



---

UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES  
CHIMBOTE

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE  
FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**EFEECTO HEPATOPROTECTOR DEL EXTRACTO  
HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Annona muricata*  
(GUANÁBANA) EN *Rattus rattus var. albinus* CON  
HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORA

**Bach. VÁSQUEZ GUEVARA YANH YAVHE**

ASESOR

**Mgr. LEAL VERA CÉSAR ALFREDO**

**TRUJILLO – PERÚ**

**2019**

## **JURADO EVALUADOR DE TESIS**

Dr. Jorge Luis Díaz Ortega

**Presidente**

Mgtr. Nilda María Arteaga Revilla

**Miembro**

Mgtr. Luisa Olivia Amaya Lau

**Miembro**

Mgtr. César Alfredo Leal Vera

**Docente Tutor Investigador**

## **AGRADECIMIENTO**

*A Dios por darme la fortaleza y perseverancia necesaria en aquellos momentos de dificultad.*

*A mis padres, mi esposo e hija por su amor y comprensión en esta larga etapa.*

*Agradezco a mis queridos profesores quienes me brindaron sus conocimientos y apoyo para la realización de mi tesis.*

## **DEDICATORIA**

*A Dios que me dio la bendición de tener un hermosa familia ,quienes son mi mayor motivación para salir adelante , a mis padres Nazario Vásquez y Carmen Guevara ,porque siempre me inculcaron valores y sobre todo a ser perseverante para lograr mis metas trazadas.*

*A mi esposo e hija, por su amor, apoyo y comprensión para vencer todos los obstáculos y adversidades que se me presentaron en mi vida universitaria.*

*A mi abuelita, que siempre me cuida y protege desde el cielo. A mis amigas y compañeras. A todas las personas que me brindaron palabras de aliento para continuar con mis metas trazadas.*

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación, de tipo experimental, nivel explicativo y enfoque cuantitativo, se realizó con el objetivo de demostrar el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico (EHA) de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) en *Rattus rattus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida. Se utilizaron 24 especímenes machos, distribuidos en 4 grupos: Grupo control positivo, grupo control negativo y grupos experimentales I y II. Al grupo control positivo y experimentales se les indujo hepatotoxicidad administrándoles por vía oral una dosis de 0,2ml/100g pc de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>). A los grupos experimentales I y II se les administró por vía oral extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* (Guanábana) a dosis de 200mg/kg pc y 400mg/kg pc respectivamente. Para evaluar el efecto hepatoprotector del extracto, se utilizaron niveles séricos de GOT, GPT y FAL. Los resultados presentaron disminución estadísticamente significativa de los niveles séricos de GOT, GPT y FAL en ambos grupos experimentales, los mismos que fueron sometidos a las pruebas de Chapiro–Wilks, ANOVA y Tukey, concluyendo que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) tienen efecto hepatoprotector en *Rattus rattus var albinus*.

**Palabras Clave:** *Annona muricata*, guanábana, hepatoprotector, tetracloruro de carbono.

## ABSTRACT

The present research work, of an experimental type, explanatory level and quantitative approach, was carried out with the objective of demonstrating the hepatoprotective effect of the hydroalcoholic extract (EHA) of the leaves of *Annona muricata* (Guanábana) in *Rattus rattus var. albinus* with induced hepatotoxicity. Twenty-four male specimens were used, distributed in 4 groups: Positive control group, negative control group and experimental groups I and II. To the positive and experimental control group, hepatotoxicity was induced by administering orally a dose of 0.2 ml / 100 g of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>). Experimental groups I and II were orally administered hydroalcoholic extract of *Annona muricata* (Soursop) at doses of 200 mg / kg bw and 400 mg / kg bw, respectively. To evaluate the hepatoprotective effect of the extract, serum levels of GOT, GPT and FAL were used. The results showed a statistically significant decrease in serum levels of GOT, GPT and FAL in both experimental groups, which were subjected to the Chapiro-Wilks, ANOVA and Tukey tests, concluding that the hydroalcoholic extract of the leaves of *Annona muricata* (Soursop) have a hepatoprotective effect in *Rattus rattus var albinus*.

**Keywords:** *Annona muricata*, guanábana, hepatoprotector, carbon tetrachloride

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	iii
<b>DEDICATORIA</b> .....	iv
<b>RESUMEN</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	6
2.1 Antecedentes.....	6
2.2 Bases teóricas de la investigación.....	9
<b>III. HIPOTESIS</b> .....	17
<b>IV. METODOLOGÍA</b> .....	18
4.1 Diseño de la investigación.....	18
4.2 Población y Muestra.....	20
4.3 Definición y Operacionalización de variables.....	22
4.4 Técnicas e instrumentos.....	23
4.5 Plan de análisis.....	28
4.6 Matriz de consistencia.....	29
4.7 Principios éticos.....	30
<b>V. RESULTADOS</b> .....	31
5.1 Resultados.....	31
5.2 Análisis de resultados.....	33
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	36
<b>ASPECTOS COMPLEMENTARIOS</b> .....	36
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	38
<b>ANEXOS</b> .....	44

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) a dosis de 200 mg/kg pc y 400 mg/kg pc a través de los niveles séricos de Transaminasa Glutámico Oxalacética (GOT) y Transaminasa Glutámico Pirúvica (GTP) en <i>Rattus rattus var. albinus</i> , con hepatotoxicidad inducida.....	31
Tabla 2: Comparación del efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) a dosis de 200 mg/kg pc y 400 mg/kg pc a través de los niveles séricos de fosfatasa alcalina sérica en <i>Rattus rattus var. albinus</i> , con hepatotoxicidad inducida. ....	32
Tabla 3: Prueba de Shapiro – Wilks para determinar la normalidad de los grupos de estudio .....	62
Tabla 4: Prueba ANOVA unifactorial para encontrar la significancia de los grupos de estudio .....	63
Tabla 5: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para los grupos antes y después.....	64

## I. INTRODUCCIÓN

El hígado es la víscera de mayor tamaño del cuerpo humano, quien está predispuesta a agresiones por diferentes causas, que ocasionan daño hepático. Las enfermedades asociadas a disfunciones hepáticas representan una causa importante en la morbilidad y en la mortalidad. El daño hepático se está convirtiendo en un importante problema de salud pública. Las enfermedades hepáticas, son muy recurrentes hoy en día, tienen diferentes causas, ya sea por procesos como lo son las enfermedades inflamatorias, infecciosas, toxicidad por diferentes agentes y problemas genéticos<sup>(1,2)</sup>.

Se conocen factores de riesgo comúnmente asociados a la enfermedad hepática con etiología no alcohólica (EHGNA) como la diabetes tipo II, obesidad, y dislipidemias<sup>(3)</sup>. La cirrosis hepática es una enfermedad de características crónicas, se presenta de forma difusa y afecta irreversiblemente al hígado, se caracteriza por la presencia de fibrosis y por la aparición de nódulos de regeneración, que conllevan a un cambio en la arquitectura vascular, además de la funcionalidad del hígado. La cirrosis representa la fase final de varias enfermedades que afectan al tejido hepático<sup>(4)</sup>.

En el Perú, la cirrosis hepática con una tasa de mortalidad de 9,48 por 100,000 habitantes, ocupa el 5° lugar, constituyendo el 4% de la mortalidad nacional. Se incluyen en ella tanto a la cirrosis como a los procesos hepáticos agudos. Es importante señalar que del total de dichas muertes, el 70% ocurre en varones. Su prevalencia en personas menores de 25 años es baja (< 1%), sin embargo, la misma se ubica en el sexto lugar como causa de mortalidad en el grupo de 25 a 49 años (4.3% global, 3.2% en varones y 1.1% en mujeres), pasando a ocupar el segundo lugar entre los 50 y 64 años (8.7% global, 6.3% en varones y 2.4% en mujeres<sup>(5)</sup>).

Un agente causante de enfermedad hepática es el tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ), que se empleó en la producción de líquido refrigerante, como agente para limpiar y desgrasar y para remover manchas. Debido a sus efectos perjudiciales, estos usos están prohibidos y solamente se usa en ciertas aplicaciones industriales. La exposición a altos niveles de tetracloruro de carbono puede causar daño del hígado, los riñones y el sistema nervioso central. El hígado es especialmente sensible al tetracloruro de carbono porque las células sufren daño o son destruidas, pero también los riñones sufren daño por causa de la inhalación o absorción del  $\text{CCl}_4$  <sup>(6)</sup>.

Las pruebas que informan de lesión hepatocelular o citólisis destacan las transaminasas: Transaminasa Glutámico Oxalacética ó Alanina Amino-Transferasa sérica (GOT); Transaminasa Glutámico Pirúvica ó Aspartato Amino Transferasa sérica (GPT) y la actividad de Fosfatasa Alcalina sérica (FAL) <sup>(7)</sup>.

Las plantas medicinales han sido utilizadas por el hombre, con diferentes fines. Entre ellos, como recurso terapéutico, por un gran número de habitantes de los países occidentales, Apenas hace dos décadas por múltiples razones, recobra auge y popularidad debido a la tendencia en los pobladores de las ciudades, sobre todo en los llamados países desarrollados a retornar los métodos tradicionales, populares, caseros o a la utilización de las llamadas terapéuticas alternativas. Las plantas medicinales que corresponden a especies vegetales con principios activos que tienen propiedades terapéuticas comprobadas empírica o científicamente. Éstas producen metabolitos secundarios útiles para la solución de problemas específicos de salud en el hombre <sup>(8)</sup>.

La complejidad fitoquímica de las plantas puede ofrecer beneficios para la salud como son los compuestos con capacidad antioxidante tienen la finalidad de inhibir la oxidación de moléculas y por ende actuar como protectores de biomoléculas frente a especies reactivas de oxígeno. Una gran cantidad de estas sustancias antioxidantes son elaboradas desde el propio organismo o en algunas ocasiones obtenidas a partir de una alimentación basada en frutas y vegetales, por lo que estos últimos se convierten en una amplia fuente de productos alternativos en el tratamiento de enfermedades <sup>(9,10)</sup>.

La *Annona muricata L*, es un miembro de la familia Annonaceae y es un árbol frutal con una larga historia de uso tradicional. *A. muricata*, también conocida como guanábana y graviola, es una planta de hoja perenne que se distribuye principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Diversos estudios documentan la presencia de acetogeninas citotóxicas en las hojas de guanábana. Es de gran interés por sus propiedades medicinales, como la actividad antioxidante de la pulpa, las hojas frescas y secas, y las semillas. Una amplia gama de actividades etnomedicinales se contribuye a diferentes partes de *A. muricata*, tener efectos terapéuticos, las comunidades indígenas en África y América del Sur usan ampliamente esta planta en su medicina popular <sup>(11)</sup>.

Numerosas investigaciones han corroborado estas actividades, incluidas las actividades anticancerosas, anticonvulsivantes, antiartríticas, antiparasitarias, antipalúdicas, hepatoprotectoras y antidiabéticas. Los estudios fitoquímicos revelan que las acetogeninas anóxicas son los principales constituyentes de *A. muricata L*,

encontrándose también metabolitos secundarios como los flavonoides, alcaloides y ácido cítrico, etc. Estos metabolitos presentes en *A. muricata* permitirán la protección del hígado <sup>(11,12)</sup>.

El motivo para la realización del trabajo de investigación de lo antes descrito fue comprobar la propiedad terapéutica del Extracto Hidroalcohólico (EHA) de hojas de *A. muricata* (Guanábana) como hepatoprotector, con el fin de aportar alternativas fitoquímicas a los tratamientos convencionales de enfermedades hepáticas.

¿Presentará efecto hepatoprotector el extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata* (guanábana), en *Rattus rattus var. albinus*, con hepatotoxicidad inducida?

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General:**

- Demostrar el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata* (Guanábana) en *Rattus rattus var. albinus*, con hepatotoxicidad inducida.

### **Objetivos Específicos:**

- Determinar el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata* (Guanábana) a dosis de 200 mg/kg pc y 400 mg/kg pc a través de los niveles séricos de Transaminasa Glutámico Oxalacética (GOT) y Transaminasa Glutámico Pirúvica (GTP) en *Rattus rattus var. albinus*, con hepatotoxicidad inducida.

- Comparar el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata* (Guanábana) a dosis de 200 mg/kg pc y 400/kg mg pc, a través de los niveles séricos de Fosfatasa Alcalina en *Rattus rattus var. albinus*, con hepatotoxicidad inducida.

## II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2.1. Antecedentes

Usunomena en el 2015 en Nigeria, se llevó a cabo un estudio para evaluar el efecto hepatoprotector de las hojas de *Annona muricata* en la matriz extracelular (ECM) acumulación, integridad de la membrana lisosomal y daño hepático en ratas fibróticas inducida por dimetilnitrosamina (DMN). El método fue usando ratas Wistar machos adultos sanos se dividieron en cuatro grupos<sup>(13)</sup>.

Los resultados obtenidos fueron que el daño hepático, la disminución de la capacidad de síntesis, la fragilidad de la membrana lisosomal y la alteración de la función de la MEC fueron evidentes por un aumento en los niveles de LDH, TB, ACP y HA, así como una disminución en el nivel de TP y ALB en sueros de ratas DMN administradas en comparación con ratas normales. Sin embargo, el tratamiento simultáneo con extracto de hoja de *Annona muricata* significativamente ( $p < 0.05$ ) revirtió las alteraciones en los anteriores índices<sup>(13)</sup>.

La conclusión fue que este estudio sugiere que la hoja de *Annona muricata* funciona como un potente fibrosupresor mediante la supresión de la acumulación de ECM, mejora la estabilidad de la membrana lisosomal y la capacidad de síntesis hepática<sup>(13)</sup>.

Olusola et al; en el 2015 en Nigeria, realizaron un estudio sobre el efecto del extracto acuoso de las frutas de la xilopía aethiopica (Dunal) en ratas con hepatotoxicidad inducida con tetracloruro de carbono. Se utilizaron treinta y seis ratas divididas en 6 grupos de 6 animales cada uno para la investigación. El grupo 1 sirvió como control, mientras que los grupos 2, 3 y 4 se trataron previamente con Extracto del fruto de X. aethiopica en la dosis respectiva de 250 mg / kg, 500 mg / kg y 1000 mg / kg peso corporal durante 21 días antes de una única administración intraperitoneal de CCl<sub>4</sub>.

Animales en grupo 5 recibió solo el extracto de fruta en una dosis de 1000 mg / kg de peso corporal, mientras que los del grupo 6 fueron dado solo CCl<sub>4</sub>. Funciones hepáticas; se evaluó midiendo los niveles plasmáticos de AST, ALT, ALP, proteína total y albúmina. Resultados: mientras que la administración de CCl<sub>4</sub> produjo elevaciones significativas en la ALT, AST y ALP, hubo una reducción significativa tanto en la proteína total en plasma como en la albúmina. Conclusión: se puede sugerir que las frutas *X. aethiopica* tienen la capacidad de ofrecer un grado significativo de la protección de las células hepáticas contra la hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono en ratas albinas Wistar. Por mecanismo de acción antioxidante<sup>(14)</sup>.

Sonkar et al; en el 2016 en la India, se evaluó la actividad hepatoprotector del extracto de bark de hojas de *Annona squamosa* contra el daño al hígado con tetracloruro de carbono en ratas wistar. El extracto etanólico de hojas y la corteza de *Annona squamosa* (Annonaceae) se evaluó la actividad hepatoprotectora en ratas wistar, con daño hepático inducido por tetracloruro de carbono. El extracto en una dosis oral de 450 mg / kg mostró un efecto protector significativo por bajar los niveles séricos de Aspartato Aminotransferasa, Alanina Aminotransferasa, Bilirrubina sérica total y Malondialdehído equivalente, un índice de peroxidación lipídica del hígado. Las observaciones bioquímicas se complementaron con histopatología, examen de secciones hepáticas. La actividad de extracto también fue comparable a la de la silimarina, un hepatoprotector conocido<sup>(15)</sup>.

Oyinloye et al; en el 2016 en Sudáfrica, se realizó una investigación sobre el efecto protector de *Monodora myristica* (MM) en el daño hepático inducido por cadmio en animales de experimentación. Se mantuvieron ratas albinas Wistar macho en 200 mg

/l de cadmio: Cd (Cd Como CdCl<sub>2</sub>) en el agua potable principal de los animales para inducir hepatotoxicidad. Sumado a esto, los animales recibieron extractos acuosos de MM a una dosis de 200 o 400 y 20 mg / kg bw de Livolin forte (LF) durante 21 días. Al final del experimento, los niveles de biomarcadores de enzimas séricas (Alanina transaminasa, fosfatasa alcalina y Aspartato transaminasa. Los resultados demuestran que los extractos acuosos de MM son efectivos en la mejora de los daños hepáticos derivados de la toxicidad inducida por cadmio. Lo que indica que los bioconstituyentes antioxidantes de MM desempeñan un papel importante en la prevención de la toxicidad hepática, posiblemente al inhibir la bioacumulación de radicales libres en modelos animales <sup>(16)</sup>.

Suchy et al; en el 2017 en la India, en la Universidad de Banasthali, se investigó la actividad hepatoprotectora del extracto hidroalcohólico de semillas de *Annona Squamosa L.* Utilizando el tetracloruro de carbono para inducir la toxicidad hepática en ratas. Material y métodos: se evaluó la actividad frente al tetracloruro de carbono inducido. Hepatotoxicidad mediante la medición de los niveles de enzimas séricas como SGOT, ALP, SGPT y bilirrubina total para la función hepática pruebas. Se utilizaron seis grupos de ratas (n = 6) y se administraron por vía oral una vez al día con solución salina normal (control normal), con tetracloruro de carbono (control tóxico) o ASE (100, 200 y 400 mg / kg) durante 7 días, seguido de la inducción de hepatotoxicidad. Resultados: El extracto mostró una actividad hepatoprotector significativa a 100 mg / kg, 200 mg / kg y 400 mg / kg b.w por disminuyendo los niveles de SGOT, SGPT, ALP y bilirrubina total en comparación con el grupo de control tóxico. Conclusiones: El extracto hidroalcohólico de ASE tiene un potencial de protección hepática que podría atribuirse para una investigación adicional <sup>(17)</sup>.

Mohammad et al ,2018 en la India, realizaron un trabajo para evaluar la actividad hepatoprotectora del extracto de semilla de *Annona squamosa* contra la lesión hepática inducida por alcohol en ratas Sprague Dawley. La toxicidad hepática fue inducida por alcohol al 50% a nivel de dosis de 12 ml / kg po cada uno, durante 8 días. Extracto etanólico de semilla de *A. squamosa* (SEAE) a dosis de 200 y 400 mg / kg pc se administraron una vez al día durante 8 días consecutivos. La actividad hepatoprotectora del SEAE fue evaluado en ratas experimentales utilizando diversos parámetros bioquímicos como ALT, AST, ALP, LDH, SBL, albúmina, colesterol total y proteína total; y parámetros antioxidantes como SOD, CAT, GSH y TBARS. Eso demostraron que el tratamiento con SEAE de manera significativa ( $p < 0,05 - p < 0,001$ ) y dependiente de la dosis impidió el aumento inducido por el alcohol en los niveles séricos de enzimas hepáticas y aumentó significativamente

Los niveles de SOD, CAT, y GSH. También disminuyó significativamente el nivel de MDA. Histopatología de los los tejidos del hígado mostraron que el SEAE atenuó la necrosis hepatocelular y condujo a la regeneración y Reparación de células hacia normal. Los resultados de este estudio indican claramente el efecto protector de *A. squamosa* contra la lesión hepática inducida por el alcohol, que puede atribuirse a sus actividades hepatoprotectoras y antioxidantes<sup>(18)</sup>.

## **2.2 Bases teóricas de la investigación**

### **Plantas medicinales**

La Medicina Tradicional se basa predominantemente en el uso de materiales vegetales. Los medicamentos herbales han ganado importancia y popularidad en los últimos años debido a su seguridad, eficacia y rentabilidad. Uno de los usos importantes y bien

documentados de los productos vegetales es su uso como agentes hepatoprotector. Por lo tanto, existe una necesidad cada vez mayor de un agente hepatoprotector seguro <sup>(19)</sup>.

La terapia a base de plantas para los trastornos hepáticos se ha utilizado durante mucho tiempo y ha sido popularizada en todo el mundo por las principales farmacéuticas. A pesar de la gran popularidad de varias hierbas medicinales en general, y de las enfermedades hepáticas en particular, siguen siendo modalidades de tratamiento para las enfermedades hepáticas que aún no se encuentran estandarizadas <sup>(19)</sup>.

### **Principio activo**

Son los compuestos químicos responsables de la acción farmacológica de las drogas vegetales. Con frecuencia, son varios los constituyentes de la droga que intervienen en la acción farmacológica, con fenómenos de sinergia entre ellos <sup>(19)</sup>.

### **Extracto vegetal**

Son una mezcla de características complejas, con una gran variedad de compuestos químicos y de fácil utilización en cualquier campo de la tecnología. La guanábana (*Annona muricata*.) se considera una buena fuente de antioxidantes naturales, y todas las partes de la fruta se utilizan en la medicina popular tradicional <sup>(20)</sup>.

### ***Annona muricata* (Guanábana)**

Árbol perteneciente a la familia Annonaceae. Diversos estudios documentan la presencia de acetogeninas citotóxicas en las hojas de guanábana. Es un fruto tropical de gran interés actual por sus propiedades medicinales, como la actividad antioxidante de la pulpa, las hojas frescas y secas, y las semillas <sup>(21)</sup>. El uso etnomedicinal de *A.*

*muricata*, ha sido ampliamente conocido, sin embargo a la fecha, todavía carece de validación clínica y farmacológica científicamente respaldada. (Ver anexo 02).<sup>(22)</sup>.

### **Hábitat**

*Annona muricata* L. (Annonaceae), comúnmente conocida como guanábana, se encuentra desde América Central hasta América del Sur, incluidas las regiones del norte, noreste y sureste de Brasil<sup>(21)</sup>. La guanaba es oriunda y muy común en América tropical y las islas del Caribe. Se cultiva a menos de 300 m.s.n.m, en suelos variados y requiere alrededor de 100 mm de precipitación anual. Es muy susceptible a las heladas<sup>(21)</sup>.

### **Descripción botánica**

Pertenece a la familia de las Annonáceas. Su tronco es recto, mide un promedio cercano a los 6-8 metros, el ramaje intenso con ramas delgadas y grisáceas. Las hojas son ovadas - oblongas y ocasionalmente elíptico - oblongas, miden de 5 a 15 cm de largo por 2 a 6 cm de ancho. Las flores hermafroditas, se forman sobre ramitas cortas auxiliares o directamente sobre el tronco. El fruto es asimétrico, ovoide y mide de 14 a 40 cm de largo por 12 a 18 cm de ancho, está cubierta por una cáscara delgada de color verde oscuro con varias espinas pequeñas de 0,3 a 0,5 suaves y carnosas desprendibles con facilidad cuando el fruto ha madurado. (Ver anexo 01)<sup>(21)</sup>.

### **Composición química**

Entre los constituyentes químicos encontrados en *A. muricata*, los alcaloides (reticulina, coreximina, coclarina y anomurina)<sup>(23)</sup>.

Las acetogeninas: muricapentocin, muricatocin C, muricatocin A, annomuricin B, annomuricin A, murihexocin C, muricoreacin, bullatacinone, y bullatacin.

Flavonoides: Como la rutina

Entre los lípidos tenemos: Acido esteárico, ácido linoleico, ácido lignocérico, y ácido gantísico

También están presentes los siguientes compuestos:

Taninos carcinogénicos

Compuestos fenólicos: ácido cafeico, ácido p-cumarico, leuncoantocianidinas

Ácido ascórbico

Compuestos cianogénicos: ácido hidrocianico

Aceite fijo en las semillas (23,9%)

Fitoesteroles:  $\beta$  sitoesterol, estigmasterol, arronol, ipuranol)<sup>(24)</sup>

### **Propiedades terapéuticas**

En cuanto a la literatura, existen varios estudios farmacológicos que demuestran que *Annona muricata* posee efecto antihipertensivos, vasodilatadores, antiespasmódicos, cardiodepresivos, antiplasmódicos, anticonvulsivos, antivirales, antibacterianos, propiedades antidiabéticas, hipolipídicas y antioxidantes. Se utiliza para la hipertensión, la diabetes, el dolor de estómago, la fiebre y vómitos<sup>(24)</sup>.

Tradicionalmente, las hojas se utilizan para dolores de cabeza, insomnio, cistitis, problemas hepáticos, diabetes, hipertensión y como antiinflamatorio, antiespasmódico y antidisentérico. La decocción de las hojas tiene efectos parasiticidas, antirreumáticos y antineuralgicos cuando se usa internamente,

mientras que las hojas cocidas, aplicadas por vía tópica, combaten el reumatismo y los abscesos <sup>(24)</sup>

Las acetogeninas anomutacina (cis y trans) 10-annonacin-A-ona han demostrado poseer citotoxicidad selectiva en cultivos de células tumorales del pulmón <sup>(25)</sup>. Estudios comparando éstos valores con los de mango:  $11.8 \pm 0.9 \mu\text{molTrolox/g}$  (1 min) y  $13.2 \pm 0.3 \mu\text{molTrolox/g}$  (7 min), resultó menor la actividad antioxidante de guanábana en todos los casos <sup>(26)</sup>.

### **Toxicidad**

Los estudios toxicológicos no han sido demostrados. En el presente estudio hemos examinado la toxicidad del extracto acuoso de *Annona muricata*, los efectos antidiabéticos y antioxidantes de su administración crónica en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina con complicaciones <sup>(26)</sup>. Según estudios se determinó que la toxicidad aguda de *Annona muricata* fue de 5g/kg de peso vivo, observándose daño a nivel renal a partir de 2.5g /kg de peso vivo <sup>(27)</sup>.

### **Fisiología hepática**

El hígado está considerado como uno de los órganos más vitales que funciona como centro del metabolismo de nutrientes como los hidratos de carbono, proteínas y lípidos y la excreción de metabolitos de residuos. Además, también maneja el metabolismo y la excreción de drogas y otros xenobióticos del cuerpo, proporcionando así protección contra sustancias extrañas al desintoxicarlas y eliminarlas <sup>(28)</sup>.

La bilis secretada por el hígado tiene, entre otras cosas, un papel importante en la digestión. Las lesiones de las células hepáticas causadas por diversos agentes tóxicos,

como ciertos agentes quimioterapéuticos, tetracloruro de carbono, tioacetamida, etc., el consumo crónico de alcohol y los microbios están bien estudiados. El aumento de la peroxidación de lípidos durante el metabolismo del etanol puede provocar el desarrollo de la hepatitis que conduce a la cirrosis. Desde tiempos inmemoriales, la humanidad ha hecho uso de las plantas en el tratamiento de diversas dolencias <sup>(28)</sup>.

Fisiológicamente el hígado cumple una función vital en el organismo, presentando multiplicidad funcional metabólica, digestiva, hemostática, inmunológica. El hígado interviene en el metabolismo de las proteínas captando aminoácidos de la circulación portal y a través de transaminación. <sup>(28)</sup>.

### **Hepatotoxicidad**

Lesión o daño hepático causado por la exposición a un medicamento u otros agentes no farmacológicos, llamada enfermedad hepática tóxica. El hígado está especialmente expuesto a toxicidad por razón de su función en la biotransformación, metabolismo y eliminación de agentes potencialmente tóxicos como el CCl<sub>4</sub> <sup>(29)</sup>.

### **Marcadores de la lesión hepática**

Entre las pruebas que informan de lesión hepatocelular o citólisis destacan las transaminasas o aminotransferasas y fosfatasa alcalina.

Aspartato-aminotransferasa o transaminasa glutámicooxalacética (AST o GOT) cuya vida media es de 48 horas.

Alaninoaminotransferasa o transaminasa glutámico-pirúvica (ALT o GPT) con una vida media de 18 horas (Ver anexo 24) <sup>(30)</sup>.

La GPT es más específica de daño hepático que la GOT, debido a que la primera se localiza casi exclusivamente en el citosol del hepatocito, mientras que la GOT, además del citosol y mitocondria, se encuentra en el corazón, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, eritrocitos y leucocitos.

**Fosfatasa Alcalina:** La enzima fosfatasa alcalina se encuentra concentrada en el hígado, hueso, placenta, intestino. En los niños y durante el embarazo se encuentra en concentraciones más altas debido a los procesos de crecimiento óseo y por acción placentaria, respectivamente. Esta enzima se encuentra elevada en enfermedades tales como la hepatitis, enfermedades óseas, entre otras. (Ver anexo 25)<sup>(31)</sup>.

#### **Hepatotoxicidad inducida por CCl<sub>4</sub>**

El CCl<sub>4</sub> es una sustancia líquida de aspecto transparente y de fácil evaporación. Debido a esto, la mayor cantidad de CCl<sub>4</sub> que se halla en el aire, se encuentra en forma volátil por esta razón el uso del tetracloruro de carbono ha disminuido considerablemente <sup>(4)</sup>. El hígado es particularmente vulnerable al CCl<sub>4</sub> pues posee una gran cantidad de enzimas que metabolizan a este xenobiótico. Algunos de los productos de esta degradación pueden desnaturalizar a proteínas celulares, interrumpiendo así con las funciones de los hepatocitos. Las sustancias que degradan a las membranas celulares pueden llevar hacia la muerte celular <sup>(32)</sup>.

#### **Toxicidad inducida por CCl<sub>4</sub>**

La causa de la hepatotoxicidad por a la exposición de CCl<sub>4</sub> induce a cirrosis crónica después de su exposición, este compuesto es altamente reactivo en los órganos, especialmente en el hígado, tiene una alta reactividad química. La toxicidad del CCl<sub>4</sub> se asocia a su conversión en radicales libres de tiorometilo (CCl<sub>3</sub>) altamente tóxicos,

por la acción del complejo enzimático citocromo P450, que se combinan con los lípidos y proteínas de la célula en presencia de oxígeno para formar el radical triclorometilperoxil ( $\text{CCl}_3\text{O}^-$ ) el cual ataca a las células. El aumento de los niveles de GPT y GOT constituye la lógica manifestación de la presencia de células con daño y con pérdida de la integridad funcional de la membrana celular <sup>(33)</sup>.

### **Mecanismo de acción de *Annona muricata* frente a hepatotoxicidad inducida por $\text{CCl}_4$ .**

Los flavonoides, alcaloides, presentes en *Annona muricata* (Guanábana), manifiestan actividad antioxidante especialmente en extractos, además de que los compuestos fenólicos que se consumen en la dieta son antioxidantes ya que secuestran radicales libres y previenen la oxidación biológica (factores etiológicos de muchas enfermedades crónicas como infartos y otras enfermedades cardíacas, cáncer, diabetes, envejecimiento celular, etc.) Los antioxidantes pueden prevenir y la oxidación y en algunos casos revertir el daño oxidativo de las moléculas afectadas, podría interferirse que esta misma actividad antioxidante por los metabolitos antes descritos serían los responsables de reducir el daño producida a nivel hepático por el  $\text{CCl}_4$  <sup>(34)</sup>.

### **III. HIPÓTESIS**

#### **3.1. Hipótesis Alternativa ( $H_1$ ):**

El extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata* (Guanábana) tiene efecto hepatoprotector en hepatotoxicidad inducida en *Rattus rattus var. albinus*.

#### **3.2. Hipótesis Nula ( $H_0$ ):**

El extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata* (Guanábana) no tiene efecto hepatoprotector en hepatotoxicidad inducida en *Rattus rattus var. albinus*.

## **IV. METODOLOGÍA**

### **4.1 Diseño de la investigación**

El presente trabajo de investigación fue de tipo experimental, de nivel explicativo, enfoque cuantitativo.

Los grupos de tratamiento que se trabajaron fueron divididos de la siguiente manera:

#### **a) Grupo control Negativo**

Estuvo conformado por 06 especímenes de experimentación *Rattus rattus var. albinus* entre 250 a 300 g agrupadas aleatoriamente con alimento balanceado y agua ad libitum por 7 días; este grupo se encuentra biológicamente saludables, el 5<sup>to</sup> día se extrajo 3ml de sangre, que fue correspondiente a la muestra inicial, mediante la técnica de la punción cardiaca, el 7<sup>mo</sup> día se repitió el procedimiento para la muestra final, en ambos casos las pruebas bioquímicas fueron realizadas en suero.

#### **b) Grupo control Positivo:**

Estuvo conformado por 06 especímenes de experimentación *Rattus rattus var. albinus* entre 250 a 300 g agrupadas aleatoriamente con alimento balanceado y agua ad libitum. El 5<sup>to</sup> día, se indujo hepatotoxicidad con una mezcla de CCl<sub>4</sub> (1:1v/v) a una dosis de 0,2ml/100g pc (0,1 ml de CCl<sub>4</sub> + 0,1 ml de aceite de maíz), por sonda orogástrica N° 6 adaptada para (*Rattus rattus var. albinus*), 30 minutos después de la inducción de CCl<sub>4</sub>, se extrajo 3ml de sangre, que fue correspondiente a la muestra inicial, mediante la técnica de la punción cardiaca, el 7<sup>mo</sup> día se repitió el procedimiento para la muestra final, en ambos casos las pruebas bioquímicas fueron realizadas en suero.

### **Grupo Experimental I:**

Estuvo conformado por 06 especímenes de experimentación *Rattus rattus var. albinus*, entre 250 a 300 g agrupadas aleatoriamente con alimento balanceado y agua ad libitum. A este grupo se le administró extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata* una dosis de 200mg/kg pc vía oral diariamente por 7 días. El 5to día se indujo hepatotoxicidad con una mezcla de CCl<sub>4</sub> (1:1v/v) una dosis de 0,2ml/100g pc (0,1 ml de CCl<sub>4</sub> + 0,1 ml de aceite de maíz) por sonda orogástrica N° 6 adaptada para (*Rattus rattus var. albinus*), 30 minutos después de la inducción de CCl<sub>4</sub>, se extrajo 3ml de sangre, que fue correspondiente a la muestra inicial, mediante la técnica de la punción cardiaca, el 7<sup>mo</sup> día, se repitió el procedimiento para la muestra final, en ambos casos las pruebas bioquímicas fueron realizadas en suero.

### **c) Grupo Experimental II:**

Estuvo conformado por 06 especímenes de experimentación *Rattus rattus var. albinus*, entre 250 a 300 g agrupadas aleatoriamente con alimento balanceado y agua ad libitum. A este grupo se le administró extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata* una dosis de 400mg/kg pc vía oral diariamente por 7 días. El 5to día se indujo hepatotoxicidad con una mezcla de CCl<sub>4</sub> (1:1v/v) una dosis de 0,2ml/100g pc (0,1 ml de CCl<sub>4</sub> + 0,1 ml de aceite de maíz) por sonda orogástrica N° 6 adaptada para (*Rattus rattus var. albinus*), 30 minutos después de la inducción de CCl<sub>4</sub>, se extrajo 3ml de sangre, que fue correspondiente a la muestra inicial, mediante la técnica de la punción cardiaca, el 7<sup>mo</sup> día, se repitió el procedimiento para la muestra final, en ambos casos las pruebas bioquímicas fueron realizadas en suero.

La muestra biológica utilizada fue el suero obtenido por punción cardiaca antes y después del estudio, para lo cual los animales fueron previamente anestesiados con una dosis de ketamina + xilacina proporción 9:1 a una dosis de (0,2ml/kg pc), para lo cual, se utilizó una jeringa de tuberculina para administrar por vía intramuscular la dosis adecuada. Esperándose de 5 a 10 minutos para lograr efecto, luego se procedió a rasurar la zona donde se encuentra ubicado el corazón para una mejor extracción, se procedió a extraer 3 ml sangre por punción cardiaca empleando una jeringa de 5ml con aguja N°23 , para los respectivos análisis de transaminasas (GOT y GPT) y la fosfatasa alcalina (FAL) . Después de haber extraído la sangre por medio de la punción cardiaca, se colocaron en los tubos de ensayo correspondientes para ser llevados a la centrifuga 3000 rpm por 15 minutos y obtener el suero con el que se trabajó para los análisis correspondientes.

#### **4.2 Población y Muestra**

##### **Población Biológica:**

Estuvo conformada por los especímenes de *Rattus rattus var albinus* machos de 3 a 4 meses de edad teniendo como pesos promedios entre 250 a 300 g, procedentes del bioterio del INS – LIMA. (Ver anexo 15)

##### **Muestra Biológica:**

Estuvo formada por 24 especímenes de *Rattus rattus var.albinus* machos de pesos promedios entre 250 a 300 g que fueron distribuidos de manera aleatoria en cuatro grupos con 6 especímenes cada uno; control negativo, control positivo, control experimental I y control experimental II. Fueron aclimatados en ciclos de luz – oscuridad de 12 horas por un periodo de 7 días; a temperatura de aproximadamente 22°C en el lugar libre de ruido, fueron acondicionados en jaulas de polipropileno, en

la cual se empleó viruta para el encamado de los especímenes, cambiándose a diario, cuidando la salud de los animales de experimentación, recibiendo una alimentación balanceada según indico el INS-LIMA. (Ver anexo 14)

### **Población vegetal:**

Estuvo formado por las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) cultivadas en el centro poblado de Samne, en el distrito de Otuzco, provincia de Otuzco, departamento de la Libertad, Perú. Se recolecto la muestra de hojas de *Annona muricata* en los lugares de cultivo de estos árboles frutales. (Ver anexo 02)

### **Muestra vegetal**

Se recolectaron 2000 g (2 kg) de hojas de *Annona muricata* (Guanábana) en el centro poblado de Samne, en el distrito de Otuzco, provincia de Otuzco, departamento de la Libertad, Perú. Se tuvo en cuenta árboles con hojas sanas, sin presencia de plagas o contaminadas con pesticidas. La selección de hojas se realizó siguiendo los criterios de inclusión y exclusión. (Ver anexo 03).

### **Criterios de inclusión**

- ❖ Las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) deben estar de tamaño homogéneo.
- ❖ Las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) deben estar, completas con color y apariencia sana. (ver anexo 08).

### **Criterios de exclusión**

- ❖ Las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) en mal estado.
- ❖ Las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) que presenten plagas e incompletas. (ver anexo 07).

### 4.3 Definición y Operacionalización de variables

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DISEÑO OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
<b>DEPENDIENTE</b>  Efecto Hepatoprotector de hojas de <i>Annona muricata</i> .	Protección de enfermedades hepáticas experimentales en animales de laboratorio.	Se determinó la disminución de los niveles de las enzimas Transaminasa Glutámico oxalacética sérica (GOT); Transaminasa Glutámico pirúvica sérica (GTP) y la Actividad de Fosfatasa Alcalina sérica.	Valores de transaminasas (GOT Y GPT) y Actividad Fosfatasa Alcalina en UI/L obtenidas a partir de las absorbancias de las muestras.	Variable Cuantitativa de razón.
<b>INDEPENDIENTE</b>  Extracto hidroalcohólico de <i>Annona muricata</i> (Guanábana).	Extracto preparado a base de hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana). Utilizando como solvente agua y alcohol.	Producto obtenido a través del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Annona muricata</i> empleando dos dosis a 200mg/kg pc y 400 mg/kg pc.	Grupo control negativo, solo comida balanceada y agua. Grupo control positivo, CCl <sub>4</sub> 0,2ml /g. Grupo experimental I, 200 mg/kg pc de extracto de hojas de <i>Annona muricata</i> . Grupo experimental II, 400 mg/kg pc de extracto de hojas de <i>Annona muricata</i> .	Variable Cualitativa nominal.

#### **4.4 Técnicas e Instrumentos**

##### **Recolección de hojas de *Annona muricata*.**

Se recolectaron hojas frescas de *Annona muricata* (Guanábana), en el centro poblado de Samne, en el distrito de Otuzco, provincia de Otuzco, departamento de la Libertad, un equivalente a 2 kg (2000g), procedentes de árboles, que contengan hojas frescas y libres de plagas, las hojas recolectadas fueron lavadas con agua corriente, después lavadas con agua destilada y luego fueron limpiadas con algodón y alcohol 70° para eliminar restos de materias extrañas presentes en las hojas, para su posterior utilización en la preparación del extracto hidroalcohólico.(ver anexo 03)

Para la determinación taxonómica de la planta se recolectaron 4 ramas completas con tallos, hojas, flores y frutos, las cuales fueron llevadas a una prensa para ser secadas adecuadamente, para su identificación en el Herbarium Truxillense (HUT) la cual fue identificada con el código N° 59603. (Ver anexo 04).

##### **Preparación del extracto:**

Las hojas de *Annona muricata* (Guanábana), que previamente fueron lavadas con agua corriente y agua destilada fueron limpiadas con algodón y alcohol de 70°, secándose bajo sombra sobre papel Kraft, a temperatura ambiente 24°C, una vez seca las hojas, se procedió a seleccionar hojas en buen estado las cuales fueron molidas con ayuda de un mortero y pilón posteriormente tamizadas con un tamiz (Endecotts) N°60, en el laboratorio de la ULADECH, hasta la obtención de un polvo fino. La maceración se realizó pesando 200 g de polvo fino de hojas de *Annona muricata* en una solución hidroalcohólica al 70% , agregando 800ml de una solución hidroalcohólica, preparada a partir de etanol de 96° en proporción 1:4 (583ml de alcohol de 96°y 217 ml de agua

destilada), la maceración se realizó durante 6 días en un frasco color ámbar, pasados los 6 días se procedió a la filtración al vacío con una bomba (Zeny) y papel Whatman, el filtrado fue evaporado en baño maría (Memmert) a una temperatura de 35°C; hasta lograr un peso constante, realizado el baño maría, se obtuvo 31,4g de extracto seco y el rendimiento de la técnica fue 15,7% p/p.(Ver anexo 07)<sup>(3)</sup>

### **Pesos y selección de *Rattus rattus var albinus***

Se trabajó con 24 especímenes machos, con 4 grupos de trabajo grupo control negativo, grupo control positivo, grupo experimental una dosis de 200mg/kg pc y el grupo experimental una dosis de 400mg/kg pc, los cuales fueron pesados y marcados con un plumón indeleble para identificar cada grupo de trabajo. Se trabajó con un cuaderno de notas, donde se redactaban los procedimientos, que se realizaron como los pesos de las ratas y el grupo al cual pertenecían cada una de ellas, también se realizaban los cálculos correspondientes para determinar las dosis a administrar del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* y de CCl<sub>4</sub>. (Ver anexo 15)

### **Administración de extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata* (Guanábana).**

Para la administración del extracto, se pesó 1,3g de extracto seco, fue diluido en 12 ml de agua destilada para su posterior administración. Este procedimiento se realizó por 7 días en los cuales se administró el extracto a los grupos experimentales una dosis de 20mg/kg pc y 400 mg/kg pc.

El sondeo se realizó adecuando una sonda orogástrica N° 6 para la administración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata*, este procedimiento se realizó durante las mañanas en promedio de 9.00 a 9.30 am.

Grupo experimental I, dosis de 200mg/kg pc de EHA, como inductor de la hepatotoxicidad se administró vía oral 0,2 ml/100g pc de CCl<sub>4</sub> utilizando una sonda orogástrica. Como hepatoprotector se administró 0,5 ml de EHA de hojas de *Annona muricata* (Guanábana) por 7 días, para lo cual se pesó 330 mg de extracto seco y se diluyó con agua destilada, para la posterior administración a los 6 especímenes de este grupo.

Grupo experimental II, dosis de 400mg/kg pc EHA, como inductor de la hepatotoxicidad se administró vía oral 0,2 ml/100g pc de CCl<sub>4</sub> utilizando una sonda orogástrica. Como hepatoprotector se administró 1ml de EHA de hojas de *Annona muricata* (Guanábana) para lo cual se pesó 660 mg de extracto seco y se diluyó con agua destilada, para la posterior administración a los 6 especímenes de este grupo.

Para los grupos experimentales de EHA a 200mg/kg pc y 400mg/kg pc se pesaron a diario 990mg de extracto seco diluido en agua destilada, que fueron aforados a 12ml.

La concentración del EHA de *Annona muricata* fue de 11%p/v.

(Ver anexo16)

### **Inducción de la Toxicidad con CCl<sub>4</sub>:**

Para el grupo control positivo previo a la inducción se administró agua y comida y el 5° día se realizó la inducción, para los grupos experimentales I y II se les administraba EHA de *Annona muricata* (Guanábana) vía oral. El 5° día 30 minutos después se les inducía la toxicidad con CCl<sub>4</sub> vía oral utilizando una sonda orogástrica N°6.

Para el grupo control positivo y los grupos experimentales de 200mg/kg pc y de 400mg/kg pc, el sondeo se realizó usando una sonda orogástrica adaptada, mediante

la cual se administró 0,2 ml/100g pc de CCl<sub>4</sub>, de forma rápida, ya que el CCl<sub>4</sub> es un disolvente volátil tiende a deformar el embolo de jebes de la jeringa. Toda la experimentación fue realizada en un lugar libre de ruido y con las medidas de bioseguridad correspondientes. <sup>(29)</sup> (Ver anexo 16)

### **Identificación del daño hepático:**

La muestra biológica utilizada fue suero obtenido por punción cardiaca inicial y final, para lo cual los animales fueron previamente anestesiados con una dosis Ketamina + Xilacina proporción 9:1 a una dosis de 0.2ml/kg pc. (Ver anexo 17)

La depilación de las ratas se realizó usando una tijera y/o máquina de afeitar, para facilitar la técnica de punción cardiaca. (Ver anexo 18)

Punción cardiaca, se realizó previamente la depilación de la zona donde se ubica el corazón, para lo cual se dobló la pata del animal de experimentación para tener como referencia donde palpar para ubicar la zona adecuada para la extracción de sangre, se utilizó una jeringa de 5ml, aguja N° 23. (Ver anexo 19)

La sangre extraída mediante punción cardiaca, fue llevada a la centrifuga en tubos de ensayo a 3000 rpm por 15 minutos; así se obtuvo el suero con el que se trabajó los análisis bioquímicos de las Transaminasa séricas GOT y GPT y FAL. (Ver anexo 20).

Se utilizó la técnica de medición enzimática GOT y GPT según lo propuesto por Wiener Lab y la determinación de actividad FAL por método cinético propuesto por Valtek. Para la medición de transaminasas las muestras fueron llevadas al espectrofotómetro (UNICO UV-2100). Siguiendo los pasos a continuación :(Ver anexo 22).

## **REACTIVOS PROVISTOS**

### **Transaminasas 200 GOT provee:**

A. Reactivo A: solución con 100 mM de l-aspartato y 2 mM de  $\alpha$ -cetoglutarato en buffer fosfatos 100 mM, pH 7,4.

### **Transaminasas 200 GPT provee:**

A. Reactivo A: solución con 200 mM de dl-alanina y 2 mM de  $\alpha$ -cetoglutarato en buffer fosfatos 100 mM, pH 7,4. Además, ambos equipos proveen:

B. Reactivo B: solución conteniendo 1 mmol de 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNFH) en ácido clorhídrico 1 mol/l.

C. Reactivo C: solución de hidróxido de sodio 4 mol/l. S.

**Técnica para GOT y GPT:** Los reactivos son llevados a un baño de agua de 37°C, las pipetas que se emplean deben estar limpias y libres de residuos para no contaminar los reactivos.

**Transaminasa Glutámico Oxalacética sérica (GOT):** Se agrega 0.25ml del reactivo A, luego se deja 5 minutos en baño María, se agrega 50ul de suero obtenido de la sangre de los animales de experimentación, se esperó por 30 minutos en baño maría y se agregó 0.25ml reactivo B, se esperó 10 minutos en baño maría y se agrega 2.5ml del reactivo C y se deja 2 minutos en baño maría, finalmente se llevó a leer, en el espectrofotómetro a 505nm (ÚNICO UV-2100). (Ver anexo 24)

**Transaminasa Glutámico Pirúvica sérica (TGP):** Se agrega 0.25ml del reactivo A, luego se deja 5 minutos en baño María, se agrega 50ul de suero obtenido de la sangre de los animales de experimentación, se esperó por 30 minutos en baño maría y se

agregó 0.25ml reactivo B, se esperó 10 minutos en baño maría y se agrega 2.5ml del reactivo C y se deja 2 minutos en baño maría, finalmente se llevó a leer, en el espectrofotómetro a 505nm (UNICO UV-2100). (Ver anexo 24)

#### **Fosfatasa Alcalina sérica (FAL)**

**Reactivos:** Conservados entre 2° y 8°C y protegidos de la luz, estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

**Técnica:** el volumen de la muestra (suero) empleada es de 0.02 ml y del reactivo de trabajo fue de 1ml, después de emplear las cantidades necesarias se procedió a mezclar y se transfirió a la cubeta del espectrofotómetro (UNICO UV-2100). El tiempo de incubación es de 60 segundos a la temperatura de reacción. La absorbancia inicial (A1) se lee a 405 nm y el proceso de lectura se repite a los 60 segundos exactos.

**Instrumentos utilizados:** Balanza, jaulas, bebederos, depósitos de plástico, frascos de vidrio, embudo, bureta, pipetas, tubos de ensayo, papel filtro, tamiz, jeringas, sonda N°6, espectrofotómetro, centrifuga, baño maría. (Ver anexo 25).

#### **4.5 Plan de análisis**

Los resultados fueron sometidos a la prueba de Shapiro – Wilks para determinar la normalidad, prueba ANOVA (Análisis de varianza) para variables cuantitativas, a un 95% de confianza ( $\alpha \leq 0.05$ ) y un error del 5% y la prueba de comparaciones de Tuckey. Se utilizó el Paquete estadístico SPSS (paquete estadístico de ciencia social) v 20.0. (Ver anexo 26, 27, 28).

#### 4.6 Matriz de Consistencia

Título de la Investigación	Formulación del Problema	Objetivos	Hipótesis	Tipo y Diseño	Variables	Definición Operacional	Indicadores y Escala de Medición	Plan de Análisis
Efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) en <i>Rattus rattus var. albinus</i> con hepatotoxicidad inducida.	¿Cuál es el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana), en <i>Rattus rattus var. albinus</i> con toxicidad inducida?	<p><b>Objetivo general:</b> Determinar el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) en <i>Rattus rattus var. albinus</i>, con hepatotoxicidad inducida.</p> <p><b>Objetivos específicos:</b> Evaluar el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) a 200 mg/kg pc y 400 mg/kg pc sobre los niveles de transaminasas GOT y GTP en <i>Rattus rattus var. albinus</i>, con hepatotoxicidad inducida</p> <p>Comparar el efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) a 200 mg/kg pc y 400 mg/kg pc sobre los niveles de concentración de fosfatasa alcalina en <i>Rattus rattus var. albinus</i>, con hepatotoxicidad inducida.</p>	<p><b>Hipótesis Alternativa:</b> El extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Annona muricata</i> tiene efecto hepatoprotector en hepatotoxicidad inducida en <i>Rattus rattus var. albinus</i>.</p> <p><b>Hipótesis Nula:</b> El extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Annona muricata</i> no tiene efecto hepatoprotector en hepatotoxicidad inducida en <i>Rattus rattus var. albinus</i>.</p>	El presente trabajo de investigación fue experimental de nivel explicativo enfoque cuantitativo.	<p><b>Dependiente</b> Efecto Hepatoprotector de hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanabana).</p> <p><b>Independiente</b> Extracto hidroalcohólico de <i>Annona muricata</i> (Guanábana).</p>	<p>Se determinó la disminución de los niveles de Fosfatasa Alcalina y transaminasas GOT y GPT.</p> <p>Es el producto obtenido a través de la maceración de hojas de <i>Annona muricata</i>, utilizando alcohol de 96°C, en dos concentraciones 200 m/kg pc y 400mg/kg pc.</p>	<p>Grupo Experimental 1 200mg /kg pc</p> <p>Experimental 2 400mg //kg</p> <p>Variable cualitativa nominal.</p> <p>Variable UI/L Cuantitativa de razón</p>	<p>Prueba CHAPIRO WILKS para determinar la normalidad de los grupos de estudio, Pruebas paramétricas de ANOVA para el análisis de los Resultados.</p>

#### **4.7 Principios éticos**

Para el siguiente trabajo, se utilizaron los principios éticos descritos en el código de Ética para la investigación, versión 001 de la ULADECH.

**Protección a los animales.** - Los animales en toda investigación es el fin y no el medio, por ello necesitan cierto grado de protección, el cual se determinará de acuerdo al riesgo en que incurran y la probabilidad de que obtengan un beneficio. En el ámbito de la investigación es en las cuales se trabaja con animales <sup>(35)</sup>.

**Beneficencia y no maleficencia.** - Se debe asegurar el bienestar de los animales que participan en las investigaciones. En ese sentido, la conducta del investigador debe responder a las siguientes reglas generales: no causar daño, disminuir los posibles efectos adversos y maximizar los beneficios <sup>(35)</sup>.

**Justicia.** - El investigador debe ejercer un juicio razonable, ponderable y tomar las precauciones necesarias para asegurarse de que sus sesgos, y las limitaciones de sus capacidades y conocimiento, no den lugar o toleren prácticas injustas. <sup>(35)</sup>

## V. RESULTADOS

### 5.1 Resultados

**Tabla 1:** Efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata* (Guanábana) a dosis de 200 mg/kg pc y 400 mg/kg pc a través de los niveles séricos de Transaminasa Glutámico Oxalacética (GOT) y Transaminasa Glutámico Pirúvica (GTP) en *Rattus rattus var. albinus*, con hepatotoxicidad inducida.

GRUPOS DE TRATAMIENTO	GOT INICIAL UI/L	GOT FINAL UI/L	GPT INICIAL UI/L	GPT FINAL UI/L	Significancia P
CONTROL NEGATIVO	26.0±8.4	20.5±4.18	17.3±4.3	15.7±6.1	
CONTROL POSITIVO (CCl <sub>4</sub> )	146.5±19.5	151.9±22.5	99.2±7.4	126.2±12.7	0.000*
E.H.A de <i>Annona muricata</i> a dosis de 200mg/kg pc + CCl <sub>4</sub>	137.0±21.5	103.1±13.3	85.1±6.7	34.8±6.7	
E.H.A de <i>Annona muricata</i> a dosis de 400mg/kg pc + CCl <sub>4</sub>	152.5± 33.9	87.2±9.1	99.8±5.8	25.4±5.7	

\* Prueba ANOVA (p<0.05)

**Tabla 2:** Comparación del efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata* (Guanábana) a dosis de 200 mg/kg pc y 400 mg/kg pc a través de los niveles séricos de fosfatasa alcalina sérica en *Rattus rattus var. albinus*, con hepatotoxicidad inducida.

<b>GRUPOS DE TRATAMIENTO</b>	<b>FAL INICIAL UI/L</b>	<b>FAL FINAL UI/L</b>	<b>Significancia P</b>
<b>CONTROL NEGATIVO</b>	31.7±8.4	35.7±9.3	
<b>CONTROL POSITIVO (CCl<sub>4</sub>)</b>	102.1±6.0	128.8±43.2	0.000*
<b>E.H.A de <i>Annona muricata</i> a dosis de 200mg/kg pc + CCl<sub>4</sub></b>	120.9±8.2	34.3±8.4	
<b>E.H.A de <i>Annona muricata</i> a dosis de 400mg/kg pc + CCl<sub>4</sub></b>	132.8±4.6	29.3±13.2	

\* Prueba ANOVA (p<0.05)

## 5.2 Análisis de resultados

En la tabla 01, se observa que los valores séricos de GOT y GPT iniciales y finales del grupo control negativo no tienen una variación significativa ya que los valores finales no diferencian significativamente de los valores iniciales, se debe a que este grupo se administró agua y alimento, el grupo control positivo quienes fueron inducidos con tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ), los valores de las transaminasas fueron de GOT de  $146. \pm 19.5$  a  $151.9 \pm 22.5$  y GPT de  $99.2 \pm 7.4$  a  $126.2 \pm 12.7$ ; el aumento de los valores de transaminasas está asociado al efecto tóxico descrito para el  $\text{CCl}_4$  por Basu et al que la toxicidad del  $\text{CCl}_4$  se asocia a su conversión en radicales libres de tetraclorometilo ( $\text{CCl}_3$ ) altamente tóxico, por la acción del complejo enzimático citocromo P450, que se combinan con los lípidos y proteínas de la célula en presencia de oxígeno para formar el radical triclorometilperoxil ( $\text{CCl}_3\text{O}^-$ ) el cual ataca a las células. El aumento de los niveles de GPT y GOT constituye la lógica manifestación de la presencia de células con daño y con pérdida de la integridad funcional de la membrana celular <sup>(36)</sup>.

Se puede observar también que, los valores séricos de transaminasas en los grupos experimentales presentaron una disminución, teniendo en cuenta que los valores fueron para el grupo de 200mg/kg pc la GOT fue de  $137.0 \pm 21.5$  a  $103.1 \pm 13.3$  UI/L; y para la GPT de  $152.5 \pm 33.9$  a  $87.2 \pm 9.1$  UI/L para el grupo de 200mg/kg pc GPT de  $85.1 \pm 6.7$  a  $34.8 \pm 6.7$  UI/L, para el grupo de 400mg/kg pc fue de  $99.8 \pm 5.8$  a  $25.4 \pm 5.7$  UI/L la disminución de los valores de transaminasas hepáticas GOT y GTP puede estar asociado a la presencia de los metabolitos en hojas de *Annona muricata* (Guanábana) como lo describe Yang et al , que las hojas de *Annona muricata* son ricas en

flavonoides, alcaloides de isoquinolina y acetogeninas anonáceas, encontrándose flavonoides como la rutina y quercetina que podrían tener el efecto antioxidante, la cual hace disminuir el daño hepático secuestrando radicales libres.<sup>(34)</sup>

También Sonkar et al, menciona sobre el efecto hepatoprotector del extracto de las hojas de la familia de *Annona* contra el daño al hígado con tetracloruro de carbono en ratas wistar. En el grupo, que se administró el extracto hidroalcohólico a una dosis oral de 400 mg /kg pc mostró un efecto hepatoprotector superior que al grupo experimental I a quien se le administro una dosis de 200mg/kg pc, ya que en el grupo de 400mg/kg pc, presento una disminución significativa los niveles séricos de GOT y GPT lo que indica que tiene mayor efecto hepatoprotector.<sup>(15)</sup>

En la tabla 02, obtenemos los resultados de Fosfatasa Alcalina sérica ,que se utilizó como marcador indirecto de daño hepático, se puede observar que los valores para el grupo control negativo fue de  $31.7 \pm 8.4$  a  $35.7 \pm 9.3$  UI/L, es el grupo de animales sanos es la razón, por la cual no se observa diferencia significativa en los valores obtenidos, en comparación con el grupo control positivo, los cuales presentaron los siguientes valores de  $102.1 \pm 6.0$  a  $128.8 \pm 43.2$  UI/L, la cual puede evidenciar claramente el incremento de la actividad de la Fosfatasa Alcalina sérica, estos valores son explicados por Poupon et al ,que describe a la fosfatasa alcalina (FAL) sérica no solo es un indicador de colestasis, sino también un marcador sustituto de la gravedad de la cirrosis biliar primaria y la colangitis esclerosante primaria, con la pérdida de actividad del AP hepático podría promover la sobrecarga de lipopolisacáridos y la posterior exacerbación y perpetuación de la inflamación<sup>(37)</sup>.

En la tabla 2, también se observan los valores de los grupos experimentales de 200mg/kg pc fue de  $120.9 \pm 8.2$  a  $34.3 \pm 8.4$  UI/L y el grupo de 400mg/kg pc fue de  $132.8 \pm 4.6$  a  $29.3 \pm 13.2$  UI/L, los cuales evidencian una disminución de los niveles de Fosfatasa Alcalina sérica después de haber terminado el tratamiento con el extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* (Guanábana), Oyinloye describe que los resultados demuestran que los extractos de *Monodora myristica* pertenecientes a la familia de las anonaceas, son efectivos en la mejora de los daños hepáticos derivados de la toxicidad inducida por agentes tóxicos como el CCl<sub>4</sub>. Lo que indica que los bioconstituyentes antioxidantes de *Monodora myristica*, desempeñan un papel importante en la toxicidad hepática, posiblemente al inhibir la bioacumulación de radicales libres <sup>(16)</sup>.

Olusola también concluye que *X. aethiopica* perteneciente al grupo de la familia annonaceae, tienen la capacidad de ofrecer un grado significativo de la protección de las células hepáticas contra la hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono disminuyendo los valores altos de fosfatasa alcalina sérica, por mecanismo de acción antioxidante, es por ello que los valores de fosfatasa alcalina sérica, disminuyeron después del tratamiento y esto puede deberse al efecto hepatoprotector del extracto de hojas de *Annona muricata* <sup>(14)</sup>.

La complejidad fitoquímica de los extractos de plantas puede ofrecer beneficios para la salud. *Annona muricata*, se ha utilizado para curar una amplia gama de enfermedades humanas. Se sabe que los frutos, hojas, tallos y raíces de Graviola son ricos en flavonoides, alcaloides de isoquinolina y acetogeninas anonáceas. Estos metabolitos son los que podrían estar ejerciendo el efecto hepatoprotector <sup>(34)</sup>.

## VI. CONCLUSIONES:

- El extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* (Guanábana) a dosis de 200mg/kg pc, administrado a *Rattus rattus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida presentó efecto hepatoprotector demostrado a través de la disminución de los niveles séricos de GOT de  $137.0 \pm 21.5$  a  $103.1 \pm 13.3$  UI/L y para GPT de  $85.1 \pm 6.7$  a  $34.8 \pm 6.7$  UI/L
- El extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* (Guanábana) a dosis de 400mg/kg pc, administrado a *Rattus rattus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida presentó efecto hepatoprotector demostrado a través de la disminución de los niveles séricos de GOT de  $152.5 \pm 33.9$  a  $87.2 \pm 9.1$  UI/L y para GPT de  $99.8 \pm 5.8$  a  $25.4 \pm 5.7$  UI/L.
- El extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata* (Guanábana) a dosis de 200mg/kg pc y 400mg/kg pc, presentó disminución de los valores séricos de Fosfatasa Alcalina en el grupo de 200mg/kg pc de  $120.9 \pm 8.2$  a  $34.3 \pm 8.4$  UI/L y el grupo de 400mg/kg pc de  $132.8 \pm 4.6$  a  $29.3 \pm 13.2$  UI/L en hepatotoxicidad inducida en *Rattus rattus var. albinus*. Comprobando que, la dosis de 400mg/kg pc presentó mejor efecto hepatoprotector.

## ASPECTOS COMPLEMENTARIOS:

### Recomendaciones

- Se recomienda el aislamiento de los metabolitos con capacidad hepatoprotectora de *Annona muricata* con la finalidad de poder formular nuevas formas de consumo de esta planta.

- Es necesario determinar los posibles metabolitos tóxicos presentes en *Annona muricata* para reducir la probabilidad de efectos adversos.
- Se sugiere continuar con las investigaciones a diferentes dosis y con diferentes tipos de procesos de obtención del extracto con el fin de determinar mejores resultados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tejada F. Hepatotoxicidad por Fármacos. Rev Clin Med Fam. [en internet]. 2010; 3(3): 177-191. [Citado el 10 de febrero del 2019]; Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1699695X2010000300006&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699695X2010000300006&lng=es).
2. Stickel F, Datz C, Hampe J, Bataller R. Pathophysiology and Management of Alcoholic Liver Disease: Update 2016. Gut and Liver. [en línea]. 2017; 11(2): 173-188. doi:10.5009/gnl16477.[Citado el 10 de febrero del 2019]
3. Dara L, Kaplowitz N. The contribution of ER stress to liver diseases. Hepatology (Baltimore, Md). [En internet]. 2011; 53(5):1752-1763. doi:10.1002/hep.24279.[Citado el 10 de febrero del 2019].
4. Fargion S, Porzio M, Fracanzani L. Nonalcoholic fatty liver disease and vascular disease: State-of-the-art. World Journal of Gastroenterology : WJG [en internet]. 2014; 20(37): 13306-13324. doi:10.3748/wjg.v20.i37.13306. [Citado el 11 de febrero del 2019]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4188888/>
5. Bustíos C, Dávalos M, Román R, Zumaeta E. Características Epidemiológicas y Clínicas de la Cirrosis Hepática en la Unidad de Hígado del HNERM Es-Salud. Rev. gastroenterol. Perú [Internet]. 2007 Jul [citado el 13 de febrero del 20019]; 27(3): 238-245. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1022-51292007000300003&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292007000300003&lng=es).
6. TETRACLORURO DE CARBONO (CARBON TETRACHLORIDE). Internet]. Estados Unidos. 2005. [Citado el 22 de febrero del 2019]. Disponible en: [https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts30.pdf](https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts30.pdf)
7. García M, Zurita A. Transaminasas: Valoración y significación clínica. [internet]. España. [Citado el 22 de febrero del 2019]. Disponible en: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/transaminasas.pdf>

8. Briz T, Briz.J, Felipe I, & col. Las plantas medicinales de Perú.ETNOBOTÁNICA Y VIABILIDAD COMERCIAL. Madrid: Libros de la Catarata. [en internet]. España.2010[citado el 22 febrero del 2019].Disponible en: <http://www.reduniversitaria.es/ficheros/Plantas%20medicinales.%20LIBRO.pdf>
9. Correa J, Ortiz D, Larrahondo J, & col. Actividad antioxidante en guanábana (*Annona muricata* L.): una revisión bibliográfica. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas [en línea]. 2012; 11(2): 111 – 126. [Citado el 22 de febrero del 2019]. Disponible en: <http://www.revistas.usach.cl/ojs/index.php/blacpma/article/viewFile/553/521>
10. Fernández A. EFECTO ANTIOXIDANTE E HIPOGLICEMIANTE DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE ANNONA MURICATA L “GUANÁBANA” EN ORYCTOLAGUS CUNICULUS “CONEJO” VAR. NEW ZELAND. [tesis].Perú.2012. [Citado el 22 de febrero del 2019]; <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/2086>
11. Vit P, Santiago B, and Pérez E. "Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L." Interciencia39.5 (2014).[Citado el 24 de febrero del 2019].Disponible en : <http://www.redalyc.org/html/339/33930879008/>
12. Magaña A, Gama.L Méndez M. EL USO DE PLANTAS MEDICINALES EN COMUNIDADES MAYACHONTALES. [en internet].Mexico.2010. [Citado 24 de febrero del 2019].Disponible en:<https://www.redalyc.org/pdf/621/62112471011.pdf>
13. Usunomena N. *Annona muricata* prevent hepatic fibrosis by enhancing lysosomal membrane stability and suppressing extracellular matrix protein accumulation. Int J Med [Internet]. 2016; 4(1):10–3. Available from: [Citado el 24 de febrero del 2019] <http://www.sciencepubco.com/index.php/IJM/article/view/5784>

14. Olusola A, Noghayin J. Aqueous Extract of the Fruits of *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich. Protects against Carbon Tetrachloride - Induced Hepatotoxicity in Rats. [En internet].Nigeria .2015. [Citado el 25 de febrero del 2019].
15. Sonkar N, Yadav A, Mishra K and Rao V. Evaluation of hepatoprotective activity of *annona squamosa* leaves and bark extract against carbon tetrachloride liver damage in wistar rats. India 2016 [Citado 25 de enero del 2019]. Disponible en: file:///C:/Users/user/Downloads/article\_wjpps\_1469875932.pdf
16. Oyinloye B, Adenowo A, Osunsanmi F, Ogunyinka B & col. Aqueous extract of *Monodora myristica* ameliorates cadmium-induced hepatotoxicity in male rats. *SpringerPlus*, 5(1), 641. [en internet]. Sudáfrica. 2016. [Citado el 25 de marzo del 2019] Disponible en : <https://link.springer.com/article/10.1186/s40064-016-2228-z>
17. Suchy D, Sarvesh P. Hepatoprotective Activity of Hydroalcoholic Extract of *Annona squamosa* Seeds. [en internet]. India. 2017. [Citado 25 de febrero del 2019]; Disponible en: <http://impactfactor.org/PDF/IJPPR/9/IJPPR,Vol9,Issue7,Article18.pdf>
18. Mohammad Z, Muhammad A, Rahman M & col. Hepatoprotective and antioxidant activities of *Annona squamosa* seed extract against alcohol-induced liver injury in Sprague Dawley rats. [en internet]. India .2018. [Citado el 25 de febrero del 2019] ; Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01480545.2018.1517772>
19. Arias B. Diversidad de usos, prácticas de recolección y diferencias según género y edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba, Argentina *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* [en línea]. 2009; 8(5): 389-401. [Citado el 25 de febrero del 2019]. Disponible en: [http://www.arnaldomartinez.net/medicina/plantas\\_medicinales\\_cordoba.pdf](http://www.arnaldomartinez.net/medicina/plantas_medicinales_cordoba.pdf)

20. Santamaria C, Gonzáles A. Extractos vegetales. [en internet]. España. 2015. [Citado el 25 de febrero del 2019]. Disponible en: <https://nutricionanimal.info/download/0315-ena-WEB.pdf>
21. Moghadamtousi S, Fadaeinasab M, Nikzad S & col. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. *Battino Med. International Journal of Molecular Sciences*. [en internet]. 2015; 16(7):15625-15658. doi: 10.3390/ijms160715625. [Citado el 25 de febrero del 2019].
22. Barahona V. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y VALOR NUTRACÉUTICO DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). [tesis de grado]. Ecuador. 2013. [Citado el 25 de febrero del 2019]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2453/1/56T00321.pdf>
23. Sousa V, De Lima P, Caramano C, Actividades antioxidantes y antimicrobianas de los aporfinoídes y otros alcaloides de la corteza de *Annona salzmanii* (annonaceae). 2012 [Citado el 25 de febrero del 2019]. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2012.688044?fbclid=IwAR0NHADx1Jjco452v1VU2Ssk06ZX6FGjVBbacTuWQdysoes3Df2UrZ7-bLY>
24. Cortes D, Moreno L, Parraga J. Nuevos fármacos inspirados en Annonáceas. *Rev Bras. Frutic.* [en línea]. 2014; 36(1): 22-31. [Citado el 25 de febrero del 2019]; Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-29452014000500003&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452014000500003&lng=en&nrm=iso). ISSN 0100-2945.
25. Durand K. Efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de *Annona cherimola* en una línea celular de cáncer de pulmón humano en medio de cultivo con pH ácido. [Tesis de maestría]. Loja: Universidad Nacional de Loja, 2016. [Citado el 25 febrero del 2019]. Disponible en: <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/10520/1/Karla%20del%20Cisne%20Dur%C3%A1n%20Hern%C3%A1ndez.pdf>

26. Florence, Ngueguim Tsofack & col. "Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats." *Journal of ethnopharmacology* 151.2 (2014): 784-790. [Citado el 25 de febrero del 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874113006569>
  
27. Wooden E, Terlabi E, Larbie C. Evaluation of acute and subchronic toxicity of *Annona Muricata* (Linn.) aqueous extract in animals. *European Journal of Experimental Biology* [en internet]. 2011; 1(4):115-124. [Citado el 26 de febrero del 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/225280339\\_Evaluation\\_of\\_acute\\_and\\_subchronic\\_toxicity\\_of\\_Annona\\_Muricata\\_Linn\\_aqueous\\_extract\\_in\\_animals](https://www.researchgate.net/publication/225280339_Evaluation_of_acute_and_subchronic_toxicity_of_Annona_Muricata_Linn_aqueous_extract_in_animals)
  
28. Hall J. Guyton and Hall Tratado de Fisiología Médica. Madrid: Elsevier; 2011. [Citado el 26 de febrero del 2019].
  
29. Saleem, TS Mohamed, & col. "Hepatoprotective herbs—a review." *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences* 1.1. [En internet]. (2010): 1-5. [Citado e 26 de febrero del 2019]. Disponible en: <https://www.pharmascope.org/~pharmascope/index.php/ijrps/article/view/295/142>
  
30. Fernández E, Moral M. Aproximación al diagnóstico de enfermedades hepáticas por el laboratorio clínico. *Medicina & Laboratorio*. [en internet]. 2013, vol.14, no 11-12, p. 533-546. [Citado 26 de febrero del 2019]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2008/myl0811-12c.pdf>
  
31. Sojo A. Alteración de las transaminasas y estudio función hepática. [en internet]. Bilbao.2002.[Citado el 27 de febrero del 2019]. Disponible en : <http://www.svnp.es/sites/default/files/transaminasas.pdf>
  
32. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). RESUMEN DE SALUD PÚBLICA Tetracloruro de Carbono. [en línea]. [Citado el 27 de febrero del 2019]; Disponible en: <https://www.atsdr.cdc.gov/es/index.html>

33. Slater, T. F., and B. C. Sawyer. "The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. General features of the systems used." *Biochemical Journal* 123.5 (1971): 805-814. [Citado el 27 de febrero del 2019]. Disponible en: <http://www.biochemj.org/content/123/5/805>
34. Yang C, Shusma G, Rao M & col. Las interacciones sinérgicas entre flavonoides y acetogeninas en las hojas de Graviola (*Annona muricata*) confieren en la protección contra el cáncer [en internet]. [Citado el 27 de febrero del 2019]. Disponible en: [https://academic.oup.com/carcin/article/36/6/656/276738?fbclid=IwAR0l\\_aXBnVSp7qRnoBMPwEu3PIjTXyJzkKVZPKYmLKWY7lr9WsYi\\_laljZI](https://academic.oup.com/carcin/article/36/6/656/276738?fbclid=IwAR0l_aXBnVSp7qRnoBMPwEu3PIjTXyJzkKVZPKYmLKWY7lr9WsYi_laljZI)
35. Universidad Católica los Ángeles de Chimbote. Código de Ética para la investigación versión 001. [en internet]. 2016. [Citado en 27 de febrero del 2019]. Disponible en : [file:///C:/Users/user/Downloads/codigo-de-etica-para-la-investigacion-v001%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/user/Downloads/codigo-de-etica-para-la-investigacion-v001%20(3).pdf)
36. Basu S. Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity: A Classic Model of Lipid Peroxidation and Oxidative Stress. In: *Studies on Experimental Models* [en internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2011 [Citado el 03 de marzo del 2019]. p. 467–80. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-956-7\\_21](http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-956-7_21)
37. Poupon R. Liver alkaline phosphatase: A missing link between cholestasis and biliary inflammation. *Hepatology* [Internet]. 2015 Jun 1 [Citado el 06 de marzo del 2019]; 61(6):2080–90. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.27715>

## ANEXOS

ANEXO 01: TAXONOMIA DE LA PLANTA DE *Annona muricata* (GUANÁBANA).

<b>REINO</b>	Vegetal
<b>DIVISIÓN</b>	Spermatophytia
<b>SUBDIVISIÓN</b>	Angiosperma,
<b>CLASE</b>	Dicotiledónea
<b>SUBCLASE</b>	Archylamudae
<b>ORDEN</b>	Ranae
<b>FAMILIA</b>	Anonaceae
<b>GÉNERO</b>	Annona
<b>ESPECIE</b>	Muricata L.

FUENTE: VIVIANA BARAHONA. RIOBAMBA – ECUADOR .2015

ANEXO 02: GUANÁBANA (*Annona muricata*).



FUENTE: Partes de la guanabana. Disponible en:  
[https://www.interempresas.net/FeriaVirtual/Catalogos\\_y\\_documentos/81972/046---11.05.10---Cultivo-de-la-Guana--769-bana.pdf](https://www.interempresas.net/FeriaVirtual/Catalogos_y_documentos/81972/046---11.05.10---Cultivo-de-la-Guana--769-bana.pdf)

ANEXO 03: RECOLECCIÓN DE LA PLANTA DE GUANÁBANA (*Annona muricata*), EN EL DISTRITO DE SAMNE- LA LIBERTAD



FUENTE: FOTOS OTORGADAS POR LA ALUMNA TESISISTA.

ANEXO 04: SECADO DE MUESTRA DE *Annona muricata*, PARA SU DETERMINACIÓN TAXONÓMICA.



FUENTE: FOTOS OTORGADAS POR LA ALUMNA TESISISTA.

ANEXO 05: CERTIFICACIÓN DE LA PLANTA DE *Annona muricata* (GUANBANA).



FUENTE: FOTO OTORGADA POR EL HERBARIO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO.

ANEXO 06: UBICACIÓN DEL CENTRO POBLADO DE SAMNE, EN EL DISTRITO DE OTUZCO, PROVINCIA DE OTUZCO, DEPARTAMENTO DE LA LIBERTAD, PERÚ.



FUENTE: Google Maps. Disponibles en: <https://www.google.com/maps>

ANEXO 07: LAVADO Y DESENGRASADO DE LAS HOJAS DE *Annona muricata*.



FUENTE: FOTOS OTORGADAS POR ALUMNA TESISISTA.

ANEXO 08: SELECCIÓN DE HOJAS SECAS EN BUEN ESTADO.



FUENTE: FOTO OTORGADA POR LA ALUMNA TESISTA

ANEXO 09: MOLIENDO LAS HOJAS SECAS DE *Annona muricata* (GUANÁBANA).



FUENTE: FOTO OTORGADA POR LA ALUMNA TESISTA

ANEXO 10: PREPARANDO EL TAMIZADO DE LAS HOJAS DE *Annona muricata* (GUANÁBANA).



FUENTE: FOTO OTORGADA POR LA ALUMNA TESISISTA

ANEXO 11: PREPARACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Annona muricata* (GUANÁBANA).



FUENTE: FOTOS OTORGADAS POR LA ALUMNA TESISISTA.

ANEXO 12: EXTRACTO DE *Annona muricata* (GUANÁBANA)



FUENTE: FOTOS OTORGADAS POR LA ALUMNA TESISISTA.

ANEXO 13: PREPARACIÓN DE MATERIALES PARA LA REALIZACION DE INDUCCION DE HEPATOTOXICIDAD.



FUENTE: FOTOS OTORGADAS POR LA ALUMNA TESISISTA.

ANEXO 14: BOLETA DE COMPRA DE MATERIAL BIOLÓGICO RATAS ALBINAS, OTORGADA POR EL INS (INSTITUTO NACIONAL DE SALUD).

MINISTERIO DE SALUD INSTITUTO NACIONAL DE SALUD		R.U.C. 20131263130 BOLETA DE VENTA ELECTRONICA B002 - 0000112		
<small>Av. Defensores del Morro N° 2268 - Lima - Lima - Chorrillos Telf: 748-1111 - Anexo 1550 / 1397</small>				
Señor(es) : VASQUEZ GUEVARA ,YANHY YAVHE Direccion : MZ.H LT.05 SEC.SAN MIGUEL TRUJILLO LA LIBERTAD - TRUJILLO		Fecha : 17/08/2017		
CANT	CODIGO	DESCRIPCION	P.UNITARIO	IMPORTE
12.00	10404030401	Ratas Albinas	14.32	171.84
6.00	10404030406	Alimento Balanceado para Ratones x 1 kilo	3.18	19.08



FUENTE: DATOS OTORGADOS POR EL INS (INSTITUTO NACIONAL DE SALUD).

ANEXO 15: PESADO Y SELECCIÓN DE LOS GRUPOS DE EXPERIMENTO.



FUENTE: FOTOS OTORGADAS POR LA ALUMNA TESISISTA.

ANEXO 16: INDUCCIÓN DE HEPATOTOXICIDAD CON CCL<sub>4</sub> A *Rattus rattus* var. *albinus*.



FUENTE: FOTOS OTORGADAS POR LA ALUMNA TESISISTA.

ANEXO 17: ADMINISTRACIÓN DEL ANESTESICO (KETAMINA + XILACINA) VIA INTRAMUSCULAR.



FUENTE: FOTOS OTORGADAS POR LA ALUMNA TESISISTA.

**ANEXO 18: DEPILACIÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**



FUENTE: FOTOS OTORGADAS POR LA ALUMNA TESISISTA.

**ANEXO 19: TÉCNICA DE PUNCIÓN CARDIACA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**



FUENTE: FOTOS OTORGADAS POR LA ALUMNA TESISISTA.

**ANEXO 20: MUESTRAS LLEVADAS A LA CENTRIFUGA.**



**FUENTE: FOTOS OTROGADAS POR LA ALUMNA TESISISTA.**

**ANEXO 21: TOMA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.**



**FUENTE: FOTOS OTORGADAS POR LA ALUMNA TESISISTA.**

ANEXO 22: MEDICIÓN DE LOS VALORES DE TRANSAMINASAS Y FOSFATASA ALCALINA SÉRICA.



FUENTE: FOTOS OTORGADAS POR LA ALUMNA TESISISTA.

ANEXO 23: MUESTRAS CON EL REACTIVO PARA SU LECTURA EN EL ESPECTROFOTOMETRO



FUENTE: FOTOS OTORGADAS POR LA ALUMNA TESISISTA.



# Transaminasas 200

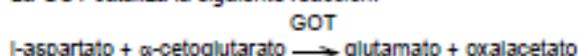
Para la determinación de Transaminasa Glutámico Oxalacética (GOT(AST) y Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT(ALT)

## SIGNIFICACION CLINICA

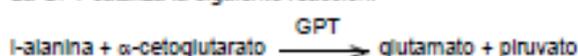
Las transaminasas GOT y GPT son enzimas ampliamente difundidas en el organismo con elevada concentración en corazón, hígado, músculo esquelético, riñón y eritrocitos. La actividad sérica en condiciones normales es baja o nula. Un daño o enfermedad en cualquiera de estos tejidos conduce a un aumento en los niveles séricos. Así, luego de un infarto de miocardio se produce en suero un marcado aumento de la actividad de GOT (abundante en músculo cardíaco). En hepatitis virales y otras formas de enfermedad hepática que involucren necrosis tisular, predominará la actividad sérica de GPT (abundante en tejido hepático). Una elevada actividad de transaminasas puede detectarse también en traumas accidentales o quirúrgicos y en distrofias musculares o miositis.

## FUNDAMENTOS DEL METODO

La GOT cataliza la siguiente reacción:



La GPT cataliza la siguiente reacción:



El piruvato formado (el oxalacetato es inestable y se transforma en piruvato), reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina produciéndose, en medio alcalino, un compuesto coloreado que se mide a 505 nm.

## REACTIVOS PROVISTOS

- Transaminasas 200 GOT provee:

A. Reactivo A: solución con 100 mM de L-aspartato y 2 mM de  $\alpha$ -cetoglutarato en buffer fosfatos 100 mM, pH 7,4.

- Transaminasas 200 GPT provee:

A. Reactivo A: solución con 200 mM de D-alanina y 2 mM de  $\alpha$ -cetoglutarato en buffer fosfatos 100 mM, pH 7,4.

Además, ambos equipos proveen:

B. Reactivo B: solución conteniendo 1 mmol de 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNFH) en ácido clorhídrico 1 mol/l.

C. Reactivo C: solución de hidróxido de sodio 4 mol/l.

S. Standard: solución de piruvato de sodio 2 mmol/l. Para efectuar la curva de calibración.

## REACTIVOS NO PROVISTOS

Agua destilada.

## INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivo A (GOT o GPT): listo para usar.

Reactivo B: listo para usar.

Reactivo C diluido (0,40 mol/l); preparación:

- Trasvasar el contenido del frasco a un matraz de 1 litro.

- Lavar el frasco con un pequeño volumen de agua destilada y pasar el líquido de lavado al matraz. Repetir esta operación 3-4 veces.

- Diluir con agua destilada hasta el aforo. Tapar y mezclar bien por inversión.

- Envasar en un frasco de plástico de buen cierre (no utilizar frasco de vidrio).

Standard: listo para usar en la curva de GPT. Diluir 1:2 con Reactivo A para la curva de GOT.

## PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

Reactivo B y C: corrosivos. H315 + H320: Provoca irritación cutánea y ocular. H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. P262: Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa. P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando. P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

## ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE

### ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: estables a temperatura ambiente (< 25°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

## INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Cuando el espectrofotómetro ha sido llevado a cero con agua destilada, lecturas del Blanco inferiores a 0,270 D.O. a 505 nm son indicio de deterioro del mismo. También indica deterioro la aparición de turbidez.

## MUESTRA

Suero

a) Recolección: se debe obtener suero de la manera usual. No es necesario que el paciente esté en ayunas para la extracción de sangre.

b) Aditivos: no se requieren.

c) **Sustancias Interferentes conocidas:** los sueros hemolizados producen resultados falsamente elevados ya que los glóbulos rojos contienen 3 a 5 veces más enzimas que el suero. Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) **Estabilidad e Instrucciones de almacenamiento:** en caso de no efectuarse la determinación en el día, puede conservarse el suero refrigerado a 4°C durante no más de 5 días.

**MATERIAL REQUERIDO (no provisto)**

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Material volumétrico adecuado.
- Baño de agua a 37°C.
- Reloj o timer.

**CONDICIONES DE REACCION**

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro, Hg 546 o en fotocolorímetro con filtro verde (500-550 nm).
- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 40 minutos
- Volumen de muestra: 100 ul
- Volumen final de reacción: 6,1 ml

Alternativamente pueden disminuirse los volúmenes de Muestra y Reactivos a la mitad.

<b>PROCEDIMIENTO</b>		
En dos tubos marcados B (Blanco) y D (Desconocido), colocar:		
	B	D
Reactivo A (GOT o GPT)	0,5 ml	0,5 ml
Colocar en baño de agua a 37°C ± 0,5°C unos minutos.		
Suero	-	100 ul
Agua destilada	100 ul	-
Mezclar por agitación suave e Incubar exactamente 30 minutos y agregar:		
Reactivo B	0,5 ml	0,5 ml
Mezclar. Dejar 10 minutos a 37°C. Luego agregar:		
Reactivo C diluido	5 ml	5 ml
Mezclar por inversión y retirar del baño. Después de 2 minutos leer la absorbancia en fotocolorímetro con filtro verde (500-550 nm); en espectrofotómetro a 505 nm o Hg 546, llevando el aparato a cero D.O. con agua destilada.		

**ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL**

El color de la reacción es estable durante 30 minutos por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de ese lapso.

**CALCULO DE LOS RESULTADOS**

a) **Empleando tablas de conversión:**

Este cálculo se basa en la absorbividad del cromógeno y

los valores de actividad enzimática pueden deducirse de las tablas de conversión obtenidas por comparación con el método UV convencional, siempre que las lecturas se efectúen en las siguientes condiciones de medida: cubetas de caras paralelas de 1 cm de espesor, semiancho de banda ≤ 8 nm y longitud de onda 505 nm o Hg 546.

**GOT (30 min):**

Hg 546	Método UV convencional (U/l)	505 nm
0,020	5	0,034
0,030	7	0,047
0,040	10	0,061
0,050	14	0,080
0,060	19	0,100
0,070	23	0,115
0,080	26	0,129
0,090	31	0,146
0,100	36	0,164
0,110	41	0,180
0,120	46	0,196
0,130	50	0,210
0,140	55	0,224
0,150	61	0,239
0,160	67	0,254
0,170	74	0,269

**GPT:**

Hg 546	Método UV convencional (U/l)	505 nm
0,020	5	0,034
0,040	9	0,061
0,060	14	0,100
0,080	18	0,129
0,100	23	0,164
0,120	27	0,196
0,140	32	0,224
0,160	37	0,254
0,180	42	0,284
0,200	47	0,314
0,220	52	0,340
0,240	57	0,364
0,260	62	0,389
0,280	68	0,415
0,300	74	0,442
0,320	80	0,468
0,340	87	0,494
0,360	96	0,524
0,380	104	0,552

b) **Empleando curva de calibración:**

Emplear el Standard como se indicó en INSTRUCCIONES PARA SU USO. En 9 tubos colocar:

Tubo	Standard (ml)	Reactivo A (ml)	Agua dest. (ml)	GPT (U/l)	GOT (U/l)
1	0,00	1,00	0,2	-	-
2	0,05	0,95	0,2	9	7
3	0,10	0,90	0,2	18	12
4	0,15	0,85	0,2	25	20
5	0,20	0,80	0,2	37	28
6	0,25	0,75	0,2	46	37
7	0,30	0,70	0,2	56	48
8	0,40	0,60	0,2	79	81
9	0,50	0,50	0,2	113	-

Mezclar y agregar a cada tubo, con intervalos de 1/2 minuto entre uno y otro, 1 ml de Reactivo B. Mezclar. Incubar 10 minutos a 37°C (contados desde el agregado del Reactivo B al primer tubo). Luego agregar 10 ml de Reactivo C preparado a cada tubo, manteniendo el intervalo de 1/2 minuto. Mezclar cada tubo inmediatamente por inversión y retirar del Baño. Diez minutos después, leer absorbancia con filtro verde (500-550 nm) o en espectrofotómetro a 505 nm, llevando el aparato a cero D.O. con agua destilada. El color es estable 30 minutos.

Restar a cada lectura la obtenida con el tubo N° 1, obteniéndose las Lecturas Corregidas.

En un papel milimetrado, trazar un sistema de coordenadas colocando en el eje vertical las Lecturas Corregidas y en el horizontal las actividades para GPT y GOT. Determinar en el gráfico los puntos correspondientes a cada tubo. Uniéndolos se obtienen las curvas respectivas para GOT y GPT. Tener en cuenta que para cada técnica debe utilizarse el gráfico correspondiente.

#### CONVERSION DE UNIDADES

Los resultados pueden ser expresados en U/l o en las antiguas unidades del método (Karmen o Wroblecky), para lo que deben utilizarse las siguientes equivalencias:

$$U/l = UKarmen/ml \text{ (o Wroblecky/ml)} \times 0,482$$

$$UKarmen/ml \text{ (o Wroblecky/ml)} = U/l \times 2,07$$

No obstante debe tenerse en cuenta que en sueros patológicos la conversión no siempre es exacta.

#### VALORES DE REFERENCIA

Se consideran valores normales de transaminasas (GOT y GPT) hasta 12 U/l. Si bien se han hallado individuos normales con valores hasta 18 U/l, los niveles de transaminasas que se encuentren entre 12 y 18 U/l deben considerarse sospechosos.

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias Interferentes conocidas en MUESTRA.

- La temperatura ambiente y el tiempo de incubación son críticos. Por cada grado de temperatura, la variación es aproximadamente del 7%.
- El autor del método recomienda procesar un blanco de sue-

ros (sin incubar o agregando el suero después del Reactivo B) cuando se trabaja con muestras hemolizadas, muy ictericas o cuando se sospecha la presencia de cetosis.

#### PERFORMANCE

a) **Reproducibilidad:** procesando replicados de las mismas muestras en un mismo día, se obtuvieron los siguientes datos:

##### GOT:

Nivel	D.S.	C.V.
19,3 U/l	± 1,50 U/l	7,77 %
49,0 U/l	± 2,19 U/l	4,47 %
66,5 U/l	± 3,44 U/l	5,17 %

##### GPT:

Nivel	D.S.	C.V.
16,5 U/l	± 0,79 U/l	4,79 %
23,3 U/l	± 1,16 U/l	4,98 %
44,8 U/l	± 2,35 U/l	5,25 %

b) **Límite de detección:** depende del fotómetro empleado. En espectrofotómetro a 505 nm (con cubetas de caras paralelas de 1 cm de espesor, reproducibilidad ± 2 nm, luz espuria ≤ 0,5 %, semiancho de banda ≤ 8 nm) para un cambio mínimo de 0,001 D.O. el mínimo cambio de actividad detectable será de 0,5 U/l para un nivel de GOT de 88 U/l y 0,2 U/l para un nivel de GPT de 64 U/l.

c) **Rango dinámico:** si la actividad de la muestra es mayor de 80 U/l de GOT o GPT, debe repetirse la determinación diluyendo previamente la muestra con solución fisiológica o empleando menor cantidad de suero.

#### PRESENTACION

GOT: equipo para 200-400 determinaciones (Cód. 1751002).

GPT: equipo para 200-400 determinaciones (Cód. 1761002).

#### BIBLIOGRAFIA

- Reitman, S. & Frankel, F. - Am. J. Clin. Path. 28:56 (1957).
- Frankel, S. - Gradwohl's Clinical laboratory methods and diagnostic Vol. 1 pág. 123 - Ed. por Frankel, Reitman y Sonnenwirth - (7ª Ed., 1970).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4ª ed., 2001.

# Símbolos

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.

	Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"		Elaborado por:
	Representante autorizado en la Comunidad Europea		Nocivo
	Uso diagnóstico "in vitro"		Corrosivo / Cáustico
	Contenido suficiente para <n> ensayos		Irritante
	Fecha de caducidad		Consultar Instrucciones de uso
	Límite de temperatura (conservar a)		Calibrador
	No congelar		Control
	Riesgo biológico		Control Positivo
	Volumen después de la reconstitución		Control Negativo
	Contenido		Número de catálogo
	Número de lote		

Wiener Laboratorios S.A.I.C.  
Robamba 2944  
2000 - Rosario - Argentina  
<http://www.wiener-lab.com.ar>  
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola  
Bioquímica  
Producto Autorizado A.N.M.A.T.  
Disp. N°: 25275-5231/98



**Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina

## ANEXO 25: KIT DE FOSFATASA ALCALINA SÉRICA.

### FOSFATASA ALCALINA – LS (IFCC)

Reactivo líquido para la determinación de la enzima Fosfatasa Alcalina en suero o plasma a 37°C. según IFCC.



Para uso en el diagnóstico *In Vitro*. Apto para usar en autoanalizador.

#### SIGNIFICANCIA CLÍNICA

La enzima fosfatasa alcalina se encuentra concentrada en el hígado, hueso, placenta, intestino, y algunos tumores. En los niños y durante el embarazo se encuentra en concentraciones más altas debido a los procesos de crecimiento óseo y por acción placentaria, respectivamente. Esta enzima se encuentra elevada en enfermedades tales como la hepatitis, enfermedades óseas, entre otras.

#### FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

Test químico y fotométrico de acuerdo a IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine). La fosfatasa alcalina cataliza la hidrólisis del p-Nitrofenilfosfato a p-Nitrofenol y fosfato, produciéndose un aumento de absorbancia a 405 nm, proporcional a la concentración de enzima en la muestra.



#### REACTIVOS

Conservarlos entre 2° y 8°C, y protegidos de la luz, estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

##### Reactivo 1:

Buffer 2-amino-2-metil-1-propanol pH 10,4	0,58 M
MgCl <sub>2</sub>	2 m M
Sulfato de Zinc	1 m M
HEDTA	2 m M
Estabilizantes no reactivos	c.c.

##### Reactivo 2:

p-Nitrofenilfosfato	66 mM
Estabilizantes no reactivos	c.c.

#### Preparación del Reactivo de Trabajo:

Mezclar 10 ml. de Reactivo 1 con 2 ml. de Reactivo 2 o preparar el volumen requerido manteniendo la proporción. Protejase este reactivo de la luz directa. Estabilidad del reactivo de trabajo: 10 días entre 2° y 8°C. Descartar el reactivo si su absorbancia es mayor de 0,8 a 405 nm. contra blanco de agua.

#### MUESTRA

De preferencia utilizar suero libre de hemólisis o plasma heparinizado. No utilizar plasma obtenido con oxalato, fluoruro o citrato ya que interfieren con el ensayo. La fosfatasa alcalina es estable a lo menos 4 días entre 2° y 8°C, y sobre un mes a -20°C.

#### MATERIAL NECESARIO NO INCLUIDO

Espectrofotómetro manual o automático o fotocolorímetro de filtros con cubeta termorregulada, capaz de medir absorbancia a 405 nm, baño termorregulado, cronómetro, pipetas, calibrador y sueros controles.

#### TÉCNICA

Llevar el reactivo a la temperatura de reacción [37°C] y poner el espectrofotómetro en cero contra blanco de agua destilada.

Reactivo de trabajo	(ml)	1,00
Volumen de muestra	(ml)	0,02
Mezclar y transferir a la cubeta del espectrofotómetro. Incubar 60 segundos a la temperatura de reacción. Leer la absorbancia inicial (A1) a 405 nm. Repetir la lectura a los 60 segundos, exactos.		

Adaptaciones para la aplicación de este reactivo en autoanalizadores están disponibles a solicitud. Es responsabilidad del laboratorio validar esta aplicación.

#### CALIBRACIÓN

- En la calibración se recomienda utilizar calibrador sérico VALTRON-C (código 210-130), proceder de igual forma que con las muestras.
- Se recomienda recalibrar en cualquier momento que se evidencie alguno de estos acontecimientos:
  - El lote de reactivo cambia
  - Se realiza un mantenimiento preventivo del equipo
  - Los valores de control han cambiado o se encuentran fuera de escala.

#### CALCULOS

$$\text{Factor} = \frac{\text{Concentración Calibrador}}{\Delta A/\text{min. Calibrador}}$$

$$\text{Actividad PAL (U/L)} = \text{Factor} \times \text{Abs. Muestra}$$

O bien se puede utilizar el siguiente factor:

$$\text{Actividad PAL (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 2751$$

$$\text{Factor} = \frac{Vt \times 1000}{\sum_{i=1}^n A_i \times P \times Vm} = 2751$$

Vt= Volumen total de reacción  
 $\sum_{i=1}^n A_i$  = Coef. de extinción milimolar del p-NPP a 405 nm.  
 P= Espesor del paso de luz en la cubeta  
 Vm= Volumen de muestra utilizado

#### CONTROL DE CALIDAD

- Es conveniente analizar junto con las muestras, sueros controles valorados para Fosfatasa Alcalina por este método. Se recomienda la utilización de los sueros controles VALTRON-N (código 210-100) y VALTRON-P (código 210-130).
- Si los valores obtenidos para los controles se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, el reactivo y el calibrador.
- Cada laboratorio debe disponer de su propio Control de Calidad y establecer las correcciones necesarias en caso de que no se cumpla con las tolerancias permitidas para los controles.

Valtek S.A. Av. Marathon 1943, Ñuñoa, Santiago de Chile / Tel. + (562) 654 1100  
 Fax + (562) 654 1199 / www.valtekdiagnostics.com / info@valtek.cl

- Si los valores obtenidos para los controles se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, el reactivo y el calibrador.
- Cada laboratorio debe disponer de su propio Control de Calidad y establecer las correcciones necesarias en caso de que no se cumpla con las tolerancias permitidas para los controles.

#### ADVERTENCIAS Y MEDIDAS DE PRECAUCION:

- Los volúmenes indicados pueden ser alterados proporcionalmente sin alterar los resultados.
- El factor podría variar en autoanalizadores por diferencia en el espesor de paso de luz. En este caso utilizar un calibrador sérico VALTROL-C (código 210-130) para obtener el factor.
- No utilizar plasma obtenido con oxalato, fluoruro o citrato ya que interfieren con el ensayo
- Consultar en nuestra página WEB la ficha de seguridad de este reactivo y observar todas las medidas de precaución necesarias para la manipulación y eliminación de residuos.
- En autoanalizadores debe utilizarse contenedores de reactivos nuevos.

#### ESPECIFICACIONES DE DESEMPEÑO:

-Linealidad: 825 U/L

Para valores superiores 825 U/L, diluir la muestra con suero fisiológico y el resultado obtenido se multiplica por el factor de dilución.

-Límite de detección: 4 U/L.

-Interferencias: Hemoglobina sobre 1,0 gr/dL, bilirrubina sobre 20 mg/dL y la lipemia (triglicéridos sobre 1000 mg/dL) podrían interferir en la técnica. Otros medicamentos y sustancias podrían interferir (4).

-Exactitud: Los reactivos VALTEK no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.

-Repetibilidad intraserie: n=20

Nivel	Media(U/L)	C.V.
Normal	151	1,15%
Patológico	513	1,19%

-Reproducibilidad interserie: n=20

Nivel	Media(U/L)	C.V.
Normal	70,8	0,98%
Patológico	186,7	1,07%

Estos datos han sido obtenidos utilizando un autoanalizador MINDRAY de la serie BS. Los resultados pueden variar al cambiar de instrumento o al realizar el procedimiento manualmente.

-Certificado de Conformidad y Trazabilidad disponible a solicitud

#### RANGOS DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos de referencia en función de la población de pacientes. Los rangos de referencia que se enumeran a continuación están tomados de la bibliografía existente.

Mujeres	64 – 306
Hombres	80 – 306
Niños hasta 15 años	hasta 644
Niños hasta 17 años	hasta 483

#### BIBLIOGRAFIA

1. Tietz, N.W. (ed) Fundamentals of Clinical Chemistry  
W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1976.
2. Henry, R.J., Clinical Chemistry, Principles and Technics.  
Harper and Row Publishers. New York, 1964.
3. Young, D.S., et al., Clin Chem. 18(10), 1972
4. Young D.S., effects of drugs on clinical laboratory tests,  
4<sup>th</sup> ed. AACCC Press, 1995.

#### REV Nº 1

ANEXO 26:

TABLA 03: PRUEBA DE CHAPIRO – WILKS PARA DETERMINAR LA NORMALIDAD DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

**Pruebas de normalidad**

GRUPOS	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
INICIAL G (-)	.957	6	.797
INICIAL G (+)	.945	6	.696
INICIAL G (EXP1)	.877	6	.256
INICIAL G (EXP2)	.834	6	.116
FINAL G (-)	.956	6	.788
FINAL G (+)	.937	6	.634
FINAL G (EXP1)	.917	6	.485
FINAL G (EXP2)	.961	6	.826
INICIAL G (-)	.989	6	.986
INICIAL G (+)	.842	6	.134
INICIAL G (EXP1)	.747	6	.190
INICIAL G (EXP2)	.868	6	.218
FINAL G (-)	.942	6	.672
FINAL G (+)	.825	6	.097
FINAL G (EXP1)	.824	6	.096
FINAL G (EXP2)	.830	6	.108

\* Este es un límite inferior de la significación verdadera.

A Corrección de la significación de Lilliefors

FUENTE: SPSS 20.0 SOBRE LOS DATOS OBTENIDOS POR LA INVESTIGADORA EN EL ESTUDIO

ANEXO 27:

TABLA: 04 PRUEBA ANOVA UNIFACTORIAL PARA ENCONTRAR LA SIGNIFICANCIA DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

ANOVA

	F	Sig.
Inter-grupos	43.850	.000
Intra-grupos		
Total		
Inter-grupos	110.575	
Intra-grupos		
Total		

FUENTE: SPSS 20.0 SOBRE LOS DATOS OBTENIDOS POR LA INVESTIGADORA EN EL ESTUDIO

ANEXO 28:

TABLA 05: PRUEBA DE COMPARACIONES MULTIPLES DE TUKEY PARA LOS GRUPOS ANTES Y DESPUÉS

Comparaciones múltiples HSD de Tukey			
Variable dependiente	(I) GRUPOS	(J) GRUPOS	Sig.
GOT	INICIAL G (-)	INICIAL G (+)	.000
		INICIAL G (EXP1)	.000
		INICIAL G(EXP2)	.000
		FINAL G (-)	1.000
		FINAL G (+)	.000
		FINAL G (EXP1)	.000
		FINAL G (EXP2)	.000
		FINAL G (EXP2)	.000
	INICIAL G (+)	INICIAL G (EXP1)	.988
		INICIAL G(EXP2)	.999
		FINAL G (-)	.000
		FINAL G (+)	.885
	FINAL G (-)	FINAL G (+)	.000
		FINAL G (EXP1)	.000
		FINAL G (EXP2)	.000
	FINAL G (+)	FINAL G (EXP1)	.676
FINAL G (EXP2)		.005	
FINAL G (EXP1)	FINAL G (EXP2)	.291	
GTP	INICIAL G (-)	INICIAL G (+)	.228
		INICIAL G (EXP1)	.001
		INICIAL G(EXP2)	.003
		FINAL G (-)	1.000
		FINAL G (+)	.000
		FINAL G (EXP1)	.000
		FINAL G (EXP2)	.000
		FINAL G (EXP2)	.000
	INICIAL G (+)	INICIAL G (EXP1)	.464
		INICIAL G(EXP2)	.681
		FINAL G (-)	.434
		FINAL G (+)	.000
	FINAL G (-)	FINAL G (EXP1)	.000
		FINAL G (EXP2)	.000
		FINAL G (EXP2)	.000
	FINAL G (+)	INICIAL G (EXP1)	.000
INICIAL G(EXP2)		.000	
FINAL G (EXP1)	FINAL G (EXP2)	.000	

\* La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

FUENTE: SPSS 20.0 SOBRE LOS DATOS OBTENIDOS POR LA INVESTIGADORA EN EL ESTUDIO.