacio porta o de Kiernan:	12
1.3.3 FISIOLÓGÍA DEL HÍGADO	12
1. Funciones vasculares.....	13

2. Funciones metabólicas.....	14
3. Funciones excretoras y secretoras encargadas de formar bilis.....	16
1.4. ENFERMEDADES HEPÁTICAS	16
1.5 PERFIL HEPÁTICO	18
1.5.1 Examen de bilirrubina sérica.....	18
1.5.2 Examen de albúmina sérica.....	18
1.5.3 Examen de fosfatasa alcalina sérica.....	19
1.5.4 Aminotransferasas séricas (transaminasas).....	19
1.5.5 Examen de tiempo de protrombina (su sigla en inglés es PTT).....	19
1.5.6 Examen de alanina transaminasa (su sigla en inglés es ALT).....	19
1.5.7 Examen de aspartato transaminasa (su sigla en inglés es AST).....	19
1.5.8 Examen de gamma-glutamiltanspeptidasa.....	19
1.5.9 Examen de lactato deshidrogenasa.....	20
1.6 TRANSAMINASAS HEPÁTICAS	20
1.6.1 Niveles normales de transaminasas	20
1.6.2 Aumento de transaminasas	20
1.6.3 Nivel de transaminasas en sangre	21
1.6.4 PAPEL DE LAS AMINOTRANSFERASAS EN EL METABOLISMO	22
1.6.5. ENFERMEDADES CAUSAN NIVELES DE TRANSAMINASAS ANORMALES.....	23
1.7 BOLDO (<i>Peumus boldus</i>).....	24
1.7.1 Taxonomía.....	24
1.7.2 Etimología.....	24
1.7.3 Distribución y hábitat	25
1.7.4 Descripción	25
1.7.5 Propiedades biológicas	25
1.7.6 .Composición química	26
1.7.7 Acción farmacológica.....	27
1.7.8 Actividad hepatoprotectora.....	27
1.7.9 Efectos adversos.....	28
1.8. DROGAS HEPATOPROTECTORAS	28
1.8.1. SIMARIN	29
1.8.1.1. Composición	29
1.8.1.2 Acción terapéutica	29
1.8.1.3. Indicaciones	30
1.8.1.4. Contraindicaciones	30

1.8.1.5. Efectos adversos	30
1.8.1.6. Posología y administración	30
1.8.1.7. Presentación comercial	30
1.8.1.8. Mecanismo de acción de la silimarina	31
1.9 RATAS WISTAR (<i>Rattus norvegicus</i>)	32
1.9.1 Clasificación Taxonómica	32
1.9.2 Descripción de la Especie	33
1.9.3 Medidas.....	33
1.9.4 Ciclo Reproductivo	33
1.9.5 Tamaño de la Camada	33
1.9.6 Hábitos Alimenticios	34
2. PARTE EXPERIMENTAL	35
2.1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	35
2.2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.	35
2.2.1. Materiales	35
2.2.2. Reactivos.....	36
2.2.4 Equipos	37
2.3 TÉCNICAS Y MÉTODOS	38
2.3.1 Técnica por Infusión	38
2.3.2 ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO	38
2.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO	41
2.4.1 Ensayo de Dragendorff	42
2.4.2 Ensayo de Mayer	42
2.4.3 Ensayo de Wagner	43
2.4.4 Ensayo de Liebermann-burchard.....	43
2.4.5. Ensayo de Borntrager	44
2.4.6 Ensayo de Baljet	44
2.4.7 Ensayo de Sudán.....	44
2.4.8 Ensayo de Catequinas.....	45
2.4.9 Ensayo de Resinas	45
2.4.10 Ensayo de la Espuma	45
2.4.11 Ensayo del Cloruro Férrico.....	45
2.4.12 Ensayo de la Ninhidrina	46
2.4.13 Ensayo de Shinoda	46
2.4.14 Ensayo de Antocianidinas	46

2.4.15 Ensayo de Fehling.....	46
2.5 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	47
2.5.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>)	47
2.5.2 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS	48
1. Determinación del olor	51
2. Determinación del color	51
2.5.3 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	51
2.6 ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DE LA INFUSIÓN DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>).....	52
2.6.1 HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR PARACETAMOL A RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>)	52
2.6.2 ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	55
1.Período 1: Aclimatación.....	55
2.Período 2: Inducción de la hepatotoxicidad	55
3.Período 3: Tratamiento	56
4.Período 4: Evaluación de la actividad hepática.....	56
2.6.3. DETERMINACIÓN DE TRANSAMINASAS ALAT Y ASAT	57
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
3.1 CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA SECA DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>).	60
3.1.1 ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO.....	60
3.2 CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>).....	62
3.2.1 TAMIZAJE FITOQUÍMICO	62
3.2.2 DETERMINACIÓN DEL pH.....	64
3.2.3 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA.....	64
3.2.4 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN.	64
3.2.5 DETERMINACIÓN DE ° BRIX.....	65
3.2.6 DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES.....	65
3.2.6 DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS.....	65
3.2.7 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	66
3.3 ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>) EN RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>) CON HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA CON PARACETAMOL.	67
3.4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PESO BASAL Y FINAL DE RATAS WISTAR (<i>Rattus norvegicus</i>) CON RESPECTO A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS APLICADOS CON EL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>) EN LOS REACTIVOS BIOLÓGICOS EN LA INVESTIGACIÓN.	70

3.5. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA COMPROBAR LA ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DEL BOLDO (<i>Peumus boldus</i>).....	71
4. CONCLUSIONES.....	82
5. RECOMENDACIONES.....	83
6. RESUMEN.....	84
7. BIBLIOGRAFÍA.....	86
8. ANEXOS.....	96

INDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1 PARACETAMOL.....	1
FIGURA No. 2 ANATOMÍA DEL HIGADO.....	9
FIGURA No. 3 PARÉNQUINA HEPÁTICO.....	10
FIGURA No. 4 HISTOLOGÍA DEL HIGADO.....	12
FIGURA No. 5 EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PARA LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	42
FIGURA No. 6 ESQUEMA DE LAS REACCIONES A REALIZAR EN EXTRACTO ALCOHÓLICO.....	42

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No.1 BOLDO (<i>Peumus boldus</i>).....	24
FOTOGRAFÍA No.2 BOLDINA.....	26
FOTOGRAFÍA No.3 MEDICAMENTO SIMARÍN.....	29
FOTOGRAFÍA No.4 RATA (<i>Rattus norvegicus</i>).....	32
FOTOGRAFÍA No.5 ELABORACIÓN DEL EXTRACTO DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.....	96
FOTOGRAFIA No. 6 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO, ETÉREO Y ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>).LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.....	96
FOTOGRAFÍA No. 7 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD, CENIZAS TOTALES Y CENIZAS INSOLUBLES EN AGUA Y CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO CLORHÍDRICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.....	97
FOTOGRAFÍA No. 8 DETERMINACIÓN DEL INDICE DE REFRACCIÓN, pH, SÓLIDOS TOTALES DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>).LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.....	97
FOTOGRAFÍA No. 9 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>).LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.....	98
FOTOGRAFÍA No.10 GRUPOS EXPERIMENTALES DE RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>); CONTROL POSITIVO, CONTROL NEGATIVO, TRATAMIENTOS 100%, 66%, Y 33%, AMBIENTACIÓN Y CONTROL DE PESOS LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.....	98
FOTOGRAFÍA No. 11 ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>) A LAS RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>).BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	99
FOTOGRAFÍA No. 12 EXTRACCIÓN DE SANGRE DE LA PARTE OCULAR DE LAS RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	99
FOTOGRAFÍA No.13 DISECCIÓN DE LAS RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	100
FOTOGRAFÍA No. 14 EXAMEN MACROSCOPICO DEL HÍGADO DE LAS RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>).BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	100

FOTOGRAFÍA No. 15 HÍGADOS DE LAS RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>) A TRATAMIENTOS DEL 100%, 66% Y 33%, BLANCO, CONTROL POSITIVO, CONTROL NEGATIVO.....	101
FOTOGRAFIA No. 16 MUESTRA DE SANGRE DE LAS RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>) PARA LA DETERMINACIÓN DE ASAT, ALAT. LABORATORIO CLINICO LACFE RIOBAMBA. DICIEMBRE 2012.....	101
FOTOGRAFÍA No. 17 EXAMEN HISTOPATOLÓGICO DE LOS HÍGADOS DE LAS RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>). LABORATORIO HISTOPATOLÓGICO Dr. OSWALDO DUQUE ANDRADE ENERO 2013.....	102

INDICE DE TABLAS

TABLA No.1 TAXONOMÍA DEL BOLDO.....	24
TABLA No.2 COMPOSICIÓN DE LA CAPSULA DE SIMARIN.....	29
TABLA No. 3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE (<i>Rattus novergicus</i>).....	32
TABLA No. 4 GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN PARA LA COMPROBACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DEL EXTRACTO ACUOSO DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>).....	55

INDICE DE CUADROS

CUADRO Nº 1	HUMEDAD DE LA DROGA DE LAS HOJAS DE BOLDOO (<i>Peumus boldus</i>). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. OCTUBRE 2012.....	60
CUADRO Nº 2	CENIZAS TOTALES, SOLUBLES EN AGUA E INSOLUBLES EN HCl DE LA DROGA SECA DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>) LABORATORIO DE FITOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH OCTUBRE 2012.....	61
CUADRO Nº 3	TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO, ETÉREO, ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). LABORATORIO DE FITOQUIMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH OCTUBRE 2012.....	62
CUADRO Nº 4	pH DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). LABORATORIO DE FITOQUIMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH OCTUBRE 2012.....	64
CUADRO Nº 5	RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>).LABORATORIO DE FITOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH OCTUBRE 2012.....	64
CUADRO Nº 6	ÍNDICE DE REFRACCIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS OCTUBRE 2012.....	64
CUADRO Nº 7	°BRIX DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). LABORATORIO DE FITOQUIMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.....	65
CUADRO Nº 8	SÓLIDOS TOTALES DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). LABORATORIO DE FITOQUIMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH OCTUBRE 2012.....	65
CUADRO Nº 9	REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). LABORATORIO DE FITOQUIMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH OCTUBRE 2012.....	65
CUADRO Nº 10	Rf DE LA CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). LABORATORIO DE FITOQUIMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH OCTUBRE 2012.....	66
CUADRO Nº 11	VALORES DESCRIPTIVOS DEL PESO BASAL Y FINAL DE RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>) DURANTE LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH DICIEMBRE 2012.....	68

CUADRO N° 12	PRUEBA DE TUKEY PARA DETERMINAR LOS PESOS PROMEDIO EN RATAS WISTAR DEL BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS – ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	70
CUADRO N° 13	VALORES DESCRIPTIVOS DE ASAT EN RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>) CON INTOXICACIÓN HEPÁTICA PRODUCIDAS POR PARACETAMOL EN LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	71
CUADRO N° 14	PRUEBA DE TUKEY PARA LA MEDICION DE ASAT EN RATAS WISTAR DEL BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH DICIMBRE 2012.....	72
CUADRO N° 15	VALORES DESCRIPTIVOS DE ALAT EN RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>) CON INTOXICACIÓN HEPÁTICA PRODUCIDAS POR PARACETAMOL EN LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012	73
CUADRO N° 16	PRUEBA DE TUKEY PARA DETERMINAR LOS PESOS .PROMEDIO EN RATAS WISTAR.....	73
CUADRO N° 17	PORCENTAJES DE ELEVACIÓN DE TRANSAMINASAS (ASAT) EN RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>) CON INTOXICACION HEPÁTICA PRODUCIDA POR PARACETAMOL EN LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	74
CUADRO N° 18	PORCENTAJES DE ELEVACIÓN DE TRANSAMINASAS (ALAT) EN RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>) CON INTOXICACION HEPÁTICA PRODUCIDA POR PARACETAMOL EN LA INVESTIGACIÓN DEL BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	75
CUADRO N° 19	EXAMEN HISTOPATOLÓGICO A RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>) CON INTOXICACIÓN HEPÁTICA PRODUCIDA POR PARACETAMOL PARA LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012	78
CUADRO N° 20	PORCENTAJE DE DESTRUCCIÓN HEPÁTICA EN RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>) ADMINISTRADAS PARACETAMOL PARA LA INVESTIGACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DEL BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	79
CUADRO N° 21	DATOS DESCRIPTIVOS DE TRANSAMINASAS Descriptivos.....	80
CUADRO N° 22	MEDICIÓN DEL PESO BASAL Y FINAL DE RATAS WISTAR (<i>Rattus norvegicus</i>) DURANTE LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	103

CUADRO N° 23	PESO EN GRAMOS DE LAS RATAS WISTAR. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. ENERO 2013	104
CUADRO N° 23	ANOVA DEL PESO DE RATAS WISTAR. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH ENERO 2013.....	103
CUADRO N° 24	PRUEBA DE TUKEY PARA DETERMINAR LOS PESOS EN RATAS WISTAR. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. ENERO 2013.....	105
CUADRO N° 25	PRUEBA BIOQUÍMICA DE ASAT EN RATAS WISTAR (<i>Rattus norvegicus</i>) CON HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR PARACETAMOL EN LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	106
CUADRO N° 26	DATOS DESCRIPTIVOS DE TRANSAMINASAS Descriptivos.....	108
CUADRO N° 27	PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS.....	109
CUADRO N° 28	ANOVA DE UN FACTOR DE TRANSAMINASAS.....	109
CUADRO N° 29	PRUEBA DE TUKEY PARA LA MEDICIÓN ASAT DE RATAS WISTAR. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. ENERO 2013.....	110
CUADRO N° 30	PRUEBA DE TUKEY PARA MEDICIÓN DE ALAT EN RATAS WISTAR. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. ENERO 2013.....	111

INDICE DE GRAFICOS

GRAFICO N°.1 MEDICIÓN DE PESO BASAL Y FINAL DE RATAS WISTAR (<i>Rattus norvegicus</i>) DURANTE LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH DICIEMBRE 2012.....	69
GRÁFICO N°.2 PORCENTAJE DE ELEVACIÓN DE ASAT EN RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>) CON INTOXICACIÓN HEPÁTICA PRODUCIDA POR PARACETAMOL EN LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumua boldus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	75
GRÁFICO N°.3 PORCENTAJE DE ELEVACIÓN DE ALAT EN RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>) CON INTOXICACIÓN HEPÁTICA PRODUCIDA POR PARACETAMOL EN LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. ABRIL 2012.	77
GRÁFICO N°.4 PORCENTAJE DE DESTRUCCIÓN HEPÁTICA EN RATAS WISTAR (<i>Rattus norvegicus</i>) CON UNA INTOXICACIÓN HEPÁTICA PRODUCIDA POR PARACETAMOL EN LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	79

INDICE DE ANEXOS

ANEXO No.1	ELABORACIÓN DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.....	96
ANEXO No.2	TAMIZAJE FITOQUIMICO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO, ETÉREO Y ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.....	96
ANEXO No.3	DETERMINACIÓN DE HUMEDAD, CENIZAS TOTALES Y CENIZAS INSOLUBLES EN AGUA Y CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO CLORHÍDRICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.....	97
ANEXO No.4	DETERMINACIÓN DEL INDICE DE REFRACCIÓN, pH, SÓLIDOS TOTALES DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.....	97
ANEXO No.5	CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>). LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.....	98
ANEXO No.6	GRUPOS EXPERIMENTALES DE RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>); CONTROL POSITIVO, CONTROL NEGATIVO, TRATAMIENTOS 100%, 66%, Y 33%, AMBIENTACIÓN Y CONTROL DE PESOS LABORATORIO DE FITOQUÍMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	98
ANEXO No.7	ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>) A LAS RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	99
ANEXO No.8	EXTRACCIÓN DE SANGRE DE LA PARTE OCULAR DE LAS RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	99
ANEXO No.9	DISECCIÓN DE LAS RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	100
ANEXO No.10	EXAMEN MACROSCÓPICO DEL HÍGADO DE LAS RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	100
ANEXO No.11	HÍGADOS DE LAS RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>) A TRATAMIENTOS DEL 100%, 66% Y 33%, BLANCO, CONTROL POSITIVO, CONTROL NEGATIVO. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.....	101
ANEXO No.12	MUESTRA DE SANGRE DE LAS RATAS (<i>Rattus norvegicus</i>) PARA LA DETERMINACIÓN DE ASAT, ALAT. LABORATORIO CLINICO LACFERIOBAMBA. DICIEMBRE 2012.....	101

ANEXO No.13	EXAMEN HISTOPATOLÓGICO DE LOS HÍGADOS DE LAS RATAS (<i>Rattus novergicus</i>). LABORATORIO HISTOPATOLÓGICO Dr OSWALDO DUQUE ANDRADE ENERO 2013	102
ANEXO No.14	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DEL PESO BASAL Y FINAL DE RATAS WISTAR (<i>Rattus novergicus</i>) CON RESPECTO A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS APLICADOS CON EL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>) EN LOS REACTIVOS BIOLÓGICOS EN LA INVESTIGACIÓN.....	103
ANEXO No.15	TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS DE LAS TRANSAMINASAS (ASAT, ALAT) CON RESPECTO A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS APLICADOS CON EL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (<i>Peumus boldus</i>) EN LOS REACTIVOS BIOLÓGICOS EN LA INVESTIGACIÓN	107

INTRODUCCIÓN

En nuestro medio las enfermedades hepáticas representan un problema de salud a nivel mundial con importantes repercusiones, debido a la cantidad de funciones que realiza el hígado que a menudo puede ser atacado por ciertos compuestos químicos ingeridos en la dieta, diversas sustancias tóxicas (humo del cigarrillo), radiaciones electromagnéticas, ozono y algunos medicamentos (paracetamol) pueden ejercer su acción nociva en el organismo a través de la generación de radicales libres, los que pueden dañar carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, como consecuencia de ello, dañar seriamente las membranas celulares, particularmente se evidencia a través de la hepatotoxicidad. (2)

Las enfermedades hepáticas tienen una importante prevalencia en Latinoamérica, de una manera similar a lo que ocurre en el resto del mundo. (4) Según datos del Centro Latinoamericano y Caribeño de Demografía (CELADE), las enfermedades hepáticas se encuentran entre las veinte primeras causas de mortalidad, ya que por cada 10.000 habitantes se reportan 1.385 casos anuales. (27)

El Ministerio de Salud Pública en el Ecuador (2007), menciona que las enfermedades hepáticas son la novena causa de mortalidad en el país, pues afecta al 3.1% de la población ecuatoriana, mientras que en la provincia de Chimborazo, afecta al 2.2% de la población de esta localidad. (45)

Existen más de 900 drogas que se han implicado en el 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 que 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. (5)

Dentro de los xenobióticos transformados por el hígado se encuentra el acetamofén o paracetamol que utiliza la vía de conjugación con glucoronato (95%) y la conjugación con glutatión para su excreción (5%). Cuando hay un exceso de paracetamol, ambas vías se sobresaturan produciéndose en exceso del metabolito NAPQI (Nacetil- p-

benzoquinonemina), el cual se acumula fijándose por enlace covalente a aminoácidos de enzimas y otras proteínas hepáticas a las cuales inactiva; desencadenando lesiones hepáticas fundamentalmente necrosis centrolobulillar (23). En el caso de estudios de toxicidad hepática mediada por paracetamol en ratas, éste producía alteraciones a dosis medias de 200 mg/kg, generando un cuadro de necrosis hepática irreversible, el cual podía llegar a comprometer otros órganos como el riñón y corazón produciendo insuficiencia renal y alteración miocárdica respectivamente (44).

Desde 1975, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido la importancia de las medicinas tradicionales en el control de la salud y ha generado un programa orientado a la promoción de la medicina tradicional en los países desarrollados. (21)

Diversas investigaciones han descubierto compuestos que presentan efectos protectores hepáticos y cuyo uso sería fundamental en diversas patologías como las hepatopatías inducidas por fármacos, hepatopatías virales, entre otras. Dentro de éstos tenemos una amplia gama de plantas medicinales, en la que destacamos a la planta del boldo, (*Peumus boldus*), es un árbol dioico de la familia Monimiácea cuyas hojas tienen un uso medicinal. Esta planta crece en los pastos interandinos y laderas de Chile, Perú y Ecuador; además de ser cultivada en otros países (6). Las infusiones acuosas de hojas secas de boldo (*Peumus boldus*) se han utilizado por mucho tiempo como un digestivo casero y como terapia coadyuvante para las enfermedades crónicas de hígado. Entre las muchas cualidades medicinales que se le atribuye a las hojas del boldo se incluyen propiedades coleréticas y colagogas, además de ser considerado como estimulante y protector hepático frente a diversos agentes potencialmente nocivos (14).

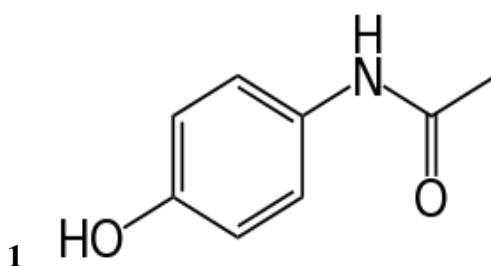
Diversos estudios demuestran los efectos colagogos y coleréticos del boldo en animales y además, se observó que la dosis toxica para una rata es de 1 g/kg de peso (3).

Mediante la realización del presente estudio en la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH, se comprobó el efecto hepatoprotector del extracto acuoso de boldo, para esto se utilizó ratas de experimentación con lesiones hepáticas inducidas por la administración de paracetamol, demostrándose que logra reducir los niveles de ASAT y ALAT en sangre y gracias a los exámenes histopatológicos se demostró cuál es la dosis efectiva, lo que permite mejorar la calidad de vida de pacientes que padecen afecciones hepáticas.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 PARACETAMOL



FUENTE: PARACETAMOL.http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Paracetamol.htm.2012-01-11

FIGURA No. 1 PARACETAMOL

El paracetamol es un analgésico para aliviar dolores musculares, articulares, menstruales, de espalda, garganta, cefaleas y combate la fiebre, aunque a diferencia de la aspirina, no posee propiedades antiinflamatorias. En dosis adecuadas no suele presentar efectos secundarios, por lo que suele recomendarse para niños. Este componente está presente en diversos medicamentos. (53)

El principio activo del paracetamol es el acetaminofén, el cual no altera la coagulación, ni la mucosa gástrica y por lo general, no produce reacciones alérgicas. No obstante, existen contraindicaciones para ciertos casos.

Una sobredosis de paracetamol puede provocar daños importantes en el hígado, incluso puede llegar a ser mortal. (53)

1.1.1. Mecanismo de acción del paracetamol

El paracetamol no es tóxico. Su toxicidad es debida a la acción del metabolito intermedio (NAPQI) generado al biotransformarse a través de la vía oxidativa hepática. A dosis

terapéuticas, el NAPQI generado se une al glutatión intracelular y a otros compuestos tiólicos formándose un conjugado atóxico.

En sobredosis, cuando la cantidad de paracetamol supera una dosis crítica (generalmente 150 mg/kg), las vías de glucuro y sulfoconjugación se saturan incrementándose la proporción de paracetamol que seguirá la vía oxidativa. Ello aumenta la velocidad y la producción de NAPQI precisándose más glutatión para neutralizarlo. (47)

Cuando las reservas de glutatión hepático descienden por debajo de un 30%, el NAPQI libre ejerce su acción tóxica sobre el hepatocito uniéndose mediante un enlace covalente al locus neutrofílico de determinadas proteínas intracelulares, pudiendo producir la muerte celular. La necrosis inicialmente se concentra en la zona III centrolobulillar ya que es aquí donde hay un mayor metabolismo oxidativo extendiéndose al restante parénquima hepático en los casos más severos.

Un mecanismo de acción similar (formación de NAPQI a través del P450 renal) se ha sugerido como causa de la necrosis tubular que ocasionalmente también acaece en esta intoxicación. (47)

Aparte de este mecanismo oxidativo, se han propuesto experimentalmente otras vías fisiopatológicas complementarias o, incluso, determinantes del daño hepático y extrahepático: formación de radicales libres, cambios isquémicos en la microcirculación, trastornos de la homeostasis cálcica, inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial. (47)

1.1.1.1. 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 (centrolobulillar), que es la de mayor concentración de CYP2E1. No hay casos reportados de daño hepático crónico por paracetamol. (46)

1.1.1.2 Contraindicaciones del paracetamol

El uso continuo de este fármaco o una sobredosis, pueden ocasionar hepatotoxicidad y nefropatía, debidas a la producción de un metabolito oxidativo en el hígado y el riñón, que ocasiona necrosis celular al unirse con proteínas que contengan azufre. La toxicidad hepática puede reducirse mediante la administración de Metionina o N-acetilcisteína, pero no ocurre lo mismo con el riñón. (29)

El paracetamol es absorbido rápidamente por el tracto digestivo, alcanzando máxima concentración plasmática luego de 30 o 60 minutos. Es metabolizado en el hígado en mayor medida y eliminado por la orina.

La eliminación normal del paracetamol se produce al cabo de 2 o 4 horas, pero en pacientes con disfunción hepática, este período aumenta considerablemente, por lo que se produce una necrosis hepática. (29)

1.1.1.3 Trastornos histopatológicos por paracetamol

El Paracetamol es un analgésico y antipirético con poca actividad antiinflamatoria, indicado para reducirla fiebre y en la analgesia temporal de dolores menores. La sobredosis aguda ocasiona lesión hepática mortal y en años recientes ha crecido en forma alarmante el número de autointoxicaciones y suicidios con dicho producto. No tiene toxicidad propia, pero al metabolizarse en el hígado genera un compuesto con alto poder tóxico (NAPQI). (63)

La dosis tóxica es de aproximadamente 150 mg/kg. Existe grave riesgo de hepatotoxicidad pasando de 300 mg/kg. Dosis repetidas con fines terapéuticos también pueden provocar toxicidad que ponga en peligro la vida del paciente. La mayor parte de la absorción de PAR ocurre en las dos primeras horas post-ingesta. Las máximas concentraciones plasmáticas se obtienen en 4 horas.

El 90% se elimina mediante metabolismo hepático por tres vías: conjugación con glucurónico, conjugación con sulfato y oxidación por sistema citocromo P50 seguido de conjugación que forma NAPQI. El antídoto es la N-acetilcisteína (NAC) que disminuye la formación de NAPQI y aumenta la sulfatación no tóxica. (63)

1.1.2 METABOLISMO HEPÁTICO DE LAS DROGAS

El cuerpo humano identifica a casi todas las drogas como agentes extraños, es decir, xenobióticos y los sujeta a un número diverso de procesos químicos y metabólicos para hacerlos de fácil descarte. Ello implica transformaciones químicas para reducir su liposolubilidad y cambiar su actividad biológica. A pesar de que casi todos los tejidos del cuerpo tienen, hasta cierto grado, capacidad de metabolizar estos productos químicos, el retículo endoplásmico del hígado es, por excelencia, el principal lugar de depuración de sustancias químicas endógenas (como el colesterol, esteroides, ácidos grasos y proteínas) así como exógenas como los fármacos. El papel central del hígado en la depuración y transformación de sustancias químicas hace que sea un órgano muy susceptible a intoxicaciones. (49)

- **Fase 1**

El metabolismo de los fármacos suele ser dividida en dos fases. La fase 1 incluye un conjunto de reacciones químicas que preparan a la droga para entrar a la fase 2. Estas reacciones incluyen reducción-oxidación, hidrólisis, hidratación y muchas otras menos frecuentes. Estos procesos aumentan la solubilidad de la droga en el agua y puede generar metabolitos que son químicamente activos y potencialmente tóxicos. (49)

- **Fase 2**

La mayoría de las reacciones químicas de la fase 2 ocurren en el citoplasma e incluyen principalmente la conjugación con compuestos endógenos por medio de enzimas transferasas. Al final de la fase 2, aquellos productos de la fase 1 que sean químicamente

activos se vuelven relativamente inertes y disponibles para su fácil eliminación del cuerpo. (49)

- **Citocromo P450**

Existe un grupo de enzimas localizadas en el retículo endoplasmático, conocidas en conjunto como el *complejo citocromo P450*, las enzimas más importantes en el metabolismo enzimático del hígado.

El citocromo P450 es el componente de las oxidasa presentes al final de la cadena de transporte de electrones. No es una sola enzima, sino una familia de unas 50 isoformas relacionadas entre sí estructuralmente, de los cuales 6 de ellos metabolizan un 90% de las drogas. Existe una gran diversidad en los genes individuales que codifican a los P450 individuales y esta heterogenicidad le permite al hígado realizar reacciones de oxidación a una enorme variedad de compuestos químicos, incluyendo a casi todas las drogas, durante la fase 1. (49)

1.2. HEPATOTOXICIDAD

La lesión directa del parénquima hepático es dosis dependiente y por tanto, predecible. Se ha asociado con la administración de diferentes fármacos, entre ellos tetraciclinas, paracetamol, metotrexate, salicilatos, ciclosporina, tacrina y fármacos citotóxicos. Estas alteraciones pueden ser graves, en función de la extensión del daño producido. (41)

Por su importancia, parece adecuado incidir en la hepatotoxicidad de alguno de los fármacos mencionados:

Paracetamol: la intoxicación por paracetamol es la segunda causa de insuficiencia hepática aguda de origen no vírico en España. Este fármaco sufre metabolismo hepático por conjugación con ácido glucurónico, ácido sulfúrico y cisteína (95%). Una pequeña parte del fármaco (5%) se N-hidroxila por la isoenzima CYP2E1 para formar N-acetil p-benzoquinoneimina (NAPQI) que interacciona con los grupos sulfhídricos del glutatión. El NAPQI es altamente hepatotóxico, y normalmente es detoxificado por el glutatión y la unión a grupos sulfhídricos. Este metabolito ejerce su toxicidad al unirse de forma covalente a macromoléculas, produciendo radicales libres que provocan una necrosis hepática en tan sólo 12 horas. (56)

Si se ingieren dosis altas de paracetamol se generan cantidades de NAPQI capaces de agotar las reservas hepáticas de glutatión. La toxicidad es mayor cuando se asocian inductores del citocromo P450, con fármacos que compiten en la conjugación del paracetamol incrementando la formación del metabolito tóxico y cuando están reducidas las reservas de glutatión (alcoholismo, malnutrición).

La dosis tóxica en adultos es de 10 g, es mortal la administración de 15 g. También se ha observado toxicidad en administración crónica de 5-8 g diarios durante varias semanas. La toxicidad por paracetamol se manifiesta con síntomas inespecíficos durante las primeras 24 horas, el paciente puede presentar malestar general, náuseas, dolor abdominal, vómitos y sudoración; hasta las 72 horas la sintomatología puede mejorar, pero comienzan a elevarse las transaminasas hepáticas. (56)

Alrededor del tercer o cuarto día se produce el máximo daño hepático, pudiendo presentarse diátesis hemorrágica, encefalopatía, convulsiones, hipoglucemia, e insuficiencia hepática, que con frecuencia tienen un desenlace fatal. Si el paciente supera los primeros siete días, se produce una recuperación clínica, que se manifiesta por el descenso de los niveles enzimáticos que pueden tardar en normalizarse unas tres semanas.

Inicialmente, en las primeras 24 horas la administración de N-acetilcisteína previene la lesión hepática, pero el riesgo de desarrollar una lesión irreversible se incrementa a medida que se retrasa la administración de este antídoto. (56)

1.2.1 CLASIFICACIÓN DE HEPATOTOXICIDAD

Se distinguen dos tipos diferentes de hepatotoxicidad:

a) Aquella que es intrínseca al xenobiótico mismo. Se trata de un mecanismo predecible, dosis dependiente y reproducible en el animal de experimentación.

Un ejemplo de ésta es el daño por consumo de paracetamol en dosis elevadas: cualquier persona que ingiera más de 10 gr/d de la droga en una sola dosis presentará una hepatitis grave, con insuficiencia hepática severa que llevará a la muerte en un alto % de los casos.

(31)

b) Por idiosincrasia. Depende básicamente del huésped y por tanto no es predecible, no depende de la dosis y en el animal sólo se reproduce aleatoriamente. Este tipo de alteración, con frecuencia provoca además reacciones de hipersensibilidad ajenas al hígado. Este daño es el más común y es lo que frecuentemente se conoce como reacción de hipersensibilidad. La exposición a la droga conlleva una reacción que puede ser cada vez más intensa, debido a que los anticuerpos se forman más rápidamente y en mayor cantidad al ser nuevamente expuesta la persona al estímulo en cuestión. (30)

1.2.3 COMPUESTOS HEPATOTÓXICOS

1.2.3.1 Fármacos asociados a la toxicidad hepática:

1. Bebidas alcohólicas, ron, whisky, sake, vodka, etc.
2. Amiodarona (Cordarone), arritmia cardíaca
3. Azatioprina (Imuran), artritis reumatoide
4. Carbamazapina (Tegretol), ataques epilépticos
5. Clorpromazina (Thorazine), antipsicótico
6. Ciclofosfamida (Cytosan), quimioterapia contra el cáncer
7. Diclofenac (Voltarén), artritis
8. Diltiazem (Cardizem), angina de pecho e hipertensión arterial
9. Felbamato (Felbatol), ataques epilépticos
10. Ketoconazola (Nizoral), infecciones por hongos
11. Metotrexato (Rheumatrex), artritis, quimioterapia contra el cáncer
12. Metildopa (Aldomet), hipertensión arterial
13. Nitrofurantoína (Macrofantin), infecciones urinarias
14. Pemolina (Cylert), déficit atencional
15. Fenitoína (Dilatol), ataques epilépticos
16. Tacrina (Cognex), enfermedad de Alzheimer
17. Ticlopidina (Ticlid), anticoagulante sanguíneo, previene los infartos cerebrales
18. Tolcapona (Tasmar), enfermedad de Parkinson
19. Ácido valproico, ataques epilépticos
20. Zafirlukast (Accolate), asma
21. zileuton (Zyflo), asma (30)

1.2.3.2 Algunos complementos nutricionales asociados a la toxicidad hepática:

1. Hierro
2. Niacina en dosis elevadas
3. Vitamina A en dosis elevadas (30)

1.2.3.3 Factores de riesgo para daño hepático inducido por fármacos

Entre los factores de riesgo que se consideran como favorecedores de esta reacción clínica se describen: factores genéticos; relacionados con la edad; uso de medicamentos concomitantes; y otros, que afectan la citoprotección por glutatión.

Entre los factores genéticos está el polimorfismo del citocromo P-450, que está codificado por alrededor de 300 genes, lo que determina que diferentes individuos puedan presentar diferente expresión de la actividad del citocromo P-450; y el sistema de la N-acetiltransferasa 2, que también está codificado genéticamente y que determina que existan individuos acetiladores lentos e individuos acetiladores rápidos, lo que va a dar origen a expresiones clínicas variables. (30)

En cuanto a la edad, curiosamente los niños pequeños son más resistentes a la hepatotoxicidad por paracetamol, que se presenta con mayor frecuencia en la población adolescente o adulta, por lo general por intento de suicidio. (30)

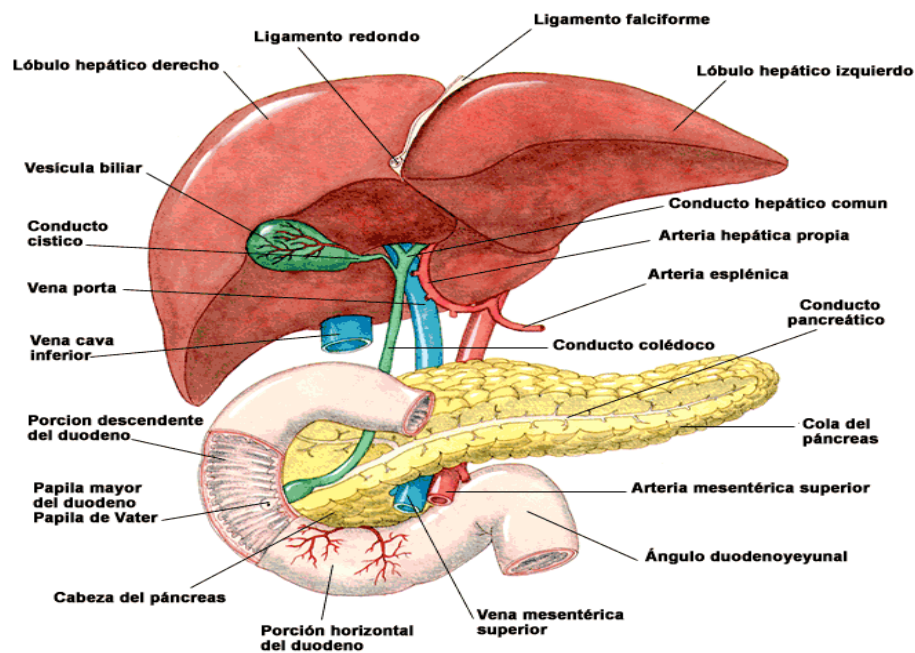
1.2.4 MECANISMO DE DAÑO HEPÁTICO

Cada vez se reconoce más la serie de factores agresivos que inician las lesiones hepáticas: virus, agentes tóxicos incluyendo alcohol, auto antígenos, sobrecarga de hierro y cobre, hipoxia, endotoxinas. El hígado reacciona a la agresión por rutas muy estandarizadas, no obstante que cada etiología conferirá características específicas. Los agentes nocivos se dirigen inicial y preferentemente a un tipo de células, principalmente a células epiteliales (es decir, hepatocitos y células del conducto biliar). Sin embargo, la respuesta con frecuencia también implica las demás células que residen en el hígado (células de Kupffer, células estelares, células endoteliales e inflamatorias) así como otras células que provienen del exterior. Estas células individuales actúan como células intermediarias o efectoras mediante la producción de moléculas reactivas como citocinas,

quimiocinas, eicosanoides, especies reactivas al oxígeno. Los mecanismos de regulación son complejos pero implican una estrecha interacción entre tipos de células por medio de mecanismos autocrinos y paracrinos altamente regulados. (49)

Entre los procesos patogénicos más característicos están la muerte de células hepáticas, regeneración de hepatocitos, inflamación y fibrosis. Aunque la muerte celular, inflamación y fibrosis son procesos reactivos comunes a la agresión en cualquier órgano, el hígado difiere por su tremenda capacidad de regeneración. Cuando el agente agresivo ha sido eliminado, se lleva a cabo un mecanismo estrictamente regulado que permite la rápida eliminación y reemplazo de las células hepáticas dañadas. Cuando el agente nocivo no puede ser eliminado, se desarrolla un proceso inflamatorio crónico. En este contexto, el efecto final es el depósito del componente de la matriz extracelular (tejido fibroso) que afectará la arquitectura del hígado. (49)

1.3. HÍGADO



FUENTE: ANATOMIA DEL HIGADO <http://www.saludalia.com/analisis-clinicos/transaminasas.2013-01-02>

FIGURA No.2 ANATOMÍA DEL HÍGADO

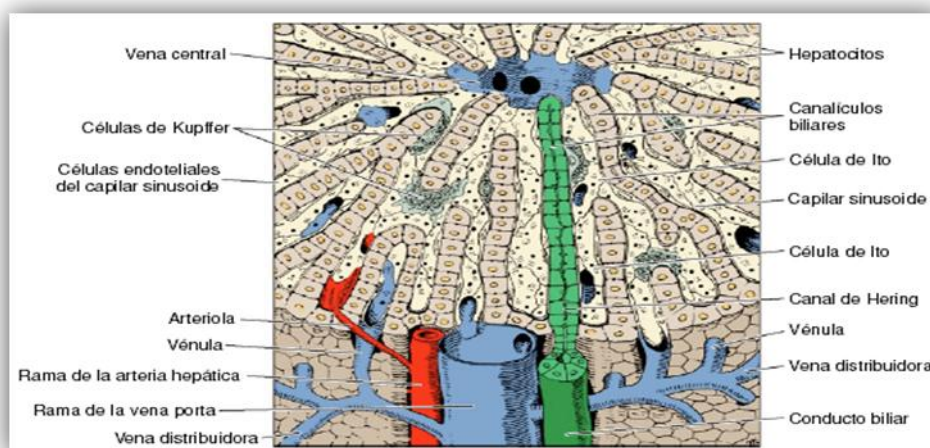
1.3.1 ANATOMÍA HEPÁTICA

1.3.1.1 Situación

El hígado es el más grande de los órganos internos del cuerpo humano. En su estado adulto pesa aproximadamente kilo y medio. Es cuatro a cinco veces más grande que el corazón y se aloja en la parte superior de la cavidad abdominal. Se encuentra a la derecha del abdomen, debajo del diafragma, y cubierto parcialmente por las costillas. (60)

1.3.2 HISTOLOGÍA HEPÁTICA.

El hígado es una glándula tubulosa compuesta, su parénquima se deriva del endodermo por brotes del epitelio a nivel del duodeno y está estructurada para cumplir con numerosas funciones tanto metabólicas como endocrinas y exocrinas, tales como, secreción de bilis, almacenamiento de vitamina A, lípidos, vitaminas del complejo B, y glucógeno, síntesis de fibrinógeno, globulinas, albúminas y protrombina, además tiene función defensiva por la fagocitosis y detoxicación, función de conjugación de sustancias como las hormonas esteroideas, esterificación (ácidos grasos libres a triglicéridos), metabolismo de las proteínas, carbohidratos, grasas, hemoglobina y fármacos, también se le atribuyen función hematopoyética durante la etapa fetal y potencialmente en el adulto. Su estructura de base se corresponde con los órganos parenquimatosos. (42)



FUENTE: HISTOLOGÍA HEPÁTICA. http://www.slideshare.net/alexi_aldebaran/histologa-heptica2012-12-27

FIGURA No. 3 PARÉNQUIMA HEPÁTICO

1.3.2.1. Estroma:

Es la red tridimensional de transporte de los hepatocitos, está constituido por una malla tridimensional de fibras de reticulina en las que se enganchan, en forma de láminas, los hepatocitos (parénquima hepático en disposición laminar irradiando desde las venas centrolobulillares hacia los espacios porta). Igualmente formado por una serie de tabiques interlobulillares (41)

1.3.2.2. Parénquima hepático:

Representado por innumerables lobulillos hepáticos sus células más abundantes son los hepatocitos que se organizan en lobulillos, además de otros tipos celulares formando los sinusoides hepáticos ó vide infra llamadas células del sinusoides (Küppfer, Pit, Ito y endoteliales). (9)

Lobulillos: Organización hexagonal con tríadas portales en los vértices y en el centro una vena central. (9)

Hepatocitos: son células hexagonales con tres tipos de bordes: *a) sinusoidal* que delinear los bordes del sinusoides y forman con las células endoteliales el espacio de DISSE , *b) hepatocitario* (se adosan con otros hepatocitos para formar las láminas hepatocitarias) y *c) biliar* (entre estas caras se forman los canalículos biliares). Los hepatocitos tienen todos los organelos de una célula normal. (9)

Sinusoides hepáticos: Son espacios vasculares delimitados por hileras de hepatocitos. Tipos de células: *a) endoteliales* con membrana basal fenestrada, *b) macrófagos (Kupffer)*, *c) Estelares* que almacenan grasa y vit.A, *d) neutrófilos*, *e) escasas células linfoides del tipo NK ó foveadas y células Tgama delta.* (9)

Lobulillo hepático clasico ó común: Los hepatocitos se organizan en láminas hepatocitarias que delimitan a los sinusoides. Las láminas parten de la vena central hacia los vértices de una figura hexagonal (espacios porta), la sangre (se fusionan en los sinusoides) de la vena porta y la arteria hepática circula centripetamente en los sinusoides hacia la vena central, de ahí va a las venas suprahepáticas vena cava inferior corazón. (12)

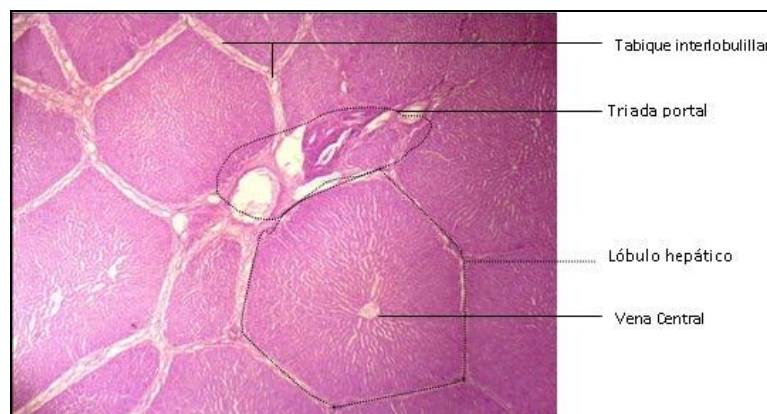
Lobulillo Portal: área triangular que está entre tres venas centrales y la bilis fluye de la periferia hacia el centro del espacio porta hacia el conductillo biliar. (12)

Acino hepático (de rappaport). Área romboidal de hepatocitos cuyo centro es una arteria hep y vena porta y los extremos son dos venas centrales, la sangre circula centrífugamente (del centro a la periferia). (12)

1.3.2.3. Espacio porta o de Kiernan:

Los lobulillos clásicos se encuentran delimitados por tejido conjuntivo procedente de la cápsula, en los lugares donde confluyen los extremos aguzados de los lobulillos podemos observar una zona que se denomina espacio porta (puerta de entrada), donde pueden observarse las siguientes estructuras:

- Rama de la vena porta
- Rama de la arteria hepática
- Conductillo biliar
- Vaso linfático(18)



FUENTE: HÍGADO. <http://www.google.com.ec/imgres?q=histolog%C3%ADa+del+h%C3%ADgado&hl>

FIGURA No. 4 HISTOLOGÍA DEL HÍGADO

1.3.3 FISIOLOGÍA DEL HÍGADO

El hígado tiene una posición estratégica en la circulación; es el primer órgano que contacta la sangre proveniente del intestino. Esto no sólo implica que la superficie

hepática absorba nutrientes, toxinas y microorganismos derivados del intestino, sino que también sugiere el papel hepático en la secreción de compuestos en la luz intestinal.

Podemos precisar entonces que a este órgano le atañen tres tipos de funciones básicas que son:

1. Funciones vasculares (almacenamiento y filtración)
2. Funciones metabólicas
3. Funciones secretoras y excretoras encargadas de formar bilis. (39)

1. Funciones vasculares.

Las características vasculares del hígado, hacen posible que el mismo se comporte como un reservorio importante de sangre y además, que actúe como un filtro para la sangre procedente del intestino. (11)

- Función de almacenamiento.

El sistema vascular hepático funciona ofreciendo muy baja resistencia al flujo de sangre, especialmente cuando consideramos que 1,45 litro de sangre sigue este camino cada minuto. No obstante, hay ocasiones en que la resistencia al flujo de sangre por el hígado se incrementa, como ocurre en la cirrosis hepática, trastorno éste que se caracteriza por el desarrollo de tejido fibroso en la estructura hepática que da lugar a la destrucción de células parenquimatosas y a estrechamiento de los sinusoides por constricción fibrótica o incluso por bloqueo o destrucción total. Este trastorno aparece como consecuencia de alcoholismo. También es secundario a afecciones virales hepáticas y a procesos infecciosos de los conductos biliares. (11)

Entre otras características vasculares, el hecho de que el hígado sea un órgano grande, venoso, con gran capacitancia, le permite formar parte de los grandes reservorios de sangre del organismo; ya que es capaz de almacenar el 10% del volumen total de sangre; de modo que puede albergar hasta un litro de sangre en casos en los que la volemia se vuelve excesiva y también le permite suplir sangre extra cuando la volemia disminuye. (11)

- *Función de filtración.*

Las superficies internas de todos los sinusoides hepáticos están cubiertas por un elevado número de células de Kupffer o macrófagos residentes en el hígado, cuya función consiste en fagocitar parásitos, virus, bacterias y macromoléculas (como inmuno complejos y endotoxinas bacterianas) por endocitosis mediada por receptores. Por tanto, estas células constituyen una poderosa e importante barrera fagocítica para toxinas y microorganismos provenientes del intestino, de modo que cuando la sangre portal es derivada del hígado por anastomosis porto-cava, como ocurre en pacientes con cirrosis, se desarrolla endotoxemia sistémica. (14)

La activación de las células de Kupffer resulta en un incremento de la producción de citoquinas cuyas señales actúan sobre otros tipos de células hepáticas. Las células de Kupffer tienen un importante papel en el procesamiento de antígenos durante la infección y la inflamación, iniciando la inmunidad mediada por células B y T.

Además de las células de Kupffer, las células de PIT, que son células perisinusoidales equivalentes a grandes linfocitos granulares y células asesinas; tienen funciones similares y brindan protección contra infecciones virales. (14)

2. Funciones metabólicas.

Las funciones metabólicas hepáticas son llevadas a cabo por los hepatocitos, o sea por las células parenquimatosas, en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas específicamente. (17)

- *Metabolismo de los carbohidratos.*

Las funciones específicas del hígado en el metabolismo de los carbohidratos son:

1. Almacenamiento de glucógeno.
2. Conversión de galactosa y fructosa a glucosa.
3. Gluconeogénesis.
4. Formación de compuestos químicos importantes a partir de productos intermedios del metabolismo de los carbohidratos. El hígado es un órgano de particular importancia en el mantenimiento de concentraciones normales de glucosa en sangre. Cuando la concentración de glucosa se incrementa por encima de los valores normales, el exceso es removido por la vía de la síntesis de glucógeno, glicólisis y lipogénesis. Cuando se

produce un déficit de glucosa en sangre, el hígado la libera por la vía de la glucógenolisis y gluconeogénesis. (17)

Entre los principales factores controladores de los cambios reversibles entre glucógenolisis/gluconeogénesis en la etapa post-absortiva a síntesis de glucógeno y glicólisis durante la absorción se encuentran: (17)

1. Concentración de sustratos.
2. Niveles de hormonas.
3. Estado de hidratación hepatocelular.
4. Inervación hepática.
5. Heterogeneidad zonal de los hepatocitos.

- *Metabolismo de los lípidos.*

Aunque el metabolismo de las grasas puede ocurrir en casi todas las células, algunos aspectos del mismo se producen con mayor rapidez en el hígado que en las demás células.

Las funciones específicas del hígado en el metabolismo de los lípidos son las siguientes:

1. Un porcentaje elevado de beta-oxidación de ácidos grasos y formación de ácido acetoacético.
2. Formación de la mayor parte de las lipoproteínas.
3. Formación de cantidades considerables de colesterol y fosfolípidos.
4. Conversión de grandes cantidades de carbohidratos y proteínas en grasas. (17)

- *Metabolismo proteínico.*

A pesar de que gran parte de los procesos metabólicos de carbohidratos y grasas ocurren en el hígado, el cuerpo probablemente pudiera prescindir de tales funciones hepáticas y sobrevivir. (17)

Las funciones más importantes del hígado en dicho metabolismo son:

1. Desaminación de aminoácidos.
2. Formación de urea para suprimir el amoníaco de los líquidos corporales.
3. Formación de aproximadamente el 90% de todas las proteínas plasmáticas.

4. Interconversiones entre los diferentes aminoácidos y otros compuestos importantes para los procesos metabólicos de la economía. (17)

3. Funciones excretoras y secretoras encargadas de formar bilis.

Una de las tantas funciones hepáticas es la formación y secreción de bilis. La bilis es una secreción acuosa que posee componentes orgánicos e inorgánicos cuya osmolaridad es semejante a la del plasma y normalmente un humano adulto secreta entre 600 y 1200 ml diarios. (19)

El hígado secreta bilis en dos etapas, en la etapa inicial los hepatocitos producen una secreción que contiene grandes cantidades de ácidos biliares, colesterol y otros constituyentes orgánicos que se vierten al canalículo biliar, de ahí fluye a conductos biliares terminales continuando por conductos biliares de tamaño progresivamente mayor, y finalmente hacia el conducto hepático y el colédoco, desde el cual se vacía directamente al duodeno o se desvía por el conducto cístico hacia la vesícula biliar. En el curso que sigue la bilis por estos conductos se produce la segunda etapa de la secreción, en la cual se añade una secreción adicional que consiste en una solución acuosa de sodio y bicarbonato secretada por las células epiteliales del sistema de drenaje biliar. (19)

1.4. ENFERMEDADES HEPÁTICAS

La importancia de las enfermedades hepáticas está aumentando cada vez más en nuestra sociedad. Una de las razones para ello es que muchas de ellas, como es la hepatitis, pero también las enfermedades hepáticas colestásicas, tienen carácter crónico y, al final, desembocan en una cirrosis hepática. Además, los pacientes se enfrentan a complicaciones que limitan considerablemente sus capacidades físicas e intelectuales, como ocurre con la llamada encefalopatía hepática. Por lo tanto, es preciso utilizar todas las posibilidades terapéuticas posibles para evitar la necesidad de tener que recurrir a un trasplante de hígado. (36)

Las enfermedades hepáticas pueden manifestarse de formas muy diversas. Los síntomas particularmente importantes incluyen la ictericia, la colestasis, el aumento de volumen del hígado, la hipertensión portal, la ascitis, la encefalopatía hepática y la insuficiencia hepática. (41)

Ictericia La ictericia se refiere al color amarillo que toma la piel debido al aumento de la bilirrubina en la sangre. La ictericia es uno de los síntomas más clásicos de las enfermedades del hígado y se manifiesta cuando la bilirrubina en la sangre aumenta sobre 2 a 3 mg/dL (el valor normal es inferior a 1). (36)

Colestasis Es cualquier afección en la que se reduce o obstruye el flujo de la bilis del hígado.

Aumento de tamaño del hígado El aumento de volumen del hígado (hepatomegalia) es un indicador de enfermedad hepática. Sin embargo, mucha gente que padece una enfermedad hepática tiene un hígado de tamaño normal o incluso más pequeño. Un hígado aumentado de volumen no produce síntomas, pero si el aumento de volumen es excesivo puede causar malestar abdominal o una sensación de saciedad. Si el crecimiento se produce de forma repentina, el hígado duele al tacto. (36)

Hipertensión portal se define como una presión arterial anormalmente alta en la vena porta, una vena de gran calibre que lleva la sangre desde el intestino al hígado. (36)

Encefalopatía hepática (también denominada encefalopatía del sistema porta, o coma hepático) es un trastorno por el cual la función cerebral se deteriora debido al aumento en la sangre de sustancias tóxicas que el hígado hubiera eliminado en situación normal. (36)

Insuficiencia hepática se define como un grave deterioro de la función del hígado. Aparece como consecuencia de cualquier tipo de trastorno del hígado, tales como la hepatitis vírica, la cirrosis, así como las lesiones producidas por el alcohol o por medicamentos como el paracetamol (acetaminofén). Para que se presente una insuficiencia hepática, gran parte del hígado debe estar lesionado. (36)

Cirrosis hepática: es la presencia de tejido fibroso en lugar de las células hepáticas muertas. (36)

El síndrome de Budd-Chiari: Tiene el síntoma de obstrucción de la vena hepática.

Enfermedad del hígado inducida por fármacos: Es la enfermedad del hígado causada por la ingesta de medicamentos farmacológicos. (3)

Una gran mayoría de las afecciones del hígado (dolor de hígado, insuficiencia hepática, cirrosis, cólicos, litiasis, colecistitis, etc.) se originan por los errores de la alimentación. Los abusos digestivos y la ingestión de alimentos perjudiciales para el hígado como las grasas, embutidos, salazones, etc., y de modo muy especial el uso o abuso de bebidas alcohólicas tienen un papel fundamental en su origen, perturbando las funciones hepáticas y fatigando el hígado, que acaba por enfermar.(3)

El daño en el hígado puede ser de tipo agudo, el cual generalmente no deja secuelas, o bien un daño crónico progresivo que inicia con inflamación, posteriormente fibrosis, y puede llegar a la cirrosis y hasta hepatocarcinoma; esto sucede de forma muy lenta – generalmente varios años– sin que el paciente presente síntomas que indiquen un daño hepático. (3)

Las enfermedades del hígado deben ser tratadas, a ser posible, desde su comienzo, antes de que, descuidándolas, se acentúen o agraven las alteraciones funcionales u orgánicas existentes. Por lo tanto, debe prestarse atención a los síntomas iniciales de insuficiencia hepática, malas digestiones, cefaleas, propensión biliosa, molestias o dolor de hígado, picores de la piel, propensión a padecer infecciones o a infectarse las heridas, etc., que pueden ser aviso para el paciente de que necesita un buen chequeo médico.(3)

1.5 PERFIL HEPÁTICO

Las pruebas clínicas o de laboratorio son eficaces para el diagnóstico de la actividad del hígado, entre los exámenes de sangre realizados más comúnmente se incluyen los siguientes:

1.5.1 Examen de bilirrubina sérica.

Este examen mide los niveles de bilirrubina en la sangre. La bilirrubina es producida por el hígado y es excretada en la bilis. Los niveles elevados de bilirrubina a menudo indican una obstrucción del flujo biliar o un problema en el procesamiento de la bilis por parte del hígado. (51)

1.5.2 Examen de albúmina sérica.

Este examen se usa para medir el nivel de albúmina (una proteína presente en la sangre) y contribuye al diagnóstico de la enfermedad del hígado. (55)

1.5.3 Examen de fosfatasa alcalina sérica.

Este examen se usa para medir el nivel de fosfatasa alcalina (una enzima) en la sangre. La fosfatasa alcalina se encuentra en muchos tejidos, con una mayor concentración en el hígado, el tracto biliar y los huesos. Este examen puede realizarse para evaluar el funcionamiento del hígado y para detectar lesiones del hígado que pueden causar obstrucción biliar, como tumores o abscesos. (55)

1.5.4 Aminotransferasas séricas (transaminasas).

Esta enzima se libera de las células dañadas del hígado. (55)

1.5.5 Examen de tiempo de protrombina (su sigla en inglés es PTT).

El examen de tiempo de protrombina mide el tiempo que tarda la sangre para coagular. La coagulación de la sangre requiere vitamina K y una proteína fabricada por el hígado. La demora en la coagulación puede ser un indicador de enfermedad del hígado o de otras deficiencias de los factores de coagulación específicos. (55)

1.5.6 Examen de alanina transaminasa (su sigla en inglés es ALT).

Este examen mide el nivel de alaninaaminotransferasa (una enzima hallada predominantemente en el hígado) que se libera al torrente sanguíneo como consecuencia de un daño celular agudo del hígado. Este examen puede realizarse para evaluar la función del hígado y, o para evaluar el tratamiento de una enfermedad aguda del hígado, como la hepatitis. (55)

1.5.7 Examen de aspartato transaminasa (su sigla en inglés es AST).

Este examen mide el nivel de aspartato transaminasa (una enzima que se encuentra en el hígado, riñones, páncreas, corazón, sistema músculo esquelético y glóbulos rojos) que se libera al torrente sanguíneo cuando existen problemas en el hígado o el corazón. (55)

1.5.8 Examen de gamma-glutamyltranspeptidasa.

Este examen mide el nivel de gamma-glutamyltranspeptidasa (una enzima que se produce en el hígado, el páncreas y el tracto biliar). Este examen suele realizarse para evaluar la función del hígado, obtener información acerca de las enfermedades del hígado y detectar la ingestión de alcohol. (55)

1.5.9 Examen de lactato deshidrogenasa.

Este examen detecta el daño tisular y contribuye al diagnóstico de las enfermedades del hígado. El lactato deshidrogenasa es un tipo de proteína (también llamada isoenzima) que participa en los procesos metabólicos del organismo. (55)

1.6 TRANSAMINASAS HEPÁTICAS

Las transaminasas son enzimas. 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:

- GOT: Transaminasa glutamicooxalacética. Está presente en casi todos los órganos, dentro de las células, y que cuando se encuentra en sangre en niveles muy elevados significa que ha habido destrucción celular.
- GPT: Transaminasa glutamicopirúvica. Se localiza principalmente en el hígado y su misión es la fabricación de glucosa. (62)

1.6.1 Niveles normales de transaminasas

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

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

Cuando realizamos un análisis de sangre la proporción que nos encontramos de GOT en relación con GPT es: GOT / GPT: 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. (51)

1.6.2 Aumento de transaminasas

Las más frecuentes son las:

Enfermedades del hígado: Destacan las hepatitis, el excesivo consumo de alcohol, cirrosis y todas aquellas enfermedades en las que se depositan sustancias en el hígado de forma excesiva, como la grasa (esteatosis hepática o hígado graso).

Enfermedades del páncreas: Cuando se inflama el páncreas, ya sea por el alcohol o por infecciones víricas, se produce también un aumento de las transaminasas.

Enfermedades del corazón: Es muy frecuente la elevación de las transaminasas en el infarto agudo de miocardio y en la insuficiencia cardíaca aguda.

Alteraciones musculares: Sobre todo, cuando hay destrucción de nuestros músculos por quemaduras, ejercicio excesivo etc.

Podríamos enumerar más causas de elevación de transaminasas pero las anteriores son las más frecuentes y sería excesivo añadir una lista de 20 enfermedades más y encima poco frecuentes que producen un aumento de estas enzimas. (7)

1.6.3 Nivel de transaminasas en sangre

Los niveles de Transaminasas en sangre se utilizan como indicador para detectar posibles patologías en las funciones del hígado.

Tanto la AST y ALT están presentes en el suero en concentraciones inferiores a 30-40 U/l, pero si el hígado está dañado, la permeabilidad de la membrana celular aumenta y estas enzimas son liberadas a la sangre en grandes cantidades, hecho que no siempre requiere la necrosis de los hepatocitos. De hecho, hay escasa correlación entre el daño celular hepático y el grado de elevación de las transaminasas. (51)

Así pues, en la mayoría de tipos de enfermedad hepática, la actividad de la ALT es mayor que la de la AST. La hepatitis alcohólica es una excepción a esta regla ya que el alcohol incrementa la actividad de la AST en el plasma, al contrario que otras formas de hepatitis; la mayoría de formas de daño hepático hacen disminuir la actividad hepatocitaria de ambas formas de la AST mientras que el alcohol sólo reduce la actividad citosólica. En los alcohólicos es común la deficiencia en piridoxina, que reduce la

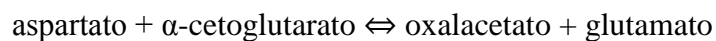
actividad de la AST y, finalmente, el alcohol induce la liberación de la AST mitocondrial a partir de células sin daño celular visible. (51)

1.6.4 PAPEL DE LAS AMINOTRANSFERASAS EN EL METABOLISMO

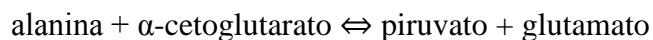
Los humanos ingerimos nitrógeno a partir de aminoácidos de la dieta, proteínas y amoníaco fijado por las nitrogenasas de las bacterias del intestino, el glutamato deshidrogenasa. La glutamina sintasa convierten el amoníaco a glutamato y glutamina respectivamente, de los cuales las transaminasas transfieren sus grupos amino y amido a otros esqueletos de carbono por reacciones de transaminación y transamidación. (52)

La reacción de transaminación tiene lugar en el citosol y en las mitocondrias. Al ser reversibles, se pueden utilizar los α -cetoácidos para la síntesis de aminoácidos; por ejemplo, si los alimentos contienen los α -cetoácidos que corresponden a los esqueletos de carbono de los aminoácidos esenciales podrán sintetizarse estos aminoácidos con una simple transaminación, catalizada por la aminotransferasa correspondiente. El sentido de la reacción lo determinan las concentraciones de productos y reactivos en el hígado porque en éste los metabolitos están próximos al equilibrio. (52)

- La GOT cataliza la reacción hacia la formación de oxaloacetato:



- La GTP cataliza otra reacción, hacia la formación de piruvato:



La GPT tiene una gran importancia en la catálisis de reacciones que transfieren carbono y nitrógeno del músculo esquelético al hígado en forma de alanina. Primero, en el músculo esquelético, el piruvato actúa como receptor de un grupo amino y se transforma en alanina, que se transporta a través del torrente sanguíneo hasta el hígado, donde la alanina aminotransferasa (ALT) transfiere el grupo amino al α -cetoglutarato, regenerando así el piruvato que puede incorporarse a la gluconeogénesis como fuente de carbono; la glucosa resultante podrá pasar de nuevo al músculo. Este proceso se conoce como el ciclo de la glucosa-alanina y permite la eliminación del nitrógeno del músculo esquelético en forma de urea, transformación que se dará gracias al ciclo de la urea. (52)

1.6.5. ENFERMEDADES CAUSAN NIVELES DE TRANSAMINASAS ANORMALES

Son encontrados niveles más altos de TGO y TGP en desordenes que causan la muerte de numerosas células (necrosis hepática extensa). Esto acontece en las hepatitis agudas A y B, en el daño pronunciado infligido por toxinas como la de una Sobredosis de acetaminofen o cuando el hígado es privado de sangre fresca que trae oxígeno y nutrientes. Las transaminasas en estas situaciones pueden variar de diez veces los límites superiores a lo normal para millares de unidades por mililitro. Moderadas elevaciones de las transaminasas son comunes. Ellas son encontradas frecuentemente en pruebas de sangre de rutina en individuos saludables. La causa más común de moderadas elevaciones de estas enzimas es el hígado graso (esteatosis). La causa más frecuente de hígado graso es el abuso de alcohol. Otras causas de hígado graso pueden ser la diabetes y la obesidad. La hepatitis C también está se tornando una causa importante de elevaciones de las transaminasas. (37)

1.6.6. VALORES NORMALES DE LAS ENZIMAS HEPÁTICAS EN LAS RATAS

GÉNERO	VALORES NORMALES	
	ASAT (u/L)	ALAT (u/L)
<i>Rattus novergicus</i>	32-92	17-50

Fuente: http://scielo.sid.cu/scielo.php?pid=S1028-47962006005&script=sci_arttext20120308.2013-01-09

Los valores normales de estas enzimas hepáticas están dados en las ratas en condiciones normales, libres de cualquier situación de estrés. (65)

1.7 BOLDO (*Peumus boldus*)

1.7.1 TAXONOMÍA



FUENTE: BOLDO <http://www.arbolesornamentales.es/Peumusboldus.htm> 2013-01-10

FOTOGRAFÍA No. 1 BOLDO (*Peumus boldus*).

TABLA No1. Resumen taxonómico para boldo

Taxonomía	Pertenencia
División	Fanerógamas
Subdivisión	Angiospermas
Clase	Dicotiledoneas
Subclase	Dialypetas
Orden	Laurales
Familia	Monimiáceae
Género	Peumus

FUENTE: TAXONOMÍA DE BOLDO. http://www.florachilena.cl/Niv_tax/Angiospermas/Ordenes/Laurales/Monimiaceae/Boldo/Boldo.htm 2013-01 13

1.7.2 ETIMOLOGÍA

Peumus, latinización de su nombre nativo chileno. *Boldus*, latinización de otro nombre nativo chileno. (38)

1.7.3 DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT

Boldo representa un género monotípico y endémico de Chile y crece desde Limarí hasta Osorno (IV a X región), entre los 5-1.000m s.n.m. Habita en suelos poco profundos, generalmente pedregosos. Especie frecuente en los Tipos Forestales; Esclerófilo, Roble-Hualo, Roble-Raulí-Coihue, Ciprés de la Cordillera y Palma Chilena. (32)

1.7.4 DESCRIPCIÓN

Árbol siempre verde, dioico que alcanza una altura de hasta 30m y un diámetro superior a 1m, corteza delgada y rugosa de color pardo. Hojas opuestas, aromáticas, de forma ovalado-elípticas con el margen entero y revuelto, haz de color verde oscuro con glándulas prominentes que le dan una textura áspera al tacto, envés glauco y piloso, nervadura muy notoria. (32)

1.7.5 PROPIEDADES BIOLÓGICAS

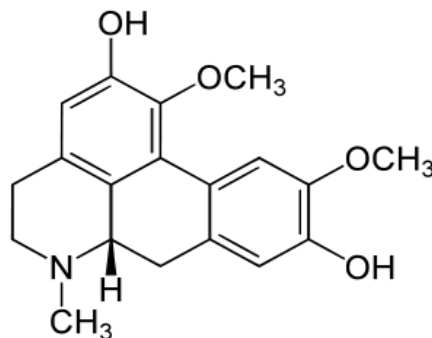
Se han aislado hasta 20 alcaloides, considerados los principios activos de las hojas del boldo, entre los que destaca la boldina (abundante también en la corteza del arbusto). Contiene aceite esencial, flavonoides y taninos. Todas estas sustancias confieren la acción digestiva y protectora hepática, tan eficaz a las hojas de boldo. La boldina, por su parte, sobresale por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y fungicidas, y en parte le da el sabor amargo característico a la planta e intensa fragancia, que puede transmitir a la orina si se toma durante un tiempo prolongado. (56)

Dado el contenido en sustancias con acción aperitiva, colerética y colagoga, el empleo de hojas de boldo se usa con notable eficacia para tratar dispepsias, trastornos gastrointestinales leves (flatulencia, aerofagia) y disfunciones hepatobiliares menores como insuficiencia hepática (hígado y vesícula perezosos), hepatitis, estreñimiento y migrañas provocadas por malas digestiones.

El consumo de boldo estimula la producción de bilis (puede duplicar el flujo de la bilis) y la salida del fluido desde la vesícula, lo cual favorece la digestión y combate los síntomas derivados de un mal funcionamiento del hígado o de la vesícula (flatulencia y espasmos intestinales).

No obstante, a pesar de que los preparados de boldo son beneficiosos para conseguir una buena función hepática, no hay que abusar de su ingestión ni tomarlo sin prescripción o supervisión médica. Conviene que el tratamiento con boldo no supere las cuatro semanas y no se superen las dosis recomendadas, pues se han observado casos de intoxicación. (56)

1.7.6 .COMPOSICIÓN QUÍMICA



FUENTE: ESTRUCTURA MOLECULAR DE BOLDINA. [Http://es.wikipedia.org/wiki/Boldina](http://es.wikipedia.org/wiki/Boldina) 2013-01-15

FOTOGRAFÍA No 2 BOLDINA (PRINCIPIO ACTIVO DE *Peumus boldus*)

Peumus boldus, contiene dentro de su **composición** el alcaloide llamado **boldina**. Esta sustancia estimula la secreción biliar y la producción de jugos gástricos, debido a esto el boldo posee propiedades digestivas.

Además el boldo presenta entre sus componentes **aceites esenciales**, tales como el **eucaliptol** y **ascaridiol**. Estas sustancias son responsables de las propiedades carminativas del árbol de boldo, además de ayudar a la desinflamación de los tejidos.

Dentro de los componentes del boldo se destacan los **flavonoides**, los cuales tienen excelentes propiedades, que ayudan a reducir los riesgos de enfermedades cardíacas.

Además, se encuentran presentes en la composición del boldo **taninos**, que se destacan por sus propiedades antioxidantes.

Debido a los **flavonoides**, las sustancias antiinflamatorias, la boldina y los aceites esenciales, el boldo podría presentar propiedades para adelgazar. (16)

- **Aceite esencial:** Hasta un 2%. Es parecido al de quenopodio y muy rico en cineol conteniendo hasta una 30%. Contiene cimol y un 45% de ascaridiol. También contiene eugenol, pineno y terpineol.

- **Alcaloides:** hasta un 0,5%. 25% de los alcaloides de boldina, 0,3% de boldoglucina con propiedades narcótica. También encontramos esparteína, isocoridina, laurotetanina, norisocoridina y 15 alcaloides más.
- **Glicósidos flavónicos:** Peumósido, boldósido, fragósido, boldoglucina (heterósido mal definido).

También encontramos ácido cítrico, taninos, Oxalato de calcio, sustancias aromáticas. De agua contiene un 8%, materias minerales hasta un 12% y un 10% de lípidos. (16)

1.7.7 ACCIÓN FARMACOLÓGICA

Tiene una acción hepatoprotectora, digestiva, colerética, colagoga, antiinflamatoria, antihelmíntica

–Estimula la función de la vesícula y es ideal contra los parásitos, para desparasitar lo mejor es la bilis, si un hígado funciona bien y estimula la producción de bilis, no hay un medio adecuado para la instalación de parásitos-; funguicida y diurética. A dosis elevada es anestésico, sedante e hipnótico. (8)

Dado el contenido en sustancias con acción aperitiva, colerética y colagoga, el empleo de hojas de boldo se usa con notable eficacia para tratar dispepsias, trastornos gastrointestinales leves (flatulencia, aerofagia...) y disfunciones hepatobiliares menores como insuficiencia hepática (hígado y vesícula perezosos), hepatitis, estreñimiento y migrañas provocadas por malas digestiones.

No obstante, a pesar de que los preparados de boldo son beneficiosos para conseguir una buena función hepática, no hay que abusar de su ingestión ni tomarlo sin prescripción o supervisión médica. Conviene que el tratamiento con boldo no supere las cuatro semanas y no se superen las dosis recomendadas, pues se han observado casos de intoxicación. (8)

1.7.8 ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA

La actividad hepatoprotectora se refiere a la regeneración de las células hepáticas. Esto quiere decir que aceleran la función natural del hígado de reemplazar las células dañadas. (35)

Hay plantas hepatoprotectoras que pueden estimular los sistemas de detoxificación del hígado para eliminar los compuesto tóxicos que pudieran haber ingresado al mismo (ya sea alimentos en mal estado - las toxinas - como fármacos muy potentes). Uno de los mecanismos más importantes de detoxificación lo constituyen los sistemas enzimáticos de las catalasas y superóxido-dismutasa. Estos mecanismos son muy importantes para permitir la eliminación de radicales libres del organismos. Entre las plantas que cumplen con este rol figuran:

- El boldo (*Peumus boldus*)

El cardo mariano es una de las especies más reputadas, conteniendo entre sus activos la Silimarina, de gran poder detoxificante y regenerador de las células hepáticas. C. (54)

1.7.9 EFECTOS ADVERSOS

Debido a la presencia dentro de la composición del boldo, del alcaloide **boldina** y de aceites esenciales, no es recomendable el consumo durante el embarazo y la lactancia.

Esto es así, debido a que no existe evidencia clara que demuestre que el consumo de boldo en dosis adecuadas, no genera problemas al lactante, ni ocasiona abortos espontáneos. (61)

El consumo de boldo, a causa de sus componentes podría ocasionar efectos neurotóxicos, sin embargo no existe evidencia clara sobre esta situación.

Debido a que los aceites esenciales del boldo son extraídos en sustancias alcohólicas, no es recomendable su ingesta por niños, ni tampoco por personas que tengan problemas de alcoholismo. (61)

1.8. DROGAS HEPATOPROTECTORAS

Aparte de los mecanismos de protección celular vistos anteriormente, existen varias drogas que se usan para proteger el parénquima hepático en pacientes expuestos a hepatotóxicos. Así, la droga prometacina (una fetotiacina) fue la primera que se demostró que tenía un efecto hepatoprotector contra la acción necrogénica del CCl₄. La acción

parece ser por secuestro de $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ (radicales peroxilclorocarbonados) que pueden iniciar la peroxidación lipídica en membranas hepáticas.

La N-acetilcisteína, al ser un precursor del GSH (cisteína) protege contra agentes oxidantes, como el acetaminofén. (33)

1.8.1. SIMARIN

Silimarina con vitaminas del complejo B Hepatoprotectores



FUENTE: SIMARIN (SILIMARINA+COMPLEJO B).<http://www.pharmabrand.com.ec/es/producto-simarín-2013-01-10>
FOTOGRAFIA No. 3 MEDICAMENTO SIMARÍN®

1.8.1.1. Composición

TABLA No 2. COMPOSICIÓN DE LA CAPSULA DE SIMARIN

Silimarina	140mg
vitamina B1	4 mg
Vitamina B2	4 mg
Nicotinamida	12 mg
Vitamina B6	4 mg
Pantotenato de calcio	8 mg
Vitamina B12-Cianocobalamina	1.2 mcg

FUENTE: SIMARIN <http://www.pharmabrand.com.ec/es/producto-simarín> 2013-01-11

1.8.1.2 Acción terapéutica

La silimarina actúa a nivel del hepatocito como estabilizador de la membrana celular lesionada y hace efectiva una compleja protección del hígado frente a influencias nocivas, logrando la recuperación de las células hepáticas ya lesionadas, que se manifiesta en una mejoría del estado general, disminución de las molestias digestivas, aumento del apetito y peso, mejora de la sintomatología hepática y normalización de los

valores en los análisis clínicos. Las vitaminas del complejo B constituyen una unidad funcional en el metabolismo intermedio. Influyen sobre la función enzimática en el metabolismo de la albúmina y de los hidratos de carbono. Poseen también una acción hepatoprotectora, acelerando la recuperación del parénquima hepático dañado y facilitando la función desintoxicadora del hígado. Además, si se considera la significativa disminución de las vitaminas del complejo B que se presenta en las hepatopatías por la pérdida de la capacidad de almacenamiento, la administración de vitaminas del complejo B está indicada. (59)

1.8.1.3. Indicaciones

Simarín® Plus está indicado en la terapia hepática. Lesiones de origen tóxico-metabólico, especialmente aquellos que se caracterizan por una intensa peroxidación, como por ejemplo las provocadas por la ingesta crónica del alcohol y de medicamentos hepatotóxicos: esteatosis hepática, hepatitis alcohólica, cirrosis hepática. (59)

1.8.1.4. Contraindicaciones

Hipersensibilidad a cualquiera de los componentes de la fórmula. (59)

1.8.1.5. Efectos adversos

No se han descrito (59)

1.8.1.6. Posología y administración

Se recomienda 1 cápsulas de Simarín® Plus después de cada comida. Dosis de mantenimiento: Simarín® Plus 1 cápsula diaria. (59)

1.8.1.7. Presentación comercial

Simarín® Plus. Silimarina con complejo B. Caja por 10 y caja por 40 cápsulas. (59)

1.8.1.8. Mecanismo de acción de la silimarina

La Silimarina es el principio activo de la planta *Silybum marianum*, conocida por todos como Cardo Mariano, es a la vez una de las sustancias más poderosas y protectoras que se conocen.

Su poderoso efecto protector contra intoxicaciones resulta ser eficaz incluso contra la grave intoxicación producida por la seta venenosa *Amanita falloides*, siendo capaz de contrarrestar los efectos tóxicos, prevenir la muerte y reducir considerablemente el daño hepático. (48)

El efecto más interesante de la Silimarina sobre el hígado sea su capacidad de estimular la síntesis de proteínas. Esta estimulación favorece la capacidad del hígado para reemplazar las células dañadas por las nuevas – regeneración hepática -, pero también es interesante saber que la Silimarina NO produce el mismo efecto estimulador sobre los tejidos malignos.

La Silimarina aumenta más de 35% los niveles de glutatión en el hígado, un aminoácido muy necesario para desintoxicar la sangre de las sustancias nocivas que se toman con los alimentos, como el alcohol, sustancias contaminantes, medicamentos y hormonas que a largo plazo pueden causar mayores daños. El Glutatión neutraliza los radicales libres, además de los residuos metabólicos y hormonales y actúa como poderoso Antioxidante, sobre todo en combinación con el Selenio, para formar la potente enzima Glutatión Peroxidasa. (58)

Se ha postulado para la Silimarina un triple mecanismo de acción:

- a) Modificación de la membrana celular externa de los hepatocitos impidiendo el ingreso de las toxinas al interior de las células;
- b) Estimulación de la actividad de la polimerasa A nucleolar, aumentando la síntesis ribosomal de proteínas y la capacidad de regeneración del hígado y la formación de nuevos hepatocitos y c) un efecto antioxidante que contrarresta la acción de los radicales libres que se forman como metabolitos reactivos por acción de las toxinas y que dañan las membranas celulares. (58)

1.9 RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*)



FUENTE: RATA (*Rattus norvegicus*) BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.

FOTOGRAFÍA No 4. *Rattus norvegicus*

1.9.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Tabla No. 3 Clasificación taxonómica de *Rattus norvegicus*

Superreino	Eucariota
Reino	Animalia
Subreino	Eumetazoa
Superphylum	Deuterostomia
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Infraphylum	Gnathostomata
Superclase	Tetrapoda
Clase	Mammalia
Subclase	Theria
Infraclase	Placentalia
Orden:	Rodentia
Suborden	Myomorpha
Superfamilia	Muroidea
Familia	Muridae
Subfamilia	Murinae
Género	Rattus
Especie	Norvegicus
Nombre binomial	Rattusnorvegicus

Subespecies	R. n. albinicus - R. n. albus - R. n. norvegicus. (14)
--------------------	--

FUENTE: Normas Ramales. Drogas crudas y extractos y tinturas NRSP 309,311 Y 312 MINSAP.1992

1.9.2 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

La rata noruega presenta un pelaje áspero y grueso con prominentes orejas desnudas y cola prácticamente desnuda, que generalmente es más corta que el cuerpo y cabeza. De color blanco. Las hembras tienen 12 mamas. Posee cuatro incisivos, dos superiores y dos inferiores, carece de caninos y premolares anteriores lo que ocasiona que haya un diastema.

Sus incisivos crecen durante toda su vida a partir de la base, que va sustituyendo la porción desgastada por la actividad de cortar y roer materiales duros. La parte exterior del diente es más dura y carece de nervio, salvo en la base (Nowak, 1991). (13)

1.9.3 MEDIDAS

Longitud total: 80 a 480 mm (Nowak, 1991; Redford y Eisenberg, 1992; Ballenger, 2001).(10)

Longitud de la cola: 187 mm en promedio (Ballenger, 2001); 153 a 218 mm (Redford y Eisenberg, 1992). (10)

Longitud de la pata trasera: 37 a 44 mm (promedio) (Redford y Eisenberg, 1992). (10)

Peso: 200 a 500 g (Nowak, 1991; Bertram y Nagorsen, 1995). (13)

1.9.4 CICLO REPRODUCTIVO

Puede ser a lo largo de todo el año, aunque se han reportado picos en primavera y otoño; las hembras son poliéstricas y pueden tener entre 1 y 12 camadas al año; presentan estro posparto. Las hembras son receptivas por un período de 20 horas, cada 4 a 6 días (Nowak,1991). (51)42

Tiempo de gestación: De 21 a 26 días (Nowak, 1991). (23)

1.9.5 TAMAÑO DE LA CAMADA

Desde 2 hasta 22 crías; promedio 8 a 9. Las crías nacen ciegas y desnudas, pero pueden ver y están completamente cubiertas de pelo a los 15 días, dejando el nido a los 22 días, aproximadamente (Nowak, 1991). Madurez sexual: Entre 2 y 3 meses (Nowak, 1991). (23)

1.9.6 HÁBITOS ALIMENTICIOS

Omnívora, comiendo desde materia vegetal, hasta animal y en particular semillas, granos, nueces, vegetales y frutas, aunque también comen insectos y otros invertebrados. Esta especie come todo lo que el ser humano y más, incluyendo papel, cera de abejas, jabón, etc.

La comida comúnmente es llevada para almacenar a sus guaridas. En particular prefiere alimentarse de productos animales, tales como pájaros y huevos, y es excelente cazadora de peces. También se pueden alimentar de ratones, pollos y crías de cerdos y borregos, atacando en ocasiones animales mayores. La principal limitante es la presencia de agua (Nowak, 1991). (23)

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN.

La presente investigación se llevó a cabo en:

- Laboratorio de Productos Naturales de la ESPOCH.
- Laboratorio de Fitoquímica de la ESPOCH.
- Bioterio de la ESPOCH.
- Laboratorio Histopatológico de SOLCA- Riobamba.
- Laboratorio Histopatológico Dr. Oswaldo Duque Andrade.

2.2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.

MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1. MATERIALES

2.2.1.1 Vegetal

Como materia prima se utilizó las hojas de Boldo (*Peumus boldus*).

La materia prima fue obtenida en el mes de Septiembre del 2012 en Jambi Kiwa, en el Cantón Riobamba, en la provincia de Chimborazo.

2.2.1.2. Extracto

Para el extracto se utilizó:

1. Alcohol potable (96%)
2. Hojas de Boldo (*Peumus boldus*). (500 gramos)

2.2.2. REACTIVOS

1. Agua
2. Metanol
3. Acetato de etilo
4. Reactivo de Dragendorf
5. Reactivo de Wagner
6. Reactivo de Lieberman –Burchard
7. Reactivo de Borntrager
8. Reactivo de Baljet
9. Reactivo de Sudan III
10. Solución de Cloruro Férrico al 5%
11. Solución de Ninhidrina al 5%
12. Solución de Fehling A y B
13. Cloruro de sodio
14. Alcohol amílico
15. Éter
16. Cloroformo
17. Cloruro de sodio
18. Hidróxido de sodio
19. Ácido Sulfúrico concentrado
20. Ácido clorhídrico 10%
21. Ácido clorhídrico concentrado
22. Solución de sulfato de serio
23. Solución reveladora de Dragendorf
24. Amoniaco
25. Anhídrido acético
26. Granallas de magnesio metálico
27. Acetato de etilo
28. Dietilamina
29. Tolueno
30. Ácido acético glacial

2.2.3 EQUIPOS

1. Balanza analítica (BOECO)
2. Desecador
3. Estufa (MEMMERT)
4. Mufla (OPTIC IVYMEN SYSTEM)
5. Rotavapor (HEIDOLPH TYPE HEIZBAD SYSTEM)
6. pH-metro (HANNA INSTRUMENT)
7. Refractómetro
8. Agitador mecánico
9. Cabina extractora de gases (Memmert)

MATERIALES Y REACTIVOS PARA COMPROBAR LA ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA

Materiales

1. Algodón
2. Bandejas de plástico
3. Caja de guantes y mascarillas
4. Jeringas 3ml
5. jeringas de insulina
6. Balones aforados
7. Cánulas.
8. Vaselina pura
9. Vasos de precipitación
10. Vidrio reloj
11. Reverbero
12. Frascos de orina
13. Tubos tapa roja
14. Capilares
15. Cámara de anestesia
16. Reverbero

b. Reactivo biológico

1. Ratas Wistar del Bioterio de la Facultad de Ciencias ESPOCH

c. Reactivos:

- a. Extracto acuoso de Boldo (*Peumus boldus*) a dosis diferentes (100%, 66% y 33%).
- b. SIMARÍN® PLUS(Pharmabrand)
- c. Agua destilada
- d. Alcohol antiséptico
- e. Gel desinfectante
- f. Suero fisiológico
- g. Formol 10%

2.3 TÉCNICAS Y MÉTODOS

2.3.1 TÉCNICA POR INFUSIÓN

Se obtuvo el extracto acuoso de Boldo diariamente por infusión en tres diferentes dosis; 100%, 66% y 33%. Esterilizamos los utensilios pesamos 12g de las hojas de boldo en 100mL de agua destilada sometemos a infusión por 13 minutos, dejamos que se enfríe para posteriormente filtrar y proceder con su administración.

2.3.2 ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO

2.3.2.1. Determinación del contenido de humedad

Método Gravimétrico

Se pesó 2 g. \pm 0.5 mg de droga cruda y se transfirieron a un pesa filtro previamente tarado y se secó a 100°C durante 3 horas. El pesa filtro se puso en un desecador donde se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se pesó; colocándose nuevamente en la estufa durante 1 hora y se repitió el procedimiento hasta obtener masa constante. El ensayo se realizó por triplicado. (15)

Cálculos:

$$\%H = \frac{M2 - M1}{M} * 100$$

FÓRMULA Nº 1.

Dónde:

H = Porcentaje de Humedad

M = masa de la muestra de ensayo (g).

M1 = masa del pesa filtro con la muestra desecada (g)

M2 = masa del pesa filtro con la muestra de ensayo (g).

100 = factor matemático para los cálculos.

2.3.2.2. Determinación de cenizas totales.

Se determina la masa de no menos de 2.0g ni más de 3.0g de la porción de ensayo pulverizada y tamizada con una desviación permisible de 0.5mg en un crisol de porcelana o platino (en dependencia de la sustancia analizada) previamente tarado. Caliente suavemente la porción de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar y posteriormente incinere en un horno mufla a una temperatura de 700 a 750 °C, si no se señala otra temperatura en la norma específica, durante 2 horas.

Se enfría el crisol en una desecadora y se pesa, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0.5mg por g (masa constante).

Para obtener la masa constante los intervalos entre calentamiento y pesada son de 30 min.

Si el residuo presenta trazas de carbón, se le añaden unas gotas de solución de peróxido de hidrógeno concentrado, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio al 10% m/v y se calienta hasta evaporar los solventes. Al enfriar el crisol el residuo es de color blanco o casi blanco. (15)

Expresión de los resultados:

$$C = \frac{M2 - M}{M1 - M} X 100$$

FÓRMULA Nº 2

C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M = masa del crisol vacío (g)

M1 = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M2 = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático para los cálculos.

Los valores se aproximan hasta las décimas.

2.3.2.3. Determinación de cenizas solubles en agua

A las cenizas totales obtenidas en A, se le añaden de 15 a 20 mL de agua. El crisol se tapa y se hierve suavemente a la llama del mechero durante 5min. La solución se filtra a través del papel de filtro libre de cenizas. El filtro con el residuo se transfiere al crisol inicial, se carboniza en un mechero y luego se incinera en un horno mufla de 700-750 °C, durante 2h.

Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta alcanzar peso constante.

Expresión de los resultados.

$$Ca = \frac{M2 - Ma}{M1 - M} \times 100$$

FÓRMULA Nº 3

Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M2 = masa del crisol con las cenizas totales (g).

Ma = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

M1 = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

Los valores se aproximan a las décimas.

2.3.2.4. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

A las cenizas totales obtenidas según la técnica, se le añaden de 2-3 mL de ácido clorhídrico al 10%. El crisol se tapa con un vidrio reloj y se calienta sobre un baño de agua hirviente durante 10min. Se lava el vidrio reloj con 5mL de agua caliente y se une al contenido del crisol. La solución se filtra a través de un papel de filtro libre de cenizas; se

lava el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico p.a; al cual se le añade una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0.1mol/L, no muestre presencia de cloruros. El filtrado con el residuo se deseca de 100 a 105 °C, se transfiere al crisol inicial y se incinera en un horno mufla a una temperatura de 700-750 °C durante 2h (si no se señala otra temperatura en la norma específica). Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta obtener masa constante. (15)

Expresión de los resultados

$$B = \frac{M2 - M}{M1 - M} \times 100$$

FÓRMULA Nº 4

B= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

M = masa del crisol con la porción de ensayos (g)

M2= masa del crisol con la ceniza (g)

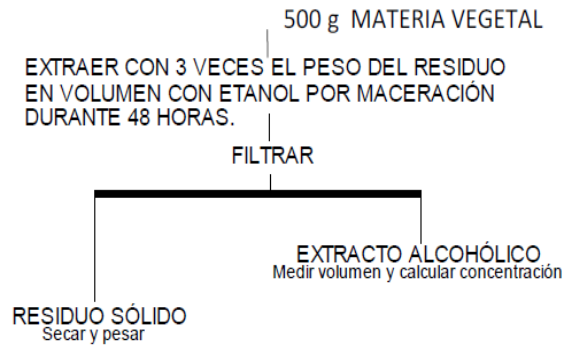
100= factor matemático.

Los valores se aproximan hasta las décimas.

2.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

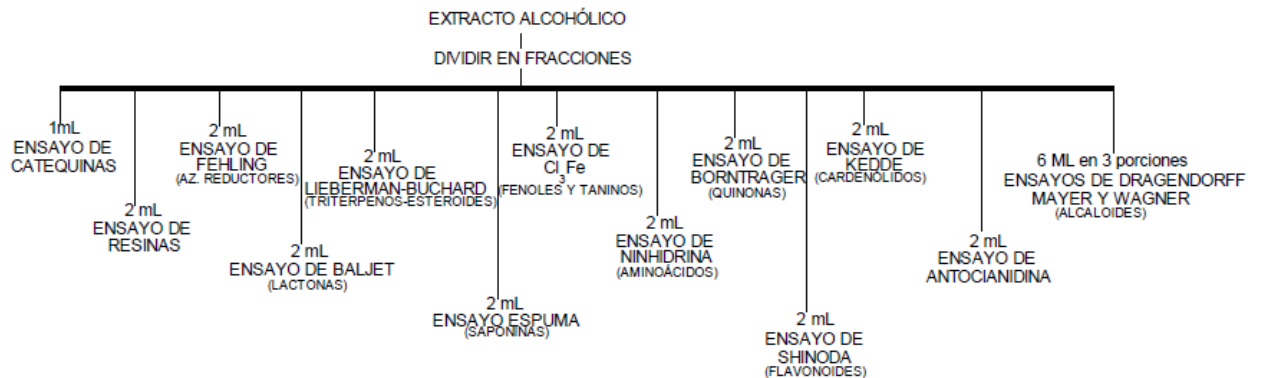
La planta fresca, seca o el residuo de una extracción; es sometida a una extracción sucesiva según el esquema de la Figura. 4, al extracto se le mide el volumen obtenido y se le calcula su concentración, esto es, gramos de sustancias extraídas por mL de extracto.

Durante el tamizaje fitoquímico se aplicó diferentes técnicas para determinar mediante reacciones de precipitación, colorimétricas o de otro cambio físico-químico que indique la presencia de grupos funcionales de metabolitos secundarios.



FUENTE: NORMAS RAMALES. DROGAS CRUDAS Y EXTRACTOS Y TINTURAS. NRSP 309, 311 Y 312. MINSAP 1992.

FIGURA No. 5 EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PARA LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE TAMIZAJE FITOQUÍMICO.



FUENTE: NORMAS RAMALES. DROGAS CRUDAS Y EXTRACTOS Y TINTURAS. NRSP 309, 311 Y 312. MINSAP 1992

FIGURA No. 6. ESQUEMA DE LAS REACCIONES A REALIZAR EN EL EXTRACTO ALCOHÓLICO.

2.4.1 ENSAYO DE DRAGENDORFF

Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++). (15)

2.4.2 ENSAYO DE MAYER

Proceda de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añada una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2 ó 3 gotas de la solución

reactiva de Mayer, si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++) , precipitado coposo (+++).

Observación: En el caso de alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, éstos solo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia la reacción debe ser (++) ó (+++), en todos los casos, ya que un resultado (+), puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias. (15)

2.4.3 ENSAYO DE WAGNER

Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma.

2.4.4 ENSAYO DE LIEBERMANN-BURCHARD

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

- 1- Rosado-azul muy rápido.
- 2- Verde intenso-visible aunque rápido.
- 3- Verde oscuro-negro-final de la reacción.

A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos. (15)

IMPORTANTE: Para realizar este ensayo no puede haber agua en el medio de reacción pues ésta con el ácido sulfúrico reacciona de forma violenta y puede ocurrir un accidente. La reacción de Liebermann-Burchard se emplea también para diferenciar las estructuras esteroidales de los triterpenoides, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas

coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.

2.4.5. ENSAYO DE BORNTRAGER

Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el Residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio ó amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++). (15)

2.4.6 ENSAYO DE BALJET

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Coumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1 mL). En estas condiciones se adiciona 1mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++ y +++) respectivamente. (15)

2.4.7 ENSAYO DE SUDÁN

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, para ello, a la alícuota de la fracción en el solvente de extracción, se le añade 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente.

La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente.

2.4.8 ENSAYO DE CATEQUINAS

Para ello, tome de la solución alcohólica obtenida una gota, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel de filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo. (15)

2.4.9 ENSAYO DE RESINAS

Para detectar este tipo de compuesto, adicione a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo. (15)

2.4.10 ENSAYO DE LA ESPUMA

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroideal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos. (15)

2.4.11 ENSAYO DEL CLORURO FÉRRICO

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

1. Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
2. Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
3. Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

2.4.12 ENSAYO DE LA NINHIDRINA

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. Se toma una alícuota del extracto en alcohol, o el residuo de la concentración en baño de agua, si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, se mezcla con 2 mL de solución al 2 % de ninhidrina en agua. La mezcla se calienta 5-10 minutos en baño de agua. (15)

Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo.

2.4.13 ENSAYO DE SHINODA

Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos. (15)

2.4.1.4. ENSAYO DE ANTOCIANIDINAS

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. Se calientan 2 mL del extracto etanólico 10 min. con 1 mL de HCL conc. Se deja enfriar y se adiciona 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agita y se deja separar las dos fases. La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, es indicativa de un ensayo positivo. (15)

2.4.1.5 ENSAYO DE FEHLING

Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la

solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. El reactivo se prepara de la siguiente forma:

Solución A: Se pesan 35 g de sulfato cúprico hidratado cristalizado y se disuelven con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

Solución B: Se pesan 150 g de tartrato de sodio y potasio y 40 g de hidróxido de sodio y se disuelven con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar.

También pueden realizarse otros ensayos no comprendidos en este esquema de tamizaje, para la detección de otros compuestos. (15)

2.5 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

2.5.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE BOLDO (*Peumus boldus*)

Los extractos blandos son líquidos espesos o masas semisólidas, que se obtienen por concentración de los licores extraídos sin llegar a sequedad. Generalmente cada gramo de licor extractivo es equivalente a 2-6 g de droga.

Las principales técnicas extractivas son: maceración, lixiviación o percolación, digestión, infusión, destilación y extracción continua.

Método por Maceración:

Se remojó la droga cruda fragmentada en un recipiente amplio y cerrado con Alcohol potable al 96% para que este penetre la estructura celular y disuelva las sustancias.

Se deja en remojo durante 2- 14 días agitando continuamente durante los días de reposo. Finalmente esta maceración se filtra, experimentando el residuo y lavando con un poco de alcohol potable al 96%, el filtrado se recoge en un frasco y posteriormente se refrigera para decantar las clorofilas y luego utilizar el extracto para las investigaciones planteadas.

Concentración del extracto alcohólico

- ✓ Concentrar en el Rotavapor el extracto recogido que fue de 250 mL hasta obtener un volumen de 70mL
- ✓ Se recoge el alcohol recuperado y poner en un envase etiquetado.

2.5.2 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS

2.5.2.1 Determinación del pH.

La acidez o la alcalinidad de las soluciones acuosas se caracterizan por el valor del índice de hidrógeno, pH. El pH es por tanto un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menor acidez de una solución en función de los iones hidrógenos. Se calcula teóricamente mediante la ecuación:

$$\text{pH} = - \log a [\text{H}^+]$$

$a [\text{H}^+] =$ actividad de los iones hidrógeno.

En la práctica la medición del pH se lleva a cabo por medio de la lectura de pH en la escala de un instrumento medidor de pH, ya sea igual o analógico. Esta lectura está en función de la diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia usando como solución de ajuste de la escala del medidor de pH, una solución reguladora del mismo.

Se ajusta el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizará la determinación. Posteriormente determínese el valor del pH de la muestra.

2.5.2.2 Determinación de la densidad relativa.

Se entiende por densidad relativa a la relación entre masa de un volumen de la sustancia a ensayar a 25°C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Este término equivale a peso específico.

Primeramente pése el picnómetro vacío y secos 2° C y llénese con la porción de ensayo, manténgalo a la temperatura de 25 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$) durante 15 min y ajústese el líquido al nivel empleado, si es preciso, una tira de papel para extraer el exceso secar exteriormente el picnómetro.

Se pesa cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo y se repite la operación con el agua destilada a 25 °C, después de limpiar el picnómetro.

Expresión del resultado:

La densidad relativa a 25 ° C se calcula por la siguiente fórmula:

$$D_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

FÓRMULA Nº 5

Dónde:

M₁ = peso del picnómetro con la muestra (g)

M₂ = peso del picnómetro con la muestra (g)

M = peso del picnómetro vacío (g)

2.5.2.3 Determinación del índice de refracción.

El índice de refracción es una constante característica de cada sustancia, la cual representa la relación entre el seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio.

Esta relación viene dada por la siguiente ecuación:

$$\eta = \frac{\text{Sen } i}{\text{Sen } r}$$

FÓRMULA Nº 6

Así los refractómetros utilizan como principio de medición, la determinación del ángulo límite el cual presenta en el campo visual un contraste claro y otro oscuro. La línea de separación entre ambos campos establece el ángulo límite de la luz incidente. Se coloca sobre el prisma de medición una gota de agua destilada. Utilizando para ello una varilla de vidrio que no tenga cantos agudos, se ajusta el equipo seleccionado la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.

Después de haber realizado el ajuste del refractómetro, se coloca una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cierra el termoprisma y se enfoca la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incida sobre la apertura de entrada del prisma de medición y se proceda de la misma forma que con el agua.

Expresión de los resultados:

Se hacen tres lecturas y se calcula el promedio de las mismas. Dos o más lecturas no deben diferir en más de 0.002.

Si las determinaciones no se efectúan a la temperatura de referencia se emplea la fórmula siguiente:

$$N_{d25} = N_{dt} + 0.00044 (t-25)$$

FÓRMULA Nº 7

Dónde:

N_{d25} = índice de refracción a 25 °C.

N_{dt} = Valor leído en la escala del aparato a la temperatura.

T = valor de la temperatura a que se realiza la medición (°C).

0.00044 = factor de correlación por Grados Celsius.

Los valores se aproximan hasta las milésimas

2.5.2.4 Determinación de Sólidos totales.

La determinación de la variación de la masa, debido a la pérdida o eliminación de sustancias volátiles por acción del calor, mediante un proceso de evaporación de la porción de ensayo y secado del residuo en estufa, hasta masa constante, se le asigna como sólidos totales. 5.0 mL del extracto se llevan a una cápsula previamente tarada a 105 °C, se evapora sobre baño de agua hasta que el residuo esté aparentemente seco. Se pasa entonces hacia una estufa y se deja hasta peso constante (aproximadamente 3 horas). Se retira la cápsula de la estufa y se coloca, en una desecadora hasta que alcance la temperatura ambiente.

Para obtener la masa constante entre una pesada y otra se mantendrá un tiempo de secado de 60 minutos.

Expresión de los resultados:

La cantidad de sólidos totales, expresado en %, R, se calcula por la siguiente fórmula;

$$St = \frac{Pr - P}{V} * 100$$

FÓRMULA Nº 8

Dónde:

Pr = masa de la cápsula más el residuo (g).

P == masa de la cápsula vacía (g).

V = volumen de la porción de ensayo.

100 == factor matemático para el cálculo.

2.5.2.5 Determinación de los requisitos organolépticos.

1. Determinación del olor

Se toma una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introduce un extremo en la muestra de ensayo. Se huele y se determina si corresponde con la característica del producto.

2. Determinación del color

Se toma un tubo de ensayos bien limpio y seco y se llena hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas.

2.5.3 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

a) Alcaloides

Método de extracción .- Los alcaloides presentes en las células en forma de sales, son liberadas como bases libres por el amoniaco, extrayendo con un solvente orgánico en breve tiempo, tras lo cual se concentra la solución con vacío, se extrae con ácido diluido quedando en la fase orgánica la clorofila y la mayoría de los demás pigmentos, terpenos, esteroides, etc. La solución acuosa se alcaliniza con NaOH o NH₄OH y se extrae con un solvente inmiscible (benceno, éter o cloroformo). De esta manera, se realiza una primera

purificación de los alcaloides realizándose esta operación en pocas horas obteniéndose en forma de alcaloides totales.

Para realizar el perfil cromatográfico de alcaloides se trabajó con el crudo de alcaloides disueltos en metanol aplicándose sobre el cromatofolio 10 uL de la solución de ensayo a 1 cm del borde inferior, luego se corrió 8 cm a partir de la línea de aplicación utilizando como fase móvil el sistema tolueno, acetato de etilo y dietilamina (7:2:1). Una vez recorrido el cromatofolio, se reveló atomizando con el reactivo de Dragendorff se midieron los Rf, se compararon los Rf hallados y el color de las manchas con reveladores de luz UV a 254 y 366 nm.

Para cuantificar se realiza una neutralización, los alcaloides purificados se disuelven en ácido acético glacial. Como reactivo para la valoración se emplea HClO₄ y como indicador cristal violeta (violeta de metilo).

2.6 ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DE LA INFUSIÓN DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*)

2.6.1 HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR PARACETAMOL A RATAS (*Rattus norvegicus*)

2.6.1.1 Animales de experimentación

Para llevar a cabo esta investigación se empleó un lote de 18 ratas (11 machos y 7 hembras) agrupadas en lotes de 3.

Se utilizó 3 machos para la dosis de 100%, 3 hembras para la de 66%, 3 machos para la dosis de 33%, 3 hembras como blanco, 1 hembra y 2 machos para control positivo con simarin y 3 machos para control negativo

Los animales tenían de 7 a 8 semanas de edad, acondicionándolos en cajas plásticas de polipropileno los mismos que se encontraban en condiciones ambientales controladas (temperatura 20,6 + 1,8°C, humedad relativa 59,8+5,2 fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad), por un período de adaptación de 8 días. Se alimentaron con la fórmula peletizada y agua *ad libitum*. (23)

Se colocó un animal por caja para evitar cualquier inconveniente.

2.6.1.2 Administración de Paracetamol

Se administró a las ratas del control positivo, control negativo y a los 3 grupos de experimentación 0,7mL de paracetamol los 3 últimos días de experimentación siendo este medicamento según la dosis un hepatotóxico que causa un daño hepático severo. (35)

2.6.1.3 Obtención de Sangre del Seno orbital

Con un ayuno de 14 horas se colocó al animal en una cámara cromatográfica que contenía un anestésico llamado seborane. Se introdujo al animal en esta cámara por unos segundos, posteriormente se sujetó firmemente para desinfectar los bordes externos de los ojos con suero fisiológico, se introduce cuidadosamente un tubo capilar en la esquina posterior del ojo, mover hacia adentro y fuera del seno para mantener el flujo de sangre. Recoger la sangre necesaria en un tubo de tapa roja para realizar las pruebas bioquímicas (ASAT y ALAT), limpiar el ojo con suero fisiológico y esperar que el animal se recupere totalmente para regresarlo a su jaula. (13)

2.6.1.4 Determinación de Enzimas Hepáticas en Sangre

Se evaluaron los niveles de Aspartatoaminotransaminasa (ASAT) y Alaninaminotransaminasa (ALAT) al inicio y al finalizar el tratamiento y de inducción de la hepatotoxicidad. La muestra sanguínea fue extraída de cada una de las ratas de los ojos debido a la cantidad que se requería para el análisis; un volumen aproximado de 3mL, después se colocó en los tubos de tapa roja para su respectivo análisis de enzimas hepáticas. (62)

2.6.1.5. Examen Anatomopatológico

Al culminar el ensayo las ratas fueron sacrificadas por el método de eutanasia con seborane. Se realizó la necropsia y se procedió a la extracción del hígado al mismo que se le observaron sus características macroscópicas como el color, aspecto, consistencia, forma, peso, y medidas tanto largo, ancho y profundidad.

Posteriormente se colocaron los hígados en envases que contenía formol diluido al 10% para el examen histopatológico.

2.6.1.6 Examen Histopatológico

Se realizaron los cortes histológicos de cada hígado luego se prepararon las placas para ser observadas microscópicamente y así determinar el porcentaje de protección y/o daño.

2.6.1.7 Administración del Tratamiento

Se administró vía oral 2mL del extracto acuoso de Boldo (*Peumus boldus*) en una concentración de 200 mg/kg al Grupo A, B y C en las concentraciones de 100%, 66%, 33% respectivamente a cada lote durante 9 días. La administración fue una vez al día por la mañana antes de la alimentación de los animales.

Al grupo control positivo se le administró vía oral 2mL de SIMARIN en una concentración de 150mg/Kg durante 9 días, una vez al día por la mañana después de la alimentación de los animales.

Al grupo control negativo se le administro vía oral 0.7 mL de paracetamol a partir del séptimo día de tratamiento, durante 3 días. La administración fue una vez al día por la mañana después de la administración del extracto acuoso de Boldo (*Peumus boldus*).

Al blanco no se le administró ningún tratamiento y se les mantuvo en condiciones normales de agua y comida. (35)

2.6.2 ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.

DEFINICIÓN DE LOS GRUPOS

TABLA N o. 4 GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN PARA LA COMPROBACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DEL EXTRACTO ACUOSO DE BOLDO (*Peumus boldus*)

BLANCO	3 ratas (hembra)	Agua <i>ad libitum</i>
CONTROL POSITIVO	1 rata (hembra) y 2 (machos)	Inducción del hepatoprotector (simarin)
CONTROL NEGATIVO	3 ratas (macho)	Inducción de la hepatotoxicidad (Paracetamol)
DOSIS ALTA 100%	3 ratas (machos)	Silimarina + paracetamol
DOSIS MEDIA 66%	3 ratas (hembras)	Silimarina + paracetamol
DOSIS BAJA 33%	3 ratas (machos)	Silimarina + paracetamol

FUENTE: INDUCCION DE HEPATOTOXICIDAD : http://sisbib.unmsm.edu.pe/brevistas/cimel/v13_n1/pdf/q05v13n1.pdf 2013-01-14

1. PERÍODO 1: ACLIMATACIÓN

- Aislamiento de las ratas (machos y hembras) 8 días previo a la experimentación.
- Peso de las ratas: 280-320 g. Tomar el peso todos los días
- Edad: Dos meses

Condiciones ambientales:

- Temperatura: 22°C±2
- Humedad Relativa: 55%±10
- Periodo: 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.
- Dieta: normocalórica, normoproteica.
- Comida: 3g de pellets/100g peso de la rata; agua *ad libitum*

2. PERÍODO 2: INDUCCIÓN DE LA HEPATOTOXICIDAD

Control (-):

Inducción con Paracetamol

- Dosis: A partir del séptimo día de experimentación administramos 200mg/kg de paracetamol por 3 días.
- Intervalo: Una administración diaria por vía oral.

3. PERÍODO 3: TRATAMIENTO

Dosis: Administrar 150mg/kg de peso de solución de SIMARIN durante 3 días. A partir del séptimo día administramos 200mg/kg de paracetamol por 3 días.

Intervalo: Una administración diaria por vía oral.

Grupos experimentales:

Este procedimiento se aplicará de forma simultánea para los tres grupos experimentales.

Dosis: Administrar 250 mg/kg de peso del extracto acuoso del Boldo (*Peumus boldus*) durante 3 días. A partir del séptimo día administramos 200mg/kg de paracetamol por 3 días.

Intervalo: Una administración diaria por vía oral.

4. PERÍODO 4: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPÁTICA

- Pruebas Histopatológicas

*Observación macroscópica y microscópica:

- ✓ Extraer el hígado de las ratas.
- ✓ Realizar el examen macroscópico del hígado, en donde valoramos los siguientes parámetros:
 - Color del hígado
 - Tamaño del hígado
 - Forma del hígado
- ✓ Colocar el hígado en un frasco con formol diluido al 10% por 48 horas.
- ✓ Realizar los cortes histológicos para la microscopía.
- ✓ Análisis microscópico del tejido hepático.
- ✓ Diagnóstico

- Pruebas Bioquímicas

- ✓ Luego de la experimentación, tomamos muestras sanguíneas de las ratas por punción cardíaca.

✓ Realizamos las siguientes pruebas enzimáticas:

-Aspartato amino transaminasa (AST)

-Alaninaminotransaminasa (ALT)

2.6.3. DETERMINACIÓN DE TRANSAMINASAS ALAT Y ASAT

2.6.3.1. Materiales

- Espectrofotómetro
- Agua destilada
- Algodón
- Pipetas automáticas 100 uL y 1000 uL
- Puntas de plásticos para pipeta
- Cubetas
- Reloj

2.6.3.2 Reactivos

- TGO y TGP

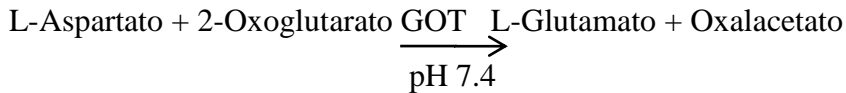
2.6.2.3 Método

Las transaminasas o amino transferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo amino de un aminoácido a un cetoácido (reacción de transaminación), requieren de un grupo prostético: el fosfato de piridoxal para su acción catalítica. Niveles bajos se detectan en pacientes dializados o con deficiencia de vitamina B6.

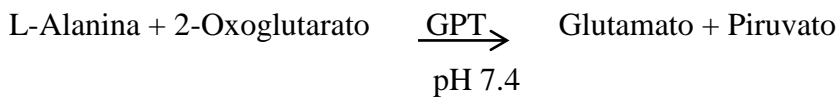
Fosfato de piridoxal: es una coenzima derivada de la Vitamina B6 (piridoxina) cuya función es la transferencia de grupos amino en la reacción de transaminación. Por ejemplo el alfa – cetoglutarato recibe el grupo amino del fosfato de piridoxal para formar glutamato.

2.6.3.4 Principio de la reacción

La aspartato aminotransferasa (ASAT) cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al oxoglutarato con la formación de glutamato y oxalacetato.



La alanina aminotransferasa (ALAT) cataliza la transferencia del grupo amino de la alanina al oxoglutarato con la formación de glutamato y piruvato.



La actividad de las transaminasas es proporcional a la cantidad de oxalacetato o piruvato formados en un tiempo prefijado, medidos colorimétricamente por la acción de la 2,4-dinitrofenilhidracina (DNFH) en medio alcalino, un compuesto coloreado que se mide a 505nm. (52)

2.6.2.5 Parte Experimental

Procedimiento (en suero o plasma) tanto para TGO como para TGP:

Longitud de onda: Hg 334 nm	
Temperatura: 25° C	
Cubeta: 1 cm paso de luz	
Ajuste cero: contra el aire	
Reactivo de trabajo	1000 ul colocar en la cubeta
Muestra	100 ul colocar en la cubeta
Mezclar e incubar por 1 minuto a temperatura de 25° C, leer en el espectrofotómetro (A1), repetir las lecturas exactamente al 2do.(A2) y 3er. Minuto(A3)	
Realizar los cálculos: $\Delta A / \text{min} = A1 - A2$ (usando los dos primeros minutos de lecturas de absorbancia) $\Delta A1 / \text{min} = A1 - A2$ (usando los tres minutos de lecturas de absorbancia) $\Delta A2 / \text{min} = A2 - A3$ $\Delta A / \text{min} = (\Delta A1 + \Delta A2) / 2$ Concentración de TGP = $\Delta A \times 1790$ Concentración de TGO = $\Delta A \times 1790$ Reportar los resultados en U/l	

2.6.2.5 Valores normales

Suero o plasma ratas (ayunas): ASAT 32-92 U/L, ALAT 17-50 U/L (Norwark 1991)
(61).

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el cumplimiento de este trabajo investigativo, se partió del extracto acuoso de Boldo (*Peumus boldus*) que fue obtenido diariamente en las instalaciones del Bioterio de la Facultad de Ciencias. Siendo la materia prima de gran consumo en nuestra sociedad, todo el proceso se realizó en lo posible bajo un ambiente estéril, libre de contaminación.

3.1 CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA SECA DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*).

Previa utilización de la droga vegetal en las diferentes aplicaciones, se recomienda la realización del control de calidad de la droga cruda y seca de las hojas de Boldo (*Peumus boldus*).

3.1.1 ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO

3.1.1.1. Determinación del contenido de humedad

En la droga cruda y seca de las hojas de Boldo (*Peumus boldus*), mediante el método gravimétrico se obtuvieron los siguientes resultados.

**CUADRO Nº 1. HUMEDAD DE LA DROGA DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*).
LABORATORIO DE FITOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
ESPOCH. OCTUBRE 2012.**

	% HUMEDAD	LIMITES DE ACEPTABILIDAD DE LA HUMEDAD SEGÚN LA USP
DROGA SECA	12.92	Hasta 14%

Los resultados expresados en el CUADRO No 1 nos indica que el contenido de humedad es de 12.92% en droga seca de boldo (*Peumus boldus*) con lo que comprobamos que se encuentra dentro del límite normal. Este parámetro evidencia la estabilidad de la planta, ya que habiendo menor cantidad de agua se evita la proliferación bacteriana.

3.1.1.2. Determinación de cenizas totales.

En la droga seca de boldo (*Peumus boldus*), mediante el método gravimétrico de la determinación de cenizas totales, solubles en agua e insolubles en HCl se obtuvieron los siguientes resultados.

CUADRO Nº 2. CENIZAS TOTALES, SOLUBLES EN AGUA E INSOLUBLES EN HCl DE LA DROGA SECA DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*) LABORATORIO DE FITOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH OCTUBRE 2012.

	% C.T	% C. sol en agua	% C .ins. HCl	LIMITES DE ACEPTABILIDAD SEGUN LA USP
Droga seca	8.59	6.02	2.8	C.T 12%
				C.INS. HCl 5%

El resultado expresado en el CUADRO No 2 de las hojas de Boldo (*Peumus boldus*) indica en contenido de cenizas totales de 8.59% mientras que las cenizas solubles en agua 6.02% y cenizas insolubles en ácido clorhídrico 2.8%.

Estos porcentajes son aceptados ya que están dentro de los límites de la USP (5%). Este análisis en condiciones rigurosas, es constante y nos permite descubrir falsificaciones por otras drogas, tierras u otros minerales. Además ésta determinación es primordial ya que la materia mineral puede ser responsable de alguna acción farmacológica no deseada. Si en la determinación ha sido elevado el contenido de cenizas puede ser indicador que en la recolección existió contaminación de materia mineral (tierra).

3.2 CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*).

El análisis de control de calidad se realizó sobre el extracto de las Hojas de Boldo (*Peumus boldus*) obtenido por maceración del vegetal con alcohol potable al 96%.

3.2.1 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico constituye una de las etapas que nos permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta. La información obtenida de la investigación de compuestos de origen vegetal, ayuda a comprender la fisiología y bioquímica de los organismos que los producen y a lograr su mejor aprovechamiento con fines científicos, medicinales y económicos.

El tamizaje fitoquímico se realizó en el extracto alcohólico, etéreo y acuoso simultáneamente.

CUADRO Nº 3. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO, ETÉREO, ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). LABORATORIO DE FITOQUIMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH OCTUBRE 2012.

ENSAYO	METABOLITO	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
DRAGENDORFF	ALCALOIDES	+++	+++	+++
WAGNER	ALCALOIDES	+++	+++	+++
MAYER	ALCALOIDES	+++	+++	+++
LIEBERMAN BUCHARD	TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES	++		
BALJET	COMPUESTOS LACTÓNICOS	++		
SUDAN III	COMPUESTOS GRASOS	-		
CATEQUINAS	CATEQUINAS		-	
ESPUMA	SAPONINAS		-	+
CLORURO	COMPUESTOS		+	+

FERRICO	FENOLICOS Y/O TANINOS			
NINHIDRINA	AMINOACIDOS LIBRES O AMINAS		-	
SHINODA	FLAVONOIDES		++	++
BORNRAGER	QUINONAS		+	
ANTOCIANIDINAS	FLAVONOIDES		++	
FEHLING	PRESENCIA DE AZUCARES		-	-
RESINAS	RESINAS		+	
MUCÍLAGOS	MUCILAGOS			-

(+++): Cuando la presencia del metabolito secundario es abundante

(++) ó (+) : Cuando la presencia del metabolito secundario es poco o escaso

(-): Cuando la reacción es negativa, lo que indica la ausencia del metabolito.

En el análisis del tamizaje fitoquímico del Boldo (*Peumus boldus*) realizado en el extracto etéreo, alcohólico y acuoso se puede apreciar mediante el CUADRO No. 3 la existencia de alcaloides, flavonoides, triterpenos y/o esteroides, quinonas, compuestos lactónicos, y compuestos fenólicos y/o taninos en una proporción representativa vista en el vegetal.

Además también se encontró la presencia de saponinas y azúcares reductores. El análisis fitoquímico comprueba la presencia de compuestos lactónicos y principios amargos que le otorgan la cualidad de hepatoprotector al Boldo.

Estos datos coinciden con el estudio de compuestos fitoquímicos del Boldo realizado por Pamplona 2006. Los metabolitos encontrados en esta investigación fueron: compuestos lactónicos, flavonoides, taninos, triterpenos, quinonas, compuestos amargos. Además que contiene 20 alcaloides derivados de la aporfina el más importante de los cuales es la boldina que representa el 25-30% del total. (18)

Desde el punto de vista farmacológico los compuestos fenólicos han mostrado diferentes actividades, entre las cuales tenemos: colerética (estimulante de la secreción biliar), tal es el caso específico de la boldina que ayuda a estimular la secreción biliar en ratas e In vitro funciona como protector de hepatocitos de rata, además reduce los niveles de colesterol en ratas, presenta una acción antioxidante (cultivos de hepatocitos) y reduce los niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos en humanos. (21)

3.2.2 DETERMINACIÓN DEL pH.

CUADRO Nº 4. pH DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH OCTUBRE 2012.

Parámetro	Resultado
pH	6.5

El pH expresa la concentración de iones hidronio [H₃O⁺] presentes en determinadas sustancias. En el extracto de las hojas de Boldo (*Peumus boldus*) el pH es de 6,5 lo que representa un pH ligeramente ácido. En estudios realizados sobre (*Peumus boldus*) el pH se ha encontrado entre 4-6 -Neutro alcalino- (39), lo que indica que se encuentra dentro del rango referencial.

3.2.3 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA.

CUADRO Nº 5. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH OCTUBRE 2012.

Parámetro	Resultado
Δ	1.282

El resultado expuesto en el CUADRO No 5 indica que el extracto alcohólico de las hojas de Boldo (*Peumus boldus*) es más denso que el agua por ser su valor mayor a 1.

En estudios realizados sobre el Boldo (*Peumus boldus*) la densidad se ha encontrado valores entre 0,85 y 8 lo que indica que se encuentra dentro de los límites de referencia.

3.2.4 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN.

CUADRO Nº 6. ÍNDICE DE REFRACCIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS OCTUBRE 2012.

Parámetro	Resultado
Índice de Refracción	1.389

El índice de refracción es un valor útil que establece la pureza de los aceites esenciales presente en la planta. El resultado expuesto en el CUADRO No.6 es de 1.389

3.2.5 DETERMINACIÓN DE ° BRIX

CUADRO N°7. °BRIX DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). LABORATORIO DE FITOQUIMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.

Parámetro	Resultado
° Brix	2.1

Indica la cantidad de sólidos solubles presentes en el extracto alcohólico del boldo (*Peumus boldus*), los cuales se encuentra expresados en porcentaje de sacarosa. El resultado expuesto en el CUADRO No.7 es de 2.1

3.2.6 DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES.

CUADRO N°8. SÓLIDOS TOTALES DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). LABORATORIO DE FITOQUIMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH OCTUBRE 2012.

Parámetro	Resultado
Sólidos totales	3.69 %

Los resultados expuestos en el CUADRO No.8 miden el total de residuos sólidos filtrables (sales y residuos orgánicos). Si su valor es alto el extracto por lo general es de mal agrado al paladar y pueden inducir una reacción fisiológica adversa en el consumidor.

Este parámetro sirve para calcular la dosis para la administración a los grupos experimentales.

El valor encontrado se aproxima al obtenido por Bozzo 2006, que fue de 3,72%. (4)

3.2.6 DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS.


CUADRO N°9. REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). LABORATORIO DE FITOQUIMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH OCTUBRE 2012.

Parámetros	Extracto
Aspecto	Líquido
Color	Verde oscuro
Olor	Aromático alcanforado y picante
Sabor	Amargo

Los resultados que se observan en el CUADRO No.9 son las características organolépticas del Extracto alcohólico de las hojas de boldo (*Peumus boldus*), siendo líquido en su aspecto, de color verde oscuro, sabor amargo y olor característico de la planta.

3.2.7 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

CUADRO N° 10. Rf DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH OCTUBRE 2012.

MANCHAS OBSERVADAS	CÁLCULOS <i>Rf</i>	COMPUESTOS IDENTIFICADOS	COLOR	PLACA
1.	$Rf1 = \frac{2,2}{8,3} = 0,27$	Boldina	Azul	
2.	$Rf1 = \frac{4,2}{8,3} = 0,50$	Kaempferol-diglycoside	Verde-amarillo	
3	$Rf3 = \frac{5,1}{8,3} = 0,61$	Isoboldina	Azul	
4	$Rf4 = \frac{5,5}{8,3} = 0,75$	Quercetin – 3 – O – and kaempferol-3-orhamnoside.	Violeta	

FUENTE: HILDEBERT WAGNER. SABINE BLADT. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas.

Absorbente: Sílica gel 60 F254

Sistema de solventes: Tolueno; Acetato de etilo; Dietilamina (7:2:1)

Revelador: Dragendorff

En la cromatografía en capa fina los metabolitos encontrados son los que se describen en el CUADRO No 10, previamente calculados los Rf para identificarlos, estos metabolitos han sido comparados con una cromatografía en capa fina para alcaloides donde son citados con sus respectivos Rf. WAGNER.H, BLADT S. (1996). (24)

$$Rf = \frac{\text{Distancia Recorrida de la Muestra}}{\text{Distancia Recorrida del Solvente}}$$

De acuerdo a los Rf de bibliografía con los encontrados en la investigación, los alcaloides presentes en las hojas de Boldo (*Peumus boldus*) podrían ser:

Rf = 0.27 Boldina,

Rf =0.61 Isoboldina

Y los flavonoides:

Rf = 0.50 Kaempferol- diglycoside

Rf = 0.75 Quercetin – 3 – O – and kaempferol-3-orhamnoside.

Estos alcaloides y flavonoides poseen actividad citoprotectora porque inhiben la formación de radicales libres y evitan la pérdida de glutatión que es un antioxidante. Además se ha demostrado científicamente que ejerce una acción beneficiosa sobre la función hepática: la secreción de bilis aumenta entre dos y cuatro veces

Observamos que los compuestos dados en la bibliografía y los determinados mediante la cromatografía en esta investigación son los mismos, mientras que los valores experimentales de Rf varían un poco en comparación con los dados en dicha fuente bibliográfica.

3.3 ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE BOLDO (*Peumus boldus*) EN RATAS (*Rattus norvegicus*) CON HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA CON PARACETAMOL.

3.3.1.1 Evaluación de peso basal y final de los reactivos biológicos en la investigación

Se realizó el extracto acuoso de la planta a diferente concentración de acuerdo a la ingesta diaria de una persona, no se utilizó el extracto alcohólico por que se tiene el riesgo de que el etanol que se encuentra en el extracto pueda causar interferencias en los resultados.

El extracto acuoso de Boldo (*Peumus boldus*) fue administrado en dosis de 200mg/Kg, al 100%, 66% y 33%, mientras que para la solución de SIMARIN 150mg/kg.

El peso de las ratas se evaluó al inicio y al final de la investigación para conocer de qué manera interactuaron los pesos con respecto al extracto acuoso de Boldo administrado; viéndose una depreciación en los pesos adquiridos.

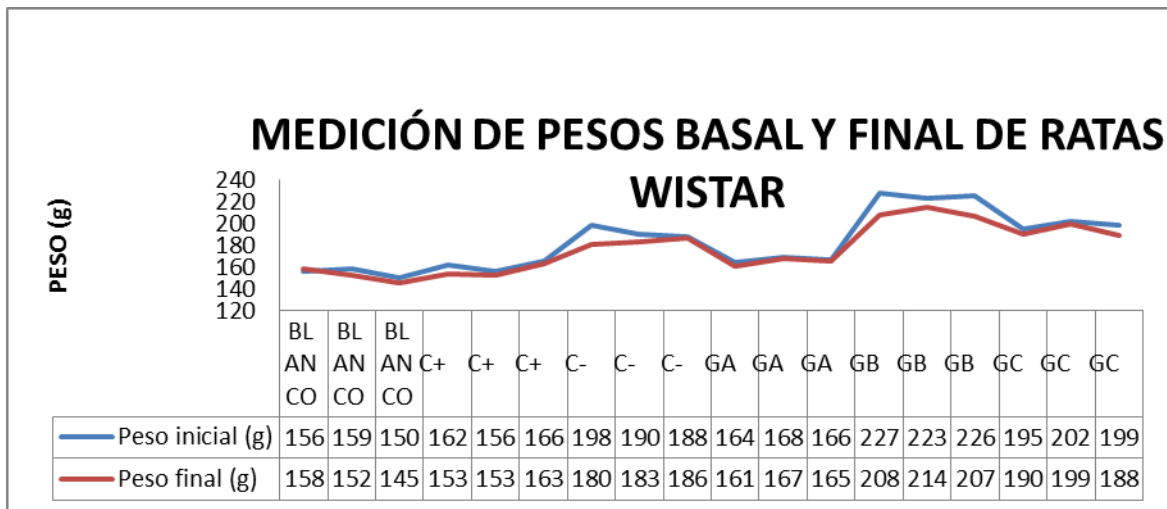
3.4 VALORES DESCRIPTIVOS DEL PESO BASAL Y FINAL DE RATAS

CUADRO Nº11. VALORES DESCRIPTIVOS DEL PESO BASAL Y FINAL DE RATAS (*Rattus norvegicus*) DURANTE LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH DICIEMBRE 2012.

GRUPOS EXPERIMENTALES	SEXO	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)
BLANCO	HEMBRA	156,3	158,2
BLANCO	HEMBRA	158,6	152,3
BLANCO	HEMBRA	150,2	145,4
CONTROL POSITIVO	HEMBRA	161,8	153,2
CONTROL POSITIVO	HEMBRA	155,9	152,6
CONTROL POSITIVO	HEMBRA	165,7	162,9
CONTROL NEGATIVO	MACHO	198	180,2
CONTROL NEGATIVO	MACHO	189,8	183,2
CONTROL NEGATIVO	MACHO	188,1	186,4
GRUPO A	MACHO	164,1	160,8
GRUPO A	MACHO	168,3	167,2
GRUPO A	MACHO	166,2	164,9
GRUPO B	MACHO	227,3	207,7
GRUPO B	MACHO	222,9	214,3
GRUPO B	MACHO	225,8	206,9
GRUPO C	MACHO	194,9	190,4
GRUPO C	MACHO	201,6	198,9
GRUPO C	MACHO	198,7	188,3
TOTAL		183,01	176,32

P < 0,01

Como lo muestra el CUADRO No. 11 con el valor de la significancia inferior a 0,01 confirmamos que no existe una diferencia altamente significativa en los pesos basal y final. Por lo tanto la administración del paracetamol y del extracto acuoso de boldo al 33% influyo en los pesos de las ratas, produciendo un descenso con relación al peso basal principalmente de las ratas del control negativo.



B: BLANCO (ALIMENTACIÓN Y AGUA AD LÍBITUM)

C+: CONTROL POSITIVO (SIMARIN)

C-: CONTROL NEGATIVO (PARACETAMOL)

GA: DOSIS AL 100% DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*).

GB: DOSIS AL 66% DEL EXTRACTO ACUOSO HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*).

GC: DOSIS AL 33% DEL EXTRACTO ACUOSO HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*).

GRÁFICO N° 1 MEDICIÓN DE PESO BASAL Y FINAL DE RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*) DURANTE LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH DICIEMBRE 2012.

En el GRÁFICO N° 1 se observó una clara disminución de los pesos de las ratas correspondientes al control negativo y al grupo C (extracto acuoso de las hojas de boldo al 33%), por lo que se aprecia un bajo efecto hepatoprotector afectando así en su apetito lo que conllevó a la disminución del peso.

Mientras que el Blanco, control positivo, el grupo A (extracto acuoso de las hojas de Boldo al 100%) y el grupo B (extracto acuoso de las hojas de Boldo al 66%) no existió una diferencia significativa entre los pesos pre-experimentales y post- experimentales.

3.4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PESO BASAL Y FINAL DE RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*) CON RESPECTO A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS APLICADOS CON EL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*) EN LOS REACTIVOS BIOLÓGICOS EN LA INVESTIGACIÓN.

CUADRO N° 12 PRUEBA DE TUKEY PARA DETERMINAR LOS PESOS PROMEDIO EN RATAS WISTAR DEL BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS – ESPOCH. DICIEMBRE 2012

PESO INICIAL

HSD de Tukey^a

TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
BLANCO	3	155,033			
CONTROL POSITIVO	3	161,133	161,133		
GRUPO A	3		166,200		
CONTROL NEGATIVO	3			191,967	
GRUPO C	3			198,400	
GRUPO B	3				225,333
Sig.		,442	,622	,389	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

PESO FINAL

HSD de Tukey^a

TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
BLANCO	3	151,967		
CONTROL POSITIVO	3	156,233		
GRUPO A	3	164,300		
CONTROL NEGATIVO	3		183,267	
GRUPO C	3		192,533	
GRUPO B	3			209,633
Sig.		,077	,255	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Al observar el CUADRO No.12 notamos que mediante la Prueba de Tukey los valores de los pesos promedios se agrupan en tres grupos diferentes: el primer grupo se encuentra formado por el Blanco, control positivo y el Grupo A; el segundo grupo está formado por el Control negativo, y el Grupo C; el tercer grupo se encuentra formado por el Grupo B.

3.5. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA COMPROBAR LA ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DEL BOLDO (*Peumus boldus*).

CUADRO N°.13 VALORES DESCRIPTIVOS DE ASAT EN RATAS (*Rattus norvegicus*) CON INTOXICACIÓN HEPÁTICA PRODUCIDAS POR PARACETAMOL EN LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.

GRUPOS EXPERIMENTALES	SEXO	N	MEDIA DE ASAT 32-92 (U/L)
BLANCO	HEMBRA	3	58,66 (± 6,21)
CONTROL POSITIVO	HEMBRA	3	86,93 (± 12,71)
CONTROL NEGATIVO	HEMBRA	3	124,26 (± 4,91)
GRUPO A (EXTRACTO 100%)	MACHO	3	92,36 (± 3,26)
GRUPO B (EXTRACTO 66%)	MACHO	3	115,60(± 7,30)
GRUPO C (EXTRACTO 33%)	MACHO	3	138,86 (± 5,05)
TOTAL		18	102,78 (± 28,00)

(±) Desviación Típica

P < 0,01

En el CUADRO No. 13 se observó que la media de ASAT tienen bastante significancia entre los grupos: C (extracto acuoso del boldo al 33%) con un valor de 138,86, el control negativo con un valor de 124,26, y B (extracto acuoso de boldo al 66%) con un valor de 115,60 lo que nos indica que se debe tomar muy en cuenta la dosis de administración porque depende de esto su efecto, en este cuadro se pudo apreciar que el grupo C, al igual que el B se elevan las medias lo que quiere decir que a estas concentraciones no cumple con la función de hepatoprotector e inclusive el grupo C que es un tratamiento se eleva más que el control negativo al que se le indujo las lesiones hepáticas, esto se debe a que

el extracto acuoso de boldo al 33% no protege al hígado por lo que se produce un sinergismo con el paracetamol y el daño hepático es mucho más elevado.

Presentaron medias de ASAT bajas tanto el control positivo y el grupo A (extracto acuoso de las hojas al 100%) con un valor de 92,36 U/l, con lo que se determina que a esta concentración el extracto acuoso de las hojas de Boldo tienen actividad hepatoprotectora y el control positivo SIMARIN lo que indica que es un buen hepatoprotector.

3.5.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS DE ASAT CON RESPECTO A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS APLICADOS CON EL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*) EN LOS REACTIVOS BIOLÓGICOS EN LA INVESTIGACIÓN.

CUADRO No 14. PRUEBA DE TUKEY PARA LA MEDICIÓN DE ASAT EN RATAS WISTAR DEL BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS –ESPOCH. DICIEMBRE 2012

		MEDICIÓN ASAT				
TRATAMIENTOS		N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
HSD de Tukey ^a	BLANCO	3	58,667			
	CONTROL POSITIVO	3		86,933		
	GRUPO A	3		92,367		
	GRUPO B	3			115,600	
	CONTROL NEGATIVO	3			124,267	124,267
	GRUPO C	3				138,867
	Sig.			1,000	,934	,689

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Al observar el CUADRO No. 14 notamos que mediante la Prueba de Tukey los valores de las mediciones de ASAT se agrupan en cuatro grupos diferentes: el primer grupo se encuentra formando el Blanco y el Control positivo, el segundo grupo está formado por el Control positivo y el grupo; el tercero el grupo B y el Control Negativo y finalmente en el cuarto grupo se encuentra el Control Negativo y el Grupo C.

CUADRO No. 15. VALORES DESCRIPTIVOS DE ALAT EN RATAS (*Rattus norvegicus*) CON INTOXICACIÓN HEPÁTICA PRODUCIDAS POR PARACETAMOL EN LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.

GRUPOS EXPERIMENTALES	SEXO	N	MEDIA DE ALAT (17-50 U/L)
BLANCO	HEMBRA	3	42,46 (±6,30)
CONTROL POSITIVO	HEMBRA	3	66,56 (±8,58)
CONTROL NEGATIVO	HEMBRA	3	86,30 (±5,91)
GRUPO A (EXTRACTO 100%)	MACHO	3	50,40 (±2,20)
GRUPO B (EXTRACTO 66%)	MACHO	3	72,46 (±10,3)
GRUPO C (EXTRACTO 33%)	MACHO	3	88,83 (±6,60)
TOTAL		18	67,50 (±18,49)

(±) DESVIACIÓN ESTANDAR

P < 0,01

Mediante el CUADRO No. 15 podemos corroborar que depende de la dosis de administración para que cumpla con la actividad hepatoprotectora lo que es el caso del extracto acuoso de boldo al 100% la media de ALAT fue el más bajo con un valor de 50,4 U/l.

Se observó que el extracto acuoso de boldo al 33% la media de ALAT fue el más alto con un valor de 88.83 U/l, siendo superior en cuanto al control negativo que su media es de 86,30 U/l por lo que es muy importante conocer la dosis a la cual se va administrar; con lo que podemos decir que a las dosis bajas y medias no cumple con la actividad deseada.

3.5.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS DE ASAT CON RESPECTO A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS APLICADOS CON EL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*) EN LOS REACTIVOS BIOLÓGICOS EN LA INVESTIGACIÓN.

CUADRO No. 16 PRUEBA DE TUKEY PARA LA MEDICIÓN DE ALAT DE RATAS WISTAR DEL BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS – ESPOCH. DICIEMBRE 2012.

		MEDICIÓN ALAT				
TRATAMIENTOS		N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
HSD de Tukey ^a	BLANCO	3	42,467			
	GRUPO A	3	50,400	50,400		
	CONTROL POSITIVO	3		66,567	66,567	
	GRUPO B	3			70,467	70,467
	CONTROL NEGATIVO	3				86,300
	GRUPO C	3				88,833
	Sig.			,744	,128	,982

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Al observar el CUADRO No. 16 notamos que mediante la Prueba de Tukey los valores de las mediciones de ALAT se agrupan en cuatro grupos diferentes: el primer grupo se encuentra formado por el grupo Blanco y el Grupo A, entre los cuales no existe una diferencia estadística significativa, el segundo grupo está formado por el Grupo A y el Control positivo, el tercer grupo por el Control positivo, Grupo B y en el último grupo está formado por el Grupo B, Control negativo y el grupo C, es decir no hay diferencia significativa en aplicar el extracto al 33%, 66% o únicamente hacerle el daño hepático debido que a estas dosis los niveles de ALAT se elevan, por lo que es muy importante tomar en cuenta a la dosis a la que se debe administrar siendo fundamental, caso contrario puede causar serias complicaciones o lo que sería peor podría agudizar las afecciones hepáticas.

CUADRO 17. PORCENTAJES DE ELEVACIÓN DE TRANSAMINASAS (ASAT) EN RATAS (*Rattus norvegicus*) CON INTOXICACION HEPÁTICA PRODUCIDA POR PARACETAMOL EN LA INVESTIGACIÓN DEL BOLDO (*Peumus boldus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012

GRUPOS EXPERIMENTALES	ASAT MEDIA 32-92 (U/L)	DIFERENCIA RESPECTO AL VALOR NORMAL DE ASAT	PORCENTAJE DE ELEVACION DE ASAT
BLANCO	85	5,0	5,25
CONTROL POSITIVO	86,9	5,1	5,54
CONTROL NEGATIVO	124,2	32,2	35
GRUPO A 100%	92,3	0,36	0,72
GRUPO B 66%	115,6	23,6	25,65
GRUPO C 33%	138,8	46,9	50,97

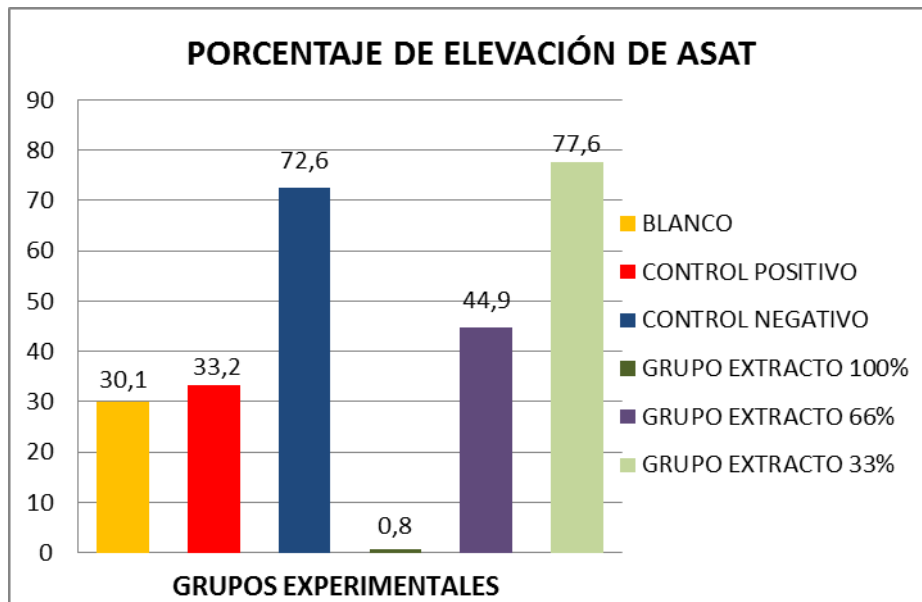


GRÁFICO No. 2 PORCENTAJE DE ELEVACIÓN DE ASAT EN RATAS (*Rattus norvegicus*) CON INTOXICACIÓN HEPÁTICA PRODUCIDA POR PARACETAMOL EN LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumua boldus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.

En el CUADRO No 17 y en el GRÁFICO No.2 se observó que el porcentaje de elevación de ASAT del grupo C es el más alto pues asciende al 50,97%, seguido por el control negativo cuyo porcentaje de elevación es de 35%. El grupo B presentó una elevación del 25,65 % de ASAT. Con el control positivo su porcentaje de elevación es de 5,54%.

Con el extracto acuoso de las hojas de boldo al 100% el nivel de elevación de ASAT fue el más bajo con un valor de 0,72%, con lo que se determina que a esta concentración tiene actividad hepatoprotectora.

CUADRO N° 18. PORCENTAJES DE ELEVACIÓN DE TRANSAMINASAS (ALAT) EN RATAS (*Rattus norvegicus*) CON INTOXICACION HEPÁTICA PRODUCIDA POR PARACETAMOL EN LA INVESTIGACIÓN DEL BOLDO (*Peumus boldus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012

GRUPOS EXPERIMENTALES	ALAT MEDIA 17-50 (U/L)	DIFERENCIA RESPECTO AL VALOR NORMAL DE ASAT	PORCENTAJE DE ELEVACIÓN DE ALAT
BLANCO	60,0	15,2	30,1
CONTROL POSITIVO	66,6	16,6	33,2
CONTROL NEGATIVO	86,3	36,3	72,6
GRUPO EXTRACTO 100%	50,4	0,4	0,8
GRUPO EXTRACTO 66%	72,4	22,46	44,9
GRUPO EXTRACTO 33%	88,8	38,83	77,6

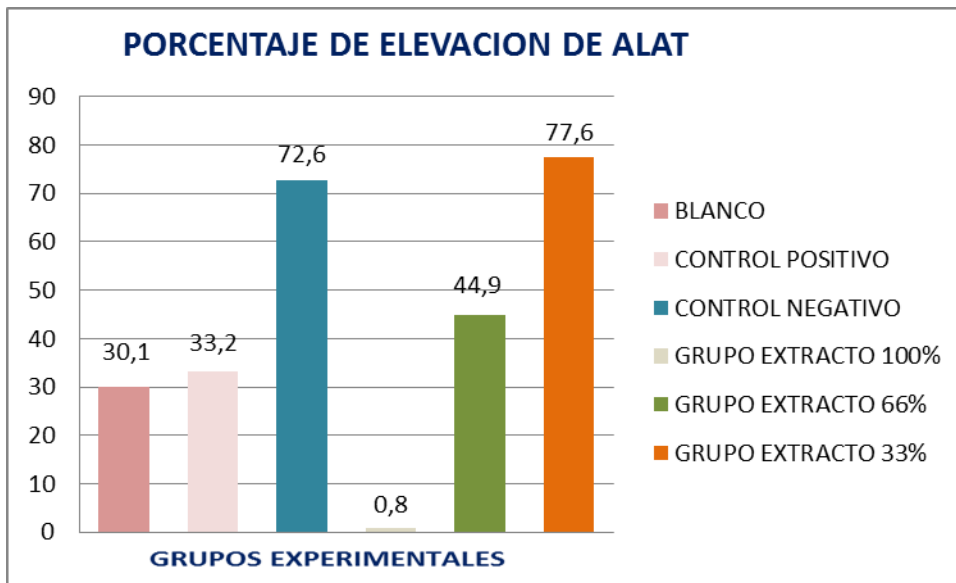


GRÁFICO No. 3 PORCENTAJE DE ELEVACIÓN DE ALAT EN RATAS (*Rattus norvegicus*) CON INTOXICACIÓN HEPÁTICA PRODUCIDA POR PARACETAMOL EN LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.

En el CUADRO No 18 y en el GRÁFICO No 3 se observó que el porcentaje de elevación de ALAT del grupo C fue el más alto pues ascendió al 77,6%, seguido por el control negativo cuyo porcentaje de elevación fue de 72,6%. El grupo B presentó una elevación del 44,9% de ALAT. Con el control positivo su porcentaje de elevación fue de 33,2%.

Con el extracto acuoso de las hojas de boldo al 100% el nivel de elevación de ALAT fue el más bajo con un valor de 0,8%, con lo que se determina que a esta concentración tiene actividad hepatoprotectora.

Estas enzimas ASAT y ALAT que se localiza principalmente en el hígado, cumplen con una función metabólica lo que permite transformar las sustancias; es decir que cuando se encuentran en cantidades adecuadas favorecen la producción de los aminoácidos, necesarios para la síntesis de proteínas en el hígado, por lo que se puede apreciar los valores de ASAT y ALAT en el CUADRO N° 13 y 14 que son valores bajos por lo que se determina que el extracto acuoso de Boldo a 100% tiene actividad hepatoprotectora

CUADRO N°.19 EXAMEN HISTOPATOLÓGICO A RATAS (*Rattus norvegicus*) CON INTOXICACIÓN HEPÁTICA PRODUCIDA POR PARACETAMOL PARA LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.

MUESTRA	EXAMEN MACROSCÓPICO	EXAMEN MICROSCÓPICO
RBB-12-BLANCO	Se recibe hígado Color: rojo vino Peso: 9.9g Largo: 6.4cm Ancho: 4.2cm Profundidad: 2cm	Lobulillos hepáticos ; arquitectura normal; hepatocitos normales, sinosoides de calibre normal, no se observan depósitos; espacios porta con vasos de calibre normal.
RCS-12-(CONTROL POSITIVO SIMARIN)	Se recibe hígado Color: rojo vino Peso: 4.9g Largo: 5.8 cm Ancho: 4.9 cm Profundidad: 1.8 cm	Un daño de hepatocitos del 10%
RCP-12-(CONTROL NEGATIVO PARACETAMOL)	Se recibe hígado. Color: rosa intenso Peso: 2.9g Largo: 4.7cm Ancho: 5.2cm Profundidad: 2,5cm	Dstrucción de los hepatocitos en 80%; áreas necróticas y hemorrágicas
RA1-12-(EXTRACTO ACUOSO DE BOLDO AL 100%)	Se recibe hígado. Color: rojo vino Peso: 5.6g Largo: 5.4cm Ancho: 4.2cm Profundidad: 2.1cm	Presenta un daño del 10% de los hepatocitos, áreas hemorrágicas.
RA2-12-(EXTRACTO ACUOSO DE BOLDO AL 66%)	Se recibe hígado. Color: rojo pálido Peso: 5.9g Largo: 4.9cm Ancho: 3.2cm Profundidad: 1.8cm	Presenta un daño de un 35% de los hepatocitos
RA3-12-(EXTRACTO ACUOSO AL 33%)	Se recibe hígado. Color: rojo pálido Peso: 5.7g Largo: 5.3cm Ancho: 2.9 cm Profundidad: 1.6cm	Presenta un daño de un 50% de los hepatocitos

En el CUADRO No. 19 se muestra los resultados del examen histopatológico.

CUADRO N° 20. PORCENTAJE DE DESTRUCCIÓN HEPÁTICA EN RATAS (*Rattus norvegicus*) ADMINISTRADAS PARACETAMOL PARA LA INVESTIGACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DEL BOLDO (*Peumus boldus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.

GRUPOS EXPERIMENTALES	PORCENTAJE DE DESTRUCCIÓN HEPÁTICA
Control positivo (SIMARIN)	10%
Control negativo (PARACETAMOL)	80%
Extracto acuoso de Boldo (<i>Peumus boldus</i>) al 100%	10%
Extracto acuoso de Boldo (<i>Peumus boldus</i>) al 66%	50%
Extracto acuoso de Boldo (<i>Peumus boldus</i>) al 33%	85%

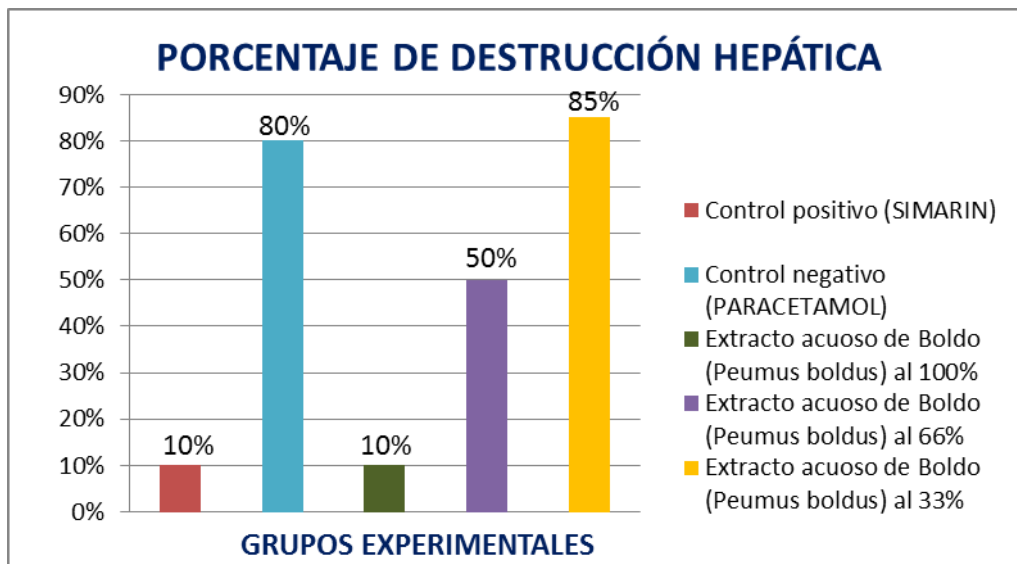


GRÁFICO No 4. PORCENTAJE DE DESTRUCCIÓN HEPÁTICA EN RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*) CON UNA INTOXICACIÓN HEPÁTICA PRODUCIDA POR PARACETAMOL EN LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.

CUADRO N° 21. DATOS DESCRIPTIVOS DE TRANSAMINASAS Descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
MEDICIÓN ASAT								
BLANCO	3	58,667	6,2132	3,5872	43,232	74,101	52,7	65,1
CONTROL POSITIVO	3	86,933	12,7115	7,3390	55,356	118,511	73,1	98,1
CONTROL NEGATIVO	3	124,267	4,9116	2,8357	112,066	136,468	118,6	127,3
GRUPO A	3	92,367	3,2624	1,8836	84,262	100,471	88,8	95,2
GRUPO B	3	115,600	7,3000	4,2147	97,466	133,734	108,3	122,9
GRUPO C	3	138,867	5,0540	2,9180	126,312	151,422	133,7	143,8
Total	18	102,783	28,0011	6,5999	88,859	116,708	52,7	143,8
MEDICIÓN ALAT								
BLANCO	3	42,467	6,3042	3,6397	26,806	58,127	36,3	48,9
CONTROL POSITIVO	3	66,567	8,5845	4,9563	45,242	87,892	56,9	73,3
CONTROL NEGATIVO	3	86,300	5,9152	3,4152	71,606	100,994	79,6	90,8
GRUPO A	3	50,400	2,2000	1,2702	44,935	55,865	48,2	52,6
GRUPO B	3	70,467	10,3026	5,9482	44,874	96,060	60,3	80,9
GRUPO C	3	88,833	6,6010	3,8111	72,436	105,231	82,3	95,5
Total	18	67,506	18,4994	4,3603	58,306	76,705	36,3	95,5

En el CUADRO No 19, No 20 y en el GRÁFICO No.4 se evidencia que el control negativo presentó un 80% de destrucción hepática, el extracto acuoso de Boldo al 33% presentó un 85% de destrucción, el extracto al 66% tuvo una destrucción hepática del 50%, el control positivo presentó una destrucción del 10% y con el extracto al 100% hubo una destrucción del 10%.

En el CUADRO No. 18 se evidencia que en las pruebas de ASAT y ALAT en el grupo C (extracto acuoso de boldo al 33%) al igual que el grupo B (extracto acuoso de boldo al 66%) presentan los valores elevados lo que nos indica que a estas concentraciones se incrementa la hepatotoxicidad; en cambio en el grupo A (extracto acuoso al 100%) nos indica que es la dosis más efectiva de administración.

La hepatoprotección del extracto acuoso de Boldo tuvo efecto en dosis del 100% motivo por el cual el hígado presentó menor destrucción de los hepatocitos, así como también menor destrucción de los lobulillos, de los sinusoides y de los vasos congestivos.

El extracto acuoso de Boldo basa su potencia antioxidante en compuestos importantes como los flavonoides y las catequinas que se conservan ambos solubles en agua; diversos estudios demuestran los efectos colagogos y coleréticos además de ser considerado como estimulante y protector hepático frente a diversos agentes potencialmente nocivos citada por la Comisión Alemana E. (35)

Algo que es muy importante señalar es que estos resultados están relacionados con la muerte de los animales durante la experimentación. Ya que las ratas del control negativo y del extracto acuoso de Boldo al 33% murieron después de la segunda administración del paracetamol debido a un mayor daño hepático.

Algunas ratas a pesar de poseer un hígado destruido evidenciado en el análisis histopatológico, sobrevivieron esto se explica a que el hígado de las ratas posee una gran "reserva funcional", se puede perder hasta el 67% o más de las células hepáticas, antes que se hagan evidentes problemas serios.

Las enfermedades hepáticas suelen presentarse en dos diferentes formas: agudas y crónicas. En las enfermedades agudas hay un repentino daño que afecta al hígado entero. A corto plazo, la falla hepática amenaza la vida, pero si el paciente sobrevive, el poder de regeneración del hígado le da una buena oportunidad de que se restablezcan las funciones normales. En cambio en las enfermedades crónicas, el daño se va produciendo gradualmente, durante un largo período de tiempo. (36)

CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES.

1. El tamizaje fitoquímico del extracto de las hojas de Boldo (*Peumus boldus*) demuestra baja evidencia de compuestos lactónicos, azúcares, quinonas y saponinas. La presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos y triterpenos se destaca en cantidades apreciables en dicha planta, siendo estos compuestos los que le confieren el efecto hepatoprotector al Boldo. (Cuadro N° 3)
2. El control de calidad de la droga seca de Boldo (*Peumus boldus*) demuestran que están dentro de los rangos establecidos respecto a la USP. (Cuadro N° 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8).
3. El Boldo (*Peumus boldus*) tiene actividad hepatoprotectora porque según las pruebas bioquímicas de transaminasas hepáticas realizadas a ratas administradas el extracto acuoso de boldo (*Peumus boldus*) al 100% la Aspartatoaminotransaminasa (ASAT) y la Alaninaaminotransaminasa (ALAT) se elevaron en un promedio de 0,7% del valor normal; con la dosis al 66% aumento en 46%, con la dosis 33% las transaminasas hepáticas se elevaron un 85,7% por encima del valor normal. (Cuadro N° 17 y 18)
4. El Boldo (*Peumus boldus*) tiene actividad hepatoprotectora en dosis altas. Según el estudio histopatológico en las ratas que se les administró el extracto acuoso al 100%, el paracetamol provoco un daño del 10% de destrucción hepática, en el extracto acuoso al 66%, tuvo un 50% de daño; mientras que en el extracto acuoso al 33%, el paracetamol provoco el 85% de destrucción hepática. (Cuadro N° 19 y 20)

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

1. Elaborar una forma farmacéutica a base del extracto de las hojas de Boldo (*Peumus boldus*) en dosis efectiva, ya que gracias a su excelente propiedad hepatoprotectora ayudará en el tratamiento coadyuvante a las personas que padecen de alguna enfermedad hepática.
2. Difundir los datos obtenidos en la investigación a la población ya que es un aporte importante, conocer las dosis de administración del Boldo utilizado como hepatoprotector debido a que si se utiliza en dosis inadecuadas podría causar dificultades en la salud de los seres humanos.
3. Realizar nuevos estudios fitoquímicos para cuantificar los componentes presentes en las hojas de Boldo (*Peumus boldus*) e investigar nuevas propiedades.

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN

En el laboratorio de Productos Naturales y el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia - ESPOCH. Se realizó una investigación con el objetivo de determinar la actividad hepatoprotector de las hojas de Boldo en ratas, con hepatotoxicidad inducida por paracetamol.

Se utilizó el extracto de boldo al mismo que se realizó el control de calidad y el tamizaje fitoquímico. Se utilizaron ratas divididas en 3 grupos denominados: GA, GB, GC quienes recibieron el extracto, a una concentración de 100%, 66% y 33% respectivamente por 9 días, al séptimo día se administró paracetamol. Se realizó pruebas de (ASAT) y (ALAT) y se extrajo los hígados para el análisis histopatológico. Para el análisis de datos se utilizó el test ANOVA.

En el tamizaje fitoquímico se encontró alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos, y triterpenos. En la prueba de ASAT y ALAT en el grupo GA se elevaron en un promedio de 0,7% del valor normal; GB aumentó un 46% y GC un 85,7%. En el examen histopatológico el GA tuvo 10% de destrucción hepática, GB 50% y GC 85%. En el análisis estadístico se comprobó que las transaminasas están en proporción directa con la destrucción hepática.

El Boldo es hepatoprotector ya que en las pruebas de transaminasas y en el examen histopatológico se evidenció un leve daño hepático con dosis altas del extracto.

Se recomienda elaborar una forma farmacéutica a base del boldo que debe ser usado como tratamiento coadyuvante, en personas con enfermedades hepáticas.

SUMMARY

A research in order to determine the hepatoprotective activity of Boldo has been conducted at the Natural Products Laboratory and the Vivarium of the Biochemistry and Pharmacy School at ESPOCH. This research was carried out in rats which had been induced hepatotoxicity with paracetamol, a common analgesic.

Boldo extract was used after a careful quality control and phytochemical screening. Rats were divided in three different groups named as follows: GA, GB, GC. These groups received the extract with a concentration of 100%, 66%, 33% respectively for nine (9) days. On the seventh day paracetamol was administered. AST and ALT tests were done and the animal livers were extracted for histopathological analysis. Test ANOVA was used for this data analysis.

The phytochemical screening showed alkaloids, flavonoids, phenolic compounds, and triterpenes. AST and ALT tests showed that the group GA raised an average of 0.7 % from the normal value; GB increased 46% and GC 85.7%. The histopathological analysis showed that GA 10% of liver destruction, GB 50% and GC 85%. The statistical analysis proved that transaminases are in direct proportion with liver destruction.

The results affirmed that Boldo is a hepatoprotective herb since the transaminase tests and the histopathological analysis evidenced little liver damage with high extract doses

It is recommended to produce a phytomedicine based on Boldo which should be used as an aid treatment in people with liver diseases.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **ALONSO, J.**, Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos., Buenos AireArgentina., CORPUS., 2004., Pp., 118-122.
2. **ARISTIL, P.**, Farmacología Básica y Clínica., 5ª ed., México D.F México., Mac Graw Hill., 2010., Pp., 200-204
3. **BERTRAM, G.**, Farmacología Básica y Clínica., 8a ed., México D.F México., El Manual Moderno., 2003., Pp., 52-71.
4. **BOZZO, J.**, Implementación y desarrollo de una planta elaboradora de extracto de hierbas (Boldo y Rosa Mosqueta)., Santiago de Chile., 2006., Pp., 21-29
5. **CÁRDENAS, M.**, Farmacología., Riobamba – Ecuador., Workcenter., 2011. Pp., 501-511.
6. **CONTRERA, E.**, Retorno a las Plantas Medicinales., Madrid España., Ciencia y Técnica., 2004., Pp., 54.

7. **DAVIDSOHN,I., BERNARD, J.,** Diagnóstico Clínico por el Laboratorio., 6ª ed Barcelona-España.,2003., Pp., 844-851.
8. **DOMÍNGUEZ, X.,** Métodos de investigación de Fitoquímica., México D.F México., Limusa., 2004., Pp., 793.
9. **FINKEL, R.,** Farmacología., Barcelona - España., Lippincott., 2009., Pp., 430-531.
10. **FLOREZ, J.,** Farmacología Humana., México D.F - México., 2003. Pp., 204-205.
11. **GOODMAN, G.,** Farmacologia humana., 10a ed., México D.F México., Mc Graw-Hill Interamericana., 2003., Pp., 125.
12. **GUYTON, A.,** Tratado de Fisiología Médica., 10a ed., México D.F México., Mc Graw - Hill Interamericana., 2001., Pp., 961-966.
13. **HALVERSON, M.,** Guía para cuidado y uso de animales de experimentación., Argentina-Buenos Aires., 2005., Pp., 90.
14. **MOORE, K.,** Anatomía con orientación clínica., 3a ed., Madrid España., Médica Panamericana., 1996., Pp., 200-203.
15. **NORMAS RAMALES.,** Drogas crudas y Extractos y tinturas., NRSP., 1992., Pp., 309-315.

16. **OSORIO, D.,** Plantas Aromáticas y Medicinales., Bogotá-Colombia., Grupo Latino., 2003., Pp., 13-14.
17. **PALTÁN, J.,** Anatomía., Fisiología e Higiene., 17a ed., Quito Ecuador., HOLOS., 2004., Pp., 96-97.
18. **PAMPLONA, J.,** Salud por las plantas medicinales., 1ª ed., Madrid – España Safeliz., 2006., Pp., 198-199.
19. **POSEL, P.,** Esquema de Anatomía- Histología., Madrid- España., Marban., 2000., Pp., 654- 658.
20. **PRIVES, M.,** Anatomía Humana., 5a ed., Mir-Moscú., 1995., Pp., 238-240.
21. **RODRIGUEZ, M.,** Anatomía-Fisiología e Higiene., 6a ed., México D.F México., Progreso., 2003., Pp., 162-165
22. **SAMANIEGO, R.,** Fundamentos de la Farmacología Médica., Quito-Ecuador. Universitaria., 1997., Pp., 111-116.
23. **SARAVIA, A.,** Manual de Ensayos Toxicológicos y Farmacológicos Experimentales in vivo e in vitro., Guatemala - Guatemala., 2005., Pp., 66-98.
24. **SARRAZÍN, L.,** Vademecun Farmacéutico., 19ª ed., Quito-Ecuador., 2005., EDIFARM., 2009., Pp 143-167

25. **WAGNER, H.**, Plant Drug Analysis., 2a ed., Munich-Germany., 1996 ., Pp 45-46
26. **ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DEL BOLDO (*Peumus Boldus*)**
<http://www.tupincho.net/foro/los-hepatoprotectores-y-su-uso-correcto-t1038616-html>
2012/08/11
27. **CENTRO LATINO AMERICANO Y CARIBEÑO DE DEMOGRAFÍA (CELADE).**
www.cepar.org.ec/estadisticas/pubsalud/salind1c.html
2012/03/25
28. **CONSUMO DE PARACETAMOL EN EL ÁREA DE CIENCIAS DE LA SALUD**
http://www.infarmate.org.mx/pdfs/enero_febrero07/paracetamo117.pdf
2012/08/15
29. **CONTRAINDICACIONES DEL PARACETAMOL**
<http://www.lafarmacologia.com/el-paracetamol-y-susefectos>
2012/08/16
30. **COMPUESTOS HEPATOTOXICOS**
<http://www.fmed.uba.ar/depto/toxico1/hepatotoxicidad.pdf>
2012/08/16

31. CLASIFICACIÓN DE HEPATOTOXICIDAD

http://escuela.med.puc.cl/publ/dha/dha_12498.html

2012/08/15

32. DESCRIPCIÓN, HABITAT Y DISTRIBUCIÓN DEL BOLDO

https://sites.google.com/site/floranativayexoticaenbarana_flora_nativa-v

2012/10/01

33. DROGAS HEPATOPROTECTORAS

www2.uah.es/sancho/quimica/Tema%2017/Tema%2017doc

2012/10/11

34. EFECTO ANTIOXIDANTE

<http://sibdi.ucr.ac.cr/CIMED/cimed26.pdf> 23-10-2012

2012/10/11

35. EFECTO HEPATOPROTECTOR

http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/cimed/v13_n1/pd/a05v13n1.pdf

2012/10/28

36. ENFERMEDADES HEPÁTICAS

<http://www.dr.falkpharma.de/pacientes/enfermedades-y-terapeutica/enfermedades-hepaticas/?L=3>

2012/11/27

37. ENFERMEDADES QUE CAUSAN NIVELES DE TRANSAMINASAS ANORMALES

http://hepato.com/p_transaminases/transaminases_2001051.html
2013/01/07

38. ETIMOLOGÍA DEL BOLDO (*Peumus boldus*)

<http://www.arbolesornamentales.es/Peumusboldus.htm>
2013/01/08

39. FÁRMACOS QUE CAUSAN HEPATOTOXICIDAD

<http://www.hcvadvocate.org/pdf/medicamentos.pdf>
2013/01/11

40. FISIOLOGÍA HEPÁTICA

<http://mvz.unipaz.edu.co/textos/lecturas/morfodinamica/fisiologia-.pdf>
2013/01/08

41. HEPATOTOXICIDAD

<http://es.wikipedia.org/wiki/Hepatotoxicidad>
2013/01/15

42. HISTOLOGÍA ESTROMA PARÉNQUIMA

<http://higado-med-aa.blogspot.com/2009/04/vascularizacion.html>
2013/01/15

43. HISTOLOGÍA HEPÁTICA

<http://www.monografias.com/trabajos30/higado/higado.shtml>
2013/01/17

44. INTOXICACIÓN POR PARACETAMOL

<http://www.cfnavarra.es/salud/PUBLICACIONES/Libro%20farmacos.pdf>
2013/01/18

45. MANIFESTACIÓN CLÍNICA DE LAS ENFERMEDADES HEPÁTICAS

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000205.htm>
2013/01/18

46. MANUAL DE FITOTERAPIA

<http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap7.pdf>
2013/01/17

47. MECANISMO DE ACCIÓN PARACETAMOL

<http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol26/sup1/suple5a.html>
2013/01/17

48. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA SILIMARINA

<http://www.plmfarmacias.com/ecuador/DEF/PLM/productos/25979.htm>
2013/01/20

49. MECANISMO DE DAÑO HEPÁTICO

<http://es.scribd.com/doc/54181996/10/Mecanismos-de-dano-hepatico>
2013/01/20

50. METABOLISMO HEPÁTICO DE DROGAS

<http://es.wikipedia.org/wiki/Hepatotoxicidad>
2013/01/22

51. NIVEL DE TRANSAMINASAS EN LA SANGRE

<http://es-cost.finanzalarm.com/details/Aminotransferasa.html>
2013/01/22

52. PAPEL DE LAS AMINOTRANSFERAS EN EL METABOLISMO

<http://es.wikipedia.org/wiki/Aminotransferasa>
2013/01/22

53. PARACETAMOL Y SUS EFECTOS

<http://www.lafarmacologia.com/el-paracetamol-y-sus-efectos>
2013/01/23

54. PLANTAS HEPATOPROTECTORAS

<http://www.remediosnaturales.org/Noticias/Muestra.?I=70&IdCategoria=4>
2013/01/08

55. PRUEBAS CLÍNICAS HEPÁTICAS

http://www.labyes.com.ar/espanol/trihepat_pruebas.html
2013/01/23

56. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL BOLDO

<http://remedios.innatia.com/c-boldo-propiedades/a-planta-boldo-propiedades.html>

2013/01/23

57. REACCIONES ADVERSAS AL MEDICAMENTO

<http://www.ispch.cl > ANAMED > Farmacovigilancia>

2013/01/24

58. SILIMARINA PROPIEDADES Y BENEFICIOS DE UNA PLANTA CON EFECTOS DESINTOXICANTES Y PROTECTORES.

<http://www.bionatural.es/2010/011a-silimarina-propiedades-beneficios-html>

2013/01/24

59. SIMARIN

<http://www.pharmabrand.com.ec/es/producto-simarin>

2013/01/24

60. SITUACIÓN DEL HÍGADO

<http://grageas.com.ar/higado.html>

2013/01/25

61. TÉCNICA PARA DETERMINAR TRANSAMINASAS

http://www.wienerlab.com.ar/wiener/catalogo/archivos/6306transaminasas200_sp.pdf

2013/01/25

62. TOXICIDAD DEL BOLDO

<http://www.plantasparacurar.com/toxicidad-del-boldo/>
2013/01/23

63. TRANSAMINASAS HEPÁTICAS

<http://www.saludalia.com/analisis-clinicos/transaminasa>
2013/01/24

**64. TRANSTORNOS HISTOPATOLÓGICOS POR
PARACETAMOL**

http://www.infarmate.org.mx/pdfs/enero_febrero07/paracetamol17.pdf
2013/01/25

65. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPÁTICA

<http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/transaminasas.pdf>
2013/01/26

66. VALORES NORMALES DE LAS ENZIMAS HEPÁTICAS

http://scielo.sid.cu/scielo.php?pid=S1028-47962006005&script=sci_arttex
2013/01/28

ANEXOS

ANEXO No 1. ELABORACIÓN DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.



FOTOGRAFÍA No. 5 ELABORACIÓN DEL EXTRACTO DE BOLDO (*Peumus boldus*). LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.

ANEXO No 2. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO, ETÉREO Y ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.



FOTOGRAFIA No. 6 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO, ETÉREO Y ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.

ANEXO No 3. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD, CENIZAS TOTALES Y CENIZAS INSOLUBLES EN AGUA Y CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO CLORHÍDRICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.



FOTOGRAFÍA No. 7 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD, CENIZAS TOTALES Y CENIZAS INSOLUBLES EN AGUA Y CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO CLORHÍDRICO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.

ANEXO No 4. DETERMINACIÓN DEL INDICE DE REFRACCIÓN, pH, SÓLIDOS TOTALES DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.



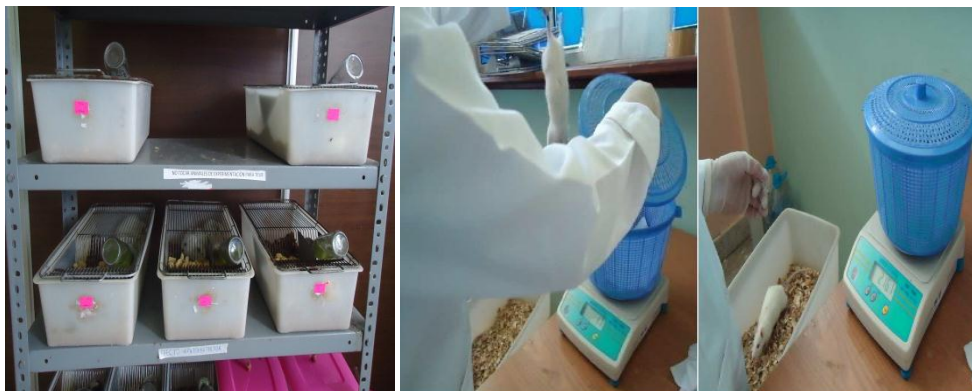
FOTOGRAFÍA No. 8 DETERMINACIÓN DEL INDICE DE REFRACCIÓN, pH, SÓLIDOS TOTALES DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.

ANEXO No 5. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.



FOTOGRAFÍA No. 9 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*).LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.

ANEXO No 6. GRUPOS EXPERIMENTALES DE RATAS (*Rattus norvegicus*); CONTROL POSITIVO, CONTROL NEGATIVO, TRATAMIENTOS 100%, 66%, Y 33%, AMBIENTACIÓN Y CONTROL DE PESOS LABORATORIO DE FITOQUÍMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.



FOTOGRAFÍA No. 10 GRUPOS EXPERIMENTALES DE RATAS (*Rattus norvegicus*); CONTROL POSITIVO, CONTROL NEGATIVO, TRATAMIENTOS 100%, 66%, Y 33%, AMBIENTACIÓN Y CONTROL DE PESOS LABORATORIO DE FITOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2012.

ANEXO No 7. ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*) A LAS RATAS (*Rattus norvegicus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.



FOTOGRAFÍA No. 11 ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*) A LAS RATAS (*Rattus norvegicus*).BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.

ANEXO No 8. EXTRACCIÓN DE SANGRE DE LA PARTE OCULAR DE LAS RATAS (*Rattus norvegicus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.



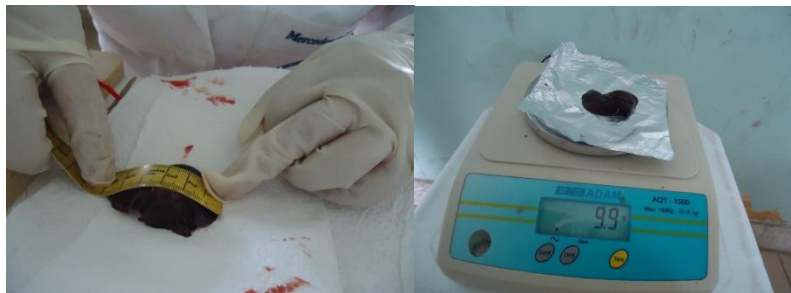
FOTOGRAFÍA No. 12 EXTRACCIÓN DE SANGRE DE LA PARTE OCULAR DE LAS RATAS (*Rattus norvegicus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012

ANEXO No 9. DISECCIÓN DE LAS RATAS (*Rattus norvegicus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.



FOTOGRAFÍA No. 13 DISECCIÓN DE LAS RATAS (*Rattus norvegicus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.

ANEXO No. 10 EXAMEN MACROSCOPICO DEL HÍGADO DE LAS RATAS (*Rattus norvegicus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.



FOTOGRAFÍA No.14 EXAMEN MACROSCOPICO DEL HÍGADO DE LAS RATAS (*Rattus norvegicus*).BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.

ANEXO No 11 HÍGADOS DE LAS RATAS (*Rattus norvegicus*) A TRATAMIENTOS DEL 100%, 66% Y 33%, BLANCO, CONTROL POSITIVO, CONTROL NEGATIVO. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.



FOTOGRAFÍA No. 15 HÍGADOS DE LAS RATAS (*Rattus norvegicus*) A TRATAMIENTOS DEL 100%, 66% Y 33%, BLANCO, CONTROL POSITIVO, CONTROL NEGATIVO.

ANEXO No 12. MUESTRA DE SANGRE DE LAS RATAS (*Rattus norvegicus*) PARA LA DETERMINACIÓN DE ASAT, ALAT. LABORATORIO CLINICO LACFERIOBAMBA. DICIEMBRE 2012.



FOTOGRAFIA No. 16 MUESTRA DE SANGRE DE LAS RATAS (*Rattus norvegicus*) PARA LA DETERMINACIÓN DE ASAT, ALAT. LABORATORIO CLINICO LACFERIOBAMBA. DICIEMBRE 2012.

ANEXO No 13. EXAMEN HISTOPATOLÓGICO DE LOS HÍGADOS DE LAS RATAS (*Rattus novergicus*). LABORATORIO HISTOPATOLÓGICO Dr OSWALDO DUQUE ANDRADE ENERO 2013



FOTOGRAFÍA No 17. EXAMEN HISTOPATOLÓGICO DE LOS HÍGADOS DE LAS RATAS (*Rattus novergicus*). LABORATORIO HISTOPATOLÓGICO Dr OSWALDO DUQUE ANDRADE ENERO 2013

ANEXO No 14. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DEL PESO BASAL Y FINAL DE RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*) CON RESPECTO A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS APLICADOS CON EL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*) EN LOS REACTIVOS BIOLÓGICOS EN LA INVESTIGACIÓN.

CUADRO No. 22 MEDICIÓN DEL PESO BASAL Y FINAL DE RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*) DURANTE LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.

GRUPOS EXPERIMENTALES	SEXO	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)
BLANCO	HEMBRA	156,3	158,2
BLANCO	HEMBRA	158,6	152,3
BLANCO	HEMBRA	150,2	145,4
CONTROL POSITIVO	HEMBRA	161,8	153,2
CONTROL POSITIVO	HEMBRA	155,9	152,6
CONTROL POSITIVO	HEMBRA	165,7	162,9
CONTROL NEGATIVO	MACHO	198	180,2
CONTROL NEGATIVO	MACHO	189,8	183,2
CONTROL NEGATIVO	MACHO	188,1	186,4
GRUPO A	MACHO	164,1	160,8
GRUPO A	MACHO	168,3	167,2
GRUPO A	MACHO	166,2	164,9
GRUPO B	MACHO	227,3	207,7
GRUPO B	MACHO	222,9	214,3
GRUPO B	MACHO	225,8	206,9
GRUPO C	MACHO	194,9	190,4
GRUPO C	MACHO	201,6	198,9
GRUPO C	MACHO	198,7	188,3
TOTAL		183,01	176,32

CUADRO No. 23 PESO EN GRAMOS DE LAS RATAS WISTAR. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. ENERO 2013

		Descriptivos							
		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
PESO INICIAL	BLANCO	3	155,033	4,3409	2,5062	144,250	165,817	150,2	158,6
	CONTROL POSITIVO	3	161,133	4,9339	2,8486	148,877	173,390	155,9	165,7
	CONTROL NEGATIVO	3	191,967	5,2937	3,0563	178,816	205,117	188,1	198,0
	GRUPO A	3	166,200	2,1000	1,2124	160,983	171,417	164,1	168,3
	GRUPO B	3	225,333	2,2368	1,2914	219,777	230,890	222,9	227,3
	GRUPO C	3	198,400	3,3601	1,9399	190,053	206,747	194,9	201,6
	Total		18	183,011	25,5992	6,0338	170,281	195,741	150,2
PESO FINAL	BLANCO	3	151,967	6,4065	3,6988	136,052	167,881	145,4	158,2
	CONTROL POSITIVO	3	156,233	5,7813	3,3378	141,872	170,595	152,6	162,9
	CONTROL NEGATIVO	3	183,267	3,1005	1,7901	175,565	190,969	180,2	186,4
	GRUPO A	3	164,300	3,2419	1,8717	156,247	172,353	160,8	167,2
	GRUPO B	3	209,633	4,0612	2,3447	199,545	219,722	206,9	214,3
	GRUPO C	3	192,533	5,6128	3,2405	178,590	206,476	188,3	198,9
	Total		18	176,322	21,6537	5,1038	165,554	187,090	145,4

En el CUADRO No 22 se observó que en promedio las ratas del control negativo y el grupo B son aquellas que poseen mayor peso, seguidas por aquellas que están en el grupo A. Las ratas que presentan menor peso promedio son las que pertenecen al grupo C (extracto al 66%).

Para identificar si existe diferencia estadística en el peso promedio de las ratas, se realiza un análisis de varianza (ANOVA), si existiera diferencia se aplica una prueba de Tukey para conocer cómo se agrupan los valores, así tenemos las hipótesis:

H0: Los pesos promedios de las ratas en los diferentes grupos son iguales.

H1: Los pesos promedios de las ratas en los diferentes grupos no son iguales.

Por lo cual tenemos los siguientes resultados.

CUADRO No. 23 ANOVA DEL PESO DE RATAS WISTAR. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH ENERO 2013

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
PESO INICIAL	Inter-grupos	10956,591	5	2191,318	143,047	,000
	Intra-grupos	183,827	12	15,319		
	Total	11140,418	17			
PESO FINAL	Inter-grupos	7685,838	5	1537,168	64,684	,000
	Intra-grupos	285,173	12	23,764		
	Total	7971,011	17			

En el CUADRO No 23 se observó que con el valor de significancia inferior a 0,01, se confirma que no existen diferencias altamente significativas en los pesos promedio. Para identificar los grupos se realiza una prueba de Tukey, así:

CUADRO No. 24 PRUEBA DE TUKEY PARA DETERMINAR LOS PESOS EN RATAS WISTAR. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. ENERO 2013

PESO INICIAL

HSD de Tukey^a

TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
BLANCO	3	151,967		
CONTROL POSITIVO	3	156,233		
GRUPO A	3	164,300		
CONTROL NEGATIVO	3		183,267	
GRUPO C	3		192,533	
GRUPO B	3			209,633
Sig.		,077	,255	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

PESO FINAL

HSD de Tukey^a

TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
BLANCO	3	155,033			
CONTROL POSITIVO	3	161,133	161,133		
GRUPO A	3		166,200		
CONTROL NEGATIVO	3			191,967	
GRUPO C	3			198,400	
GRUPO B	3				225,333
Sig.		,442	,622	,389	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

ANEXO No 15. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LAS TRANSAMINASAS (ASAT, ALAT) CON RESPECTO A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS APLICADOS CON EL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*) EN LOS REACTIVOS BIOLÓGICOS EN LA INVESTIGACIÓN .

CUADRO N° 25 PRUEBA BIOQUÍMICA DE ASAT EN RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*) CON HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR PARACETAMOL EN LA INVESTIGACIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE BOLDO (*Peumus boldus*). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2012.

GRUPOS EXPERIMENTALES	DEFINICIÓN DE LOS GRUPOS	SEXO	N	ASAT (U/L)	ALAT (U/L)
BLANCO	B1	HEMBRA	3	65,1	42,2
	B2			58,7	38,9
	B3			69,3	45,8
CONTROL POSITIVO	C+ 1	HEMBRA	3	98,1	56,9
	C+ 2			73,1	69,5
	C+ 3			89,6	73,3
CONTROL NEGATIVO	C- 1	HEMBRA	3	127,3	88,5
	C- 1			118,6	79,6
	C- 1			126,9	90,8
GRUPO A (EXTRACTO 100%)	GA+1	MACHO	3	95,2	48,2
	GA +2			93,1	52,6
	GA+3			88,8	50,4
GRUPO B (EXTRACTO 66%)	GB+1	MACHO	3	108,3	80,9
	GB+2			122,9	60,3
	GB+3			115,6	70,2
GRUPO C (EXTRACTO 33%)	GC+1	MACHO	3	133,7	82,3
	GC+2			139,1	88,7
	GC+3			143,8	95,5

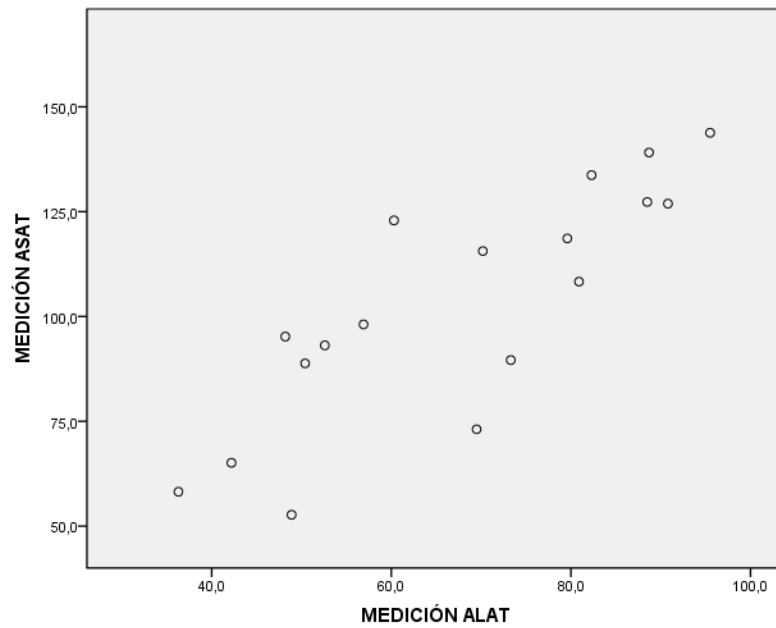


GRÁFICO No. 1 RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE TRANSAMINASAS

Mediante una gráfica de dispersión podemos observar la relación lineal positiva que tienen las mediciones de ALAT y ASAT, es decir tienen una relación directamente proporcional, si la medición en ASAT sube ocurrirá lo mismo con ALAT.

Através de mínimos cuadrados ordinarios se puede determinar que su coeficiente de correlación es de 69,23% y el de Determinación es de 47,92%, por tanto su explicación es clara.

CUADRO N° 26. DATOS DESCRIPTIVOS DE TRANSAMINASAS Descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
MEDICIÓN ASAT								
BLANCO	3	58,667	6,2132	3,5872	43,232	74,101	52,7	65,1
CONTROL POSITIVO	3	86,933	12,7115	7,3390	55,356	118,511	73,1	98,1
CONTROL NEGATIVO	3	124,267	4,9116	2,8357	112,066	136,468	118,6	127,3
GRUPO A	3	92,367	3,2624	1,8836	84,262	100,471	88,8	95,2
GRUPO B	3	115,600	7,3000	4,2147	97,466	133,734	108,3	122,9
GRUPO C	3	138,867	5,0540	2,9180	126,312	151,422	133,7	143,8
Total	18	102,783	28,0011	6,5999	88,859	116,708	52,7	143,8
MEDICIÓN ALAT								
BLANCO	3	42,467	6,3042	3,6397	26,806	58,127	36,3	48,9
CONTROL POSITIVO	3	66,567	8,5845	4,9563	45,242	87,892	56,9	73,3
CONTROL NEGATIVO	3	86,300	5,9152	3,4152	71,606	100,994	79,6	90,8
GRUPO A	3	50,400	2,2000	1,2702	44,935	55,865	48,2	52,6
GRUPO B	3	70,467	10,3026	5,9482	44,874	96,060	60,3	80,9
GRUPO C	3	88,833	6,6010	3,8111	72,436	105,231	82,3	95,5
Total	18	67,506	18,4994	4,3603	58,306	76,705	36,3	95,5

En el CUADRO N° 26 puede ver los estadísticos descriptivos de cada una de sus mediciones, los intervalos de confianza son al 95%, lo más rescatable de aquí son las medias, pues para hacer el siguiente paso se deben ordenar de manera ascendente para poder determinar mediante una prueba de tukey que tratamientos pueden ser agrupados.

Antes de pasar a realizar un ANOVA debemos tener la seguridad que los datos sean homocedásticos (varianzas iguales), para lo cual utilizamos la prueba de Levene.

CUADRO No. 27 PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
MEDICIÓN ASAT	1,359	5	12	,306
MEDICIÓN ALAT	,874	5	12	,527

Los valores P (Sig.) son mayores al 0,05 que es el valor crítico, por tal razón podemos determinar que existe una homogeneidad de varianzas en las mediciones de ASAT y ALAT.

Realizamos ANOVA, para las dos mediciones.

CUADRO No. 28 ANOVA DE UN FACTOR DE TRANSAMINASAS

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
MEDICIÓN ASAT	Inter-grupos	12701,452	5	2540,290	48,574	,000
	Intra-grupos	627,573	12	52,298		
	Total	13329,025	17			
MEDICIÓN ALAT	Inter-grupos	5211,903	5	1042,381	20,642	,000
	Intra-grupos	605,967	12	50,497		
	Total	5817,869	17			

Las hipótesis son:

H₀: Las mediciones promedio de ASAT son iguales.

H₁: Al menos una de las mediciones promedio de ASAT no son iguales.

H₀: Las mediciones promedio de ALAT son iguales.

H₁: Al menos una de las mediciones promedio de ALAT es diferente.

Al fijarnos en los valores P (Sig.) son inferiores al 0,05 y por tal razón rechazamos las hipótesis nulas y tomamos las alternativas que nos dicen que existe diferencia entre las medias de las mediciones de ASAT y ALAT.

Ahora queda saber que tratamientos son los diferentes así que para eso utilizaremos la prueba de Tukey.

Los resultados son los siguientes:

CUADRO No. 29 PRUEBA DE TUKEY PARA LA MEDICIÓN ASAT DE RATAS WISTAR. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. ENERO 2013

		MEDICIÓN ASAT				
TRATAMIENTOS		N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
HSD de Tukey ^a	BLANCO	3	58,667			
	CONTROL POSITIVO	3		86,933		
	GRUPO A	3		92,367		
	GRUPO B	3			115,600	
	CONTROL NEGATIVO	3			124,267	124,267
	GRUPO C	3				138,867
	Sig.			1,000	,934	,689

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Las conclusiones que podemos obtener de las mediciones de ASAT es:

Blanco C+ GA GB C- GC

Existen cuatro grupos (al 95%), donde en promedio la medición de ASAT del grupo blanco tienen el menor valor, le sigue el tratamiento el control positivo, el extracto al 100%, extracto al 25% no presentan una diferencia estadística y entre el control positivo, extracto 100% y el control negativo tampoco difieren estadísticamente.

Visto de otra manera tenemos:

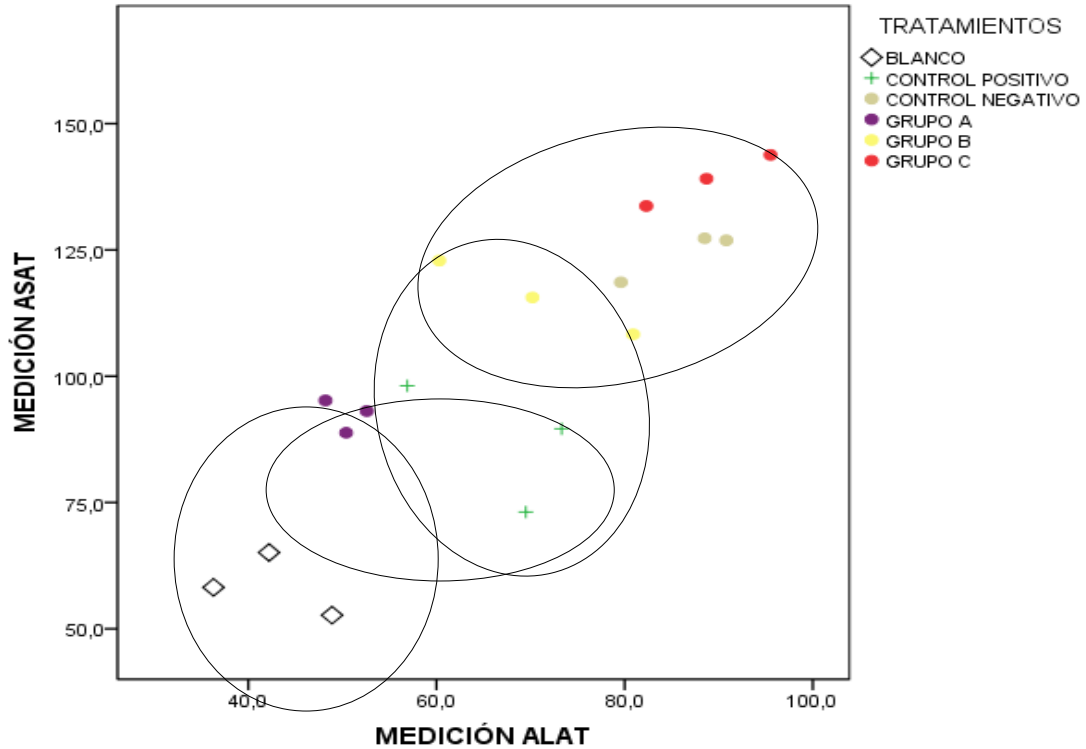


GRÁFICO No. 2 MEDICIÓN DE ASAT

En lo que respecta a la medición de ALAT tenemos los siguientes resultados

CUADRO No. 30 PRUEBA DE TUKEY PARA MEDICIÓN DE ALAT EN RATAS WISTAR.

		MEDICIÓN ALAT				
TRATAMIENTOS		N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
HSD de Tukey ^a	BLANCO	3	42,467			
	GRUPO A	3	50,400	50,400		
	CONTROL POSITIVO	3		66,567	66,567	
	GRUPO B	3			70,467	70,467
	CONTROL NEGATIVO	3				86,300
	GRUPO C	3				88,833
	Sig.			,744	,128	,982

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. ENERO 2013

Blanco GA C+ GB C- GC

Se forman cuatro grupos, entre las mediciones de blanco y el extracto al 100% no existe una diferencia estadística significativa y forman el primer grupo, el segundo grupo está formado por el extracto al 100% y el control positivo, el control positivo y el extracto al 66% forman el tercer grupo y el último grupo está formado por el extracto al 66%, control negativo y el extracto al 33%, es decir no hay diferencia en aplicar el extracto al 33% o únicamente hacerle el daño hepático sin dar ninguna dosis.

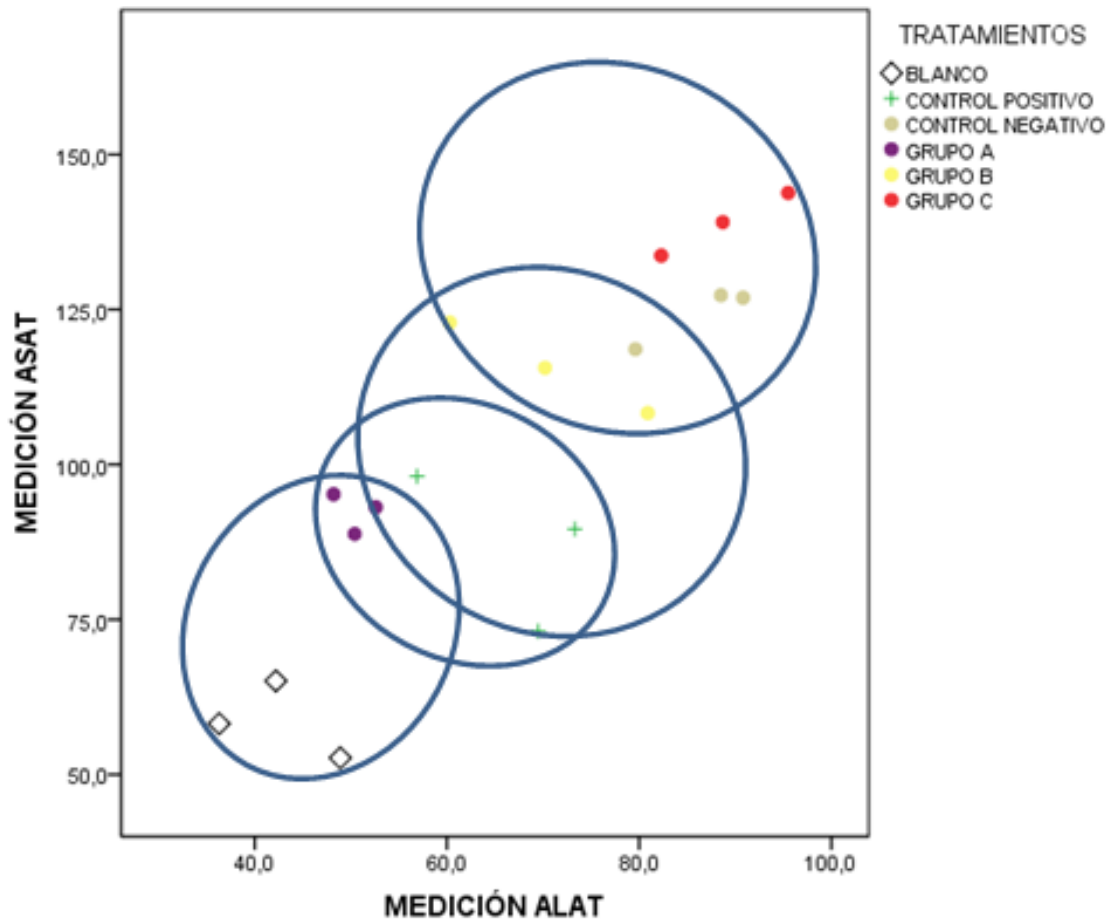


GRÁFICO No. 3 MEDICIÓN DE ALAT