



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

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

**EFECTO HEPATOPROTECTOR DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Cajanus cajan*
(Guandul) EN *Rattus norvegicus var. albinus* CON
HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR ACRILAMIDA**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR

Bach. ESPINOZA RUCOBA, DORY DELICIA

ASESOR

Mgtr. 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 Investigado

AGRADECIMIENTO

A Dios, por ser mi guía, por brindarme la salud, la vida y por darme el conocimiento y guiarme en la elaboración de este trabajo.

A mis padres, por sus enseñanzas, amor, paciencia y apoyo incondicional durante mi formación profesional.

A la Universidad Católica Los Ángeles De Chimbote y plana docente, por la formación académica brindada.

DEDICATORIA

A mis padres, porque ellos siempre estuvieron a mi lado brindándome todo el apoyo incondicional durante mi formación académica.

A mi hija Anny Sofya por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día.

A mi familia, porque siempre me han apoyado de manera incondicional en toda mi carrera profesional y han estado pendientes de mí.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación, de tipo experimental y enfoque cuantitativo se realizó con el objetivo de demostrar el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de *Cajanus cajan* (Guandúl) en *Rattus norvegicus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida por acrilamida. Estuvo conformado por un grupo negativo, un grupo control positivo y dos experimentales (I y II), Al grupo negativo se proporcionó alimentación y agua ad libitum, al grupo control positivo se les indujo a hepatotoxicidad con acrilamida (50 mg/kg p.c por vía intra peritoneal, dosis única) a los grupos experimentales I y II se les administró extracto hidroalcohólico de *Cajanus cajan* en dosis de 300 mg/Kg pc y 600 mg/Kg pc por sonda orogástrica durante 7 días, administrando en el quinto día acrilamida 50mg/kg pc, se evaluaron los niveles séricos de Transaminasa Glutámico oxalacetato (GOT), Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) y Fosfatasa alcalina en el quinto y octavo día de los tratamientos. Los resultados para GOT y GPT inicial y final fueron: Grupo control negativo 16.5±2.1 UI/L y 14.2±2.28 UI/L, 12.4±2.3 UI/L y 13.9±2.0 UI/L Grupo control positivo 121.2±4.1 UI/L y 137.5±4.5 UI/L, 108.2±3.4 UI/L y 136.8±4.1UI/L Experimental I 115.0±3.4 UI/L y 73.1±14.3 UI/L, 106.7±1.9 UI/L y 64.2±2.8 UI/L Experimental II 102.4± 6.8 UI/L y 57.2±8.1 UI/L, 78.7±2.1UI/L y 40.7±1.8 UI/L y para Fosfatasa alcalina: Grupo control negativo 19.2±3.4 UI/L y 15.7±3.3 UI/L, Grupo control Positivo 92.1±3.0 UI/L y 104.2±14.6 UI/L, Experimental I 70.8±4.6 UI/L y 32.1±4.3UI/L, Experimental II 59.9±4.6 UI/L y 24.8±4.7 UI/L. Al comparar los valores de transaminasas mediante la prueba ANOVA se obtuvo diferencia significativa entre grupos ($p<0.003$), y para Fosfatasa alcalina ($p<0.001$).Se concluye que el extracto de *Cajanus cajan* tiene efecto hepatoprotector en *Rattus norvegicus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida por acrilamida.

Palabras Clave: Acrilamida, *Cajanus cajan*, hepatoprotector.

ABSTRACT

The present research work, of experimental type and quantitative approach was carried out with the objective of demonstrating the hepatoprotective effect of the hydroalcoholic extract of *Cajanus cajan* leaves (Guandúl) in *Rattus norvegicus* var. *albinus* with acrylamide induced hepatotoxicity. It consisted of a negative group, a positive control group and two experimental groups (I and II). The negative group was provided with food and water ad. libitum, the positive control group was induced to hepatotoxicity with acrylamide (50 mg /kg bw intraperitoneally, single dose) to experimental groups I and II were administered hydroalcoholic extract of *Cajanus cajan* in a dose of 300 mg / Kg pc and 600 mg / kg bw by orogastric tube for 7 days, administering 50mg / kg bw acrylamide on the fifth day, serum levels of glutamic transaminase oxaloacetate (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT) and alkaline phosphatase were evaluated in the fifth and eighth day of treatments. The results for GOT and initial and final GPT were: Negative control group 16.5±2.1 IU/L and 14.2±2.28 IU/L, 12.4±2.3 IU/L and 13.9±2.0 IU/L Positive control group 121.2±4.1 IU/L and 137.5±4.5 IU/L, 108.2±3.4 IU/L and 136.8±4.1UI /L Experimental I 115.0±3.4 IU/L and 73.1±14.3 IU/L, 106.7±1.9 IU/L and 64.2±2.8 IU/L Experimental II 102.4±6.8 IU/L and 57.2±8.1 IU/L, 78.7±2.1UI / L and 40.7±1.8 IU/L and for Alkaline Phosphatase: Negative control group 19.2±3.4 UI /L and 15.7±3.3 IU/L , Positive control group 92.1±3.0 IU/L and 104.2±14.6 IU/L, Experimental I 70.8 ±4.6 IU/L and 32.1±4.3UI/L, Experimental II 59.9±4.6 IU/L and 24.8±4.7UI/L. When comparing the transaminase values by means of the ANOVA test, a significant difference was obtained between groups (p<0.003), and for alkaline phosphatase (p<0.001). It is concluded that the extract of *Cajanus cajan* has a hepatoprotective effect in *Rattus norvegicus* var. *albinus* with acrylamide-induced hepatotoxicity.

Key Words: Acrylamide, *Cajanus cajan*, hepatoprotective.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	iii
DEDICATORIA	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
CONTENIDO	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	7
2.1 Antecedentes	7
2.2 Bases teóricas	10
III. HIPÓTESIS	23
IV. METODOLOGÍA	24
4.1 Diseño de la Investigación	24
4.2 Población y Muestra.....	26
4.3 Definición y operacionalización de variables e indicadores.....	28
4.4 Técnicas e Instrumentos de Recolección de datos	29
4.5 Plan de Análisis	33
4.6 Matriz de consistencia.....	34
4.7 Principios Éticos	35
V. RESULTADOS	36
5.1 Resultados	36
5.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS	38
VI. CONCLUSIONES	43
ASPECTOS COMPLEMENTARIOS	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto hepatoprotector del extracto Hidroalcohólico de hojas de *Cajanus cajan* en dosis de 300mg/kg y 600mg/kg en *Rattus norvegicus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida por acrilamida sobre los niveles de Transaminasa Glutámico oxalacetato (GOT) y Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) basal y final.....36

Tabla 2: Efecto hepatoprotector del extracto Hidroalcohólico de hojas de *Cajanus cajan* en dosis de 300mg/kg y 600mg/kg en *Rattus norvegicus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida por acrilamida sobre los niveles séricos de fosfatasa alcalina basal y final.....37

I. INTRODUCCIÓN

Según la OMS, los productos herbarios y todos los relacionados, son aquellos que contienen como principios activos partes de plantas u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos elementos, y su uso está bien establecido y ampliamente reconocido como inocuo y eficaz. En la actualidad existe gran interés por la medicina tradicional y, dentro de esta, la medicina herbaria, que ha generado numerosos estudios, divulgados en prestigiosas publicaciones ⁽¹⁾.

Los antioxidantes son compuestos importantes nutraceuticos por los beneficios que brindan a la salud humana, cumplen la función primordial de proteger el organismo humano contra la acción de los Radicales Libres. Llamamos más la atención los antioxidantes de los alimentos de origen vegetal, Vitaminas A, C y E, y los compuestos fenólicos tipo flavonoides, porque además de su papel antioxidante, también pueden desarrollar actividades antiviral y antimicrobiana, quelar hierro, inhibir enzimas, principalmente metaloproteinasas, regular la expresión génica y mejorar significativamente la función endotelial ⁽²⁾.

La acrilamida (C_3H_5NO), es un polvo cristalino, de color blanco. Actualmente, muchos estudios están preparados para encontrar compuestos defensivos contra los daños de la acrilamida. La hepatopatía relacionada con el consumo de acrilamida se debe a los efectos genotóxicos en el hepatocito, probablemente a través de daño oxidativo del ADN inducido por especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular y el agotamiento de Glutathion peroxidasa. La enzima CYP2E1 tiene especial interés para el desarrollo de la hepatopatía, es especialmente activa en la producción de especies reactivas de Oxígeno (ERO), ya que es una proteína desacoplada que genera ERO, incluso en

ausencia de sustrato añadido. La acrilamida es metabolizada por el CYP2E1 y su actividad aumenta después del consumo de esta sustancia ⁽³⁾.

Las pruebas de función hepática que se emplean para el diagnóstico, seguimiento, y pronóstico en pacientes con enfermedad hepática son denominados marcadores de función hepática, que incluye varios parámetros bioquímicos como son: Las aspartato aminotransferasas (AST), alanina aminotransferasas (ALT), gamma glutamiltranspeptidasa (γ-GTP), fosfatasa alcalina (FA), bilirrubina, albúmina y actividad de protrombina entre otros. Solo las tres últimas miden la capacidad funcional del hígado, siendo los demás potenciales indicadores de daño hepático ⁽⁴⁾.

El hígado es el órgano más importante y vital del cuerpo humano, presentando multiplicidad funcional metabólica, digestiva, hemostática, inmunológica y de reserva, con flujo de alrededor de 1500 ml de sangre por minuto. Cada uno de los dos lóbulos principales contiene unidades más pequeñas llamadas lobulillos, desempeña un papel esencial para la mayoría de las funciones metabólicas del organismo y efectúa más de 500 tareas, entre sus funciones está la de filtrar sangre, metabolizar los carbohidratos, proteínas, hormonas, bilis, vitaminas y almacenar hierro, producir factores de coagulación ⁽⁵⁾.

El hígado es un órgano que se ve afectado por numerosos procesos inflamatorios como infecciones víricas, toxicidad por fármacos y sus metabolitos, procesos autoinmunes y distintos defectos genéticos ⁽⁵⁾.

A nivel mundial las enfermedades hepáticas crónicas (EHC) constituyen una gran carga epidemiológica con repercusiones personales, sociales y económicas, debido al impacto negativo en la calidad de vida de quienes lo padecen ⁽⁶⁾.

El metabolismo de los fármacos en el hígado se produce fundamentalmente en dos fases. Las reacciones de fase I que consisten en reacciones de oxidación y reducción que modifican o crean nuevos grupos funcionales, así como reacciones de hidrólisis que rompen los enlaces ésteres y amidas, liberando también nuevos grupos funcionales⁽⁵⁾.

Las reacciones de fase II son reacciones de conjugación en las que el fármaco o un metabolito derivado del mismo se acoplan con substratos endógenos como el ácido glucurónico, acético, sulfúrico o glutatión (GSH), generando metabolitos más solubles en medios hídricos facilitando de esta forma su excreción. El resultado de éste proceso es la generación intracelular de radicales libres o compuestos electrofílicos que deplecionan el glutatión de las células, se unen covalentemente a proteínas, lípidos, ácidos nucleicos o inducen peroxidación lipídica⁽⁵⁾.

Las enfermedades hepáticas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Alrededor de 1.3 millones de muertes en todo el mundo se deben a la hepatitis viral crónica. Muchos investigadores dirigidos por clínicas han descubierto que la mortalidad relacionada con el hígado es tan alta como la cuarta en algunos grupos de edad y la octava en general. Según las estimaciones de la OMS, aproximadamente 1.4 millones de casos de hepatitis A ocurren anualmente y 2 mil millones de personas en todo el mundo están infectadas con el virus de la hepatitis B. Alrededor de 350 millones viven con una infección crónica y

600,000 personas mueren cada año debido a las consecuencias agudas o crónicas de la hepatitis B. Alrededor de 130–170 millones de personas están infectadas crónicamente con el virus de la hepatitis C, y más de 350,000 personas mueren de hígado relacionado con la hepatitis C enfermedades cada año⁽⁴⁾.

Las hepatopatías pueden ser causadas por distintos agentes: Fármacos, tóxicos, virus, dando similar sintomatología. Las enfermedades hepáticas en el Perú constituye una importante causa de morbilidad y mortalidad, siendo la Hepatitis Viral de alta endemicidad en muchas regiones del país y la cirrosis hepática la causa más frecuente de presentación crónica asociada a mortalidad, la cirrosis hepática ocupa el 5° lugar, en orden de magnitud entre las defunciones generales, el 2° lugar entre las enfermedades digestivas y hepatobiliares y es la 2° causa de muerte entre las defunciones registradas⁽⁵⁾.

Guandúl [*Cajanus cajan (L.) Millsp.*] Es un miembro perenne que pertenece a las leguminosas. Otros nombres comunes son gramo rojo, guisante del Congo, guisante de Gungo, guisante de Gunga y guisante sin ojos. Los extractos o componentes de guandú se utilizan comúnmente para el tratar la diabetes, la disentería, la hepatitis y el sarampión, como una febrífuga para estabilizar el período menstrual Como terapia clásica china, las hojas de guandúl se han utilizado ampliamente para detener la sangre, aliviar el dolor y matar gusanos. Hoy en día, las hojas de gandul se utilizan para curar heridas, aftas, escaras y malaria, así como la hipercolesterolemia inducida por la dieta, etc⁽²⁾.

Los efectos protectores de los extractos de la hoja de Guandúl contra el daño cerebral hipóxico-isquémico y el daño del hígado producido por el alcohol también

se han informado. Las investigaciones de constituyentes químicos han indicado que las hojas de gandul son ricas en flavonoides y estilbenos, que son los responsables de la eficacia beneficiosa en la salud humana, En las hojas se encuentran los esteroides campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol; el triterpeno lupeol y el bencenoide ácido genticico ⁽²⁾.

Es importante validar a nivel preclínico in vivo, el uso tradicional de *Cajanus cajan* como un recurso hepatoprotector en un modelo experimental en ratas.

Dada la magnitud se planteó la siguiente interrogante como enunciado del problema ¿Tendrá efecto hepatoprotector el extracto hidroalcohólico de hojas de *Cajanus cajan* (Guandúl) en *Rattus norvegicus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida por acrilamida ?

Objetivo General:

- ✓ Demostrar el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de *Cajanus cajan* (Guandúl) en *Rattus norvegicus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida por acrilamida.

Objetivos Específicos:

- ✓ Demostrar el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de *Cajanus cajan* en dosis de 300mg/kg pc y 600mg/kg pc en *Rattus norvegicus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida por acrilamida a través de los niveles séricos de Transaminasa glutámico Oxalacetato (GOT) y Transaminasa glutámico pirúvica (GPT).
- ✓ Determinar el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de *Cajanus cajan* en dosis de 300mg/kg pc y 600mg/kg pc en *Rattus norvegicus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida por acrilamida a través de los niveles séricos de fosfatasa alcalina.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Antecedentes

Rizk et al, en el año 2014 en Egipto, publicaron un estudio sobre el Efecto hepatoprotector de *Caesalpinia gilliesii* y *Cajanus cajan* protein contra el daño hepático inducido por sobredosis de acetoaminophen a través de la determinación de ciertos parámetros bioquímicos que incluyen marcadores hepáticos enzimáticos: Alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina y bilirrubina total. Se observó una mejora en todos los parámetros bioquímicos estudiados como resultado del tratamiento en hígado intoxicado por paracetamol con las proteínas *C. gilliesii* y *C. cajan*. Estos resultados fueron documentados por los signos de mejora en la arquitectura hepática de la rata. Por lo tanto, ambos extractos de proteína vegetal pueden regular y contrarrestar el proceso inflamatorio, minimizar el daño al hígado, retrasar la progresión de la enfermedad y reducir sus complicaciones. ⁽⁷⁾.

Arka et al, en el año 2015, en la India, realizaron un estudio de Evaluación preliminar del potencial hepatoprotector de la formulación polihierbal, en el cual los grupos de animales se administraron con PHF a las dosis de 100, 200 y 400 mg / kg de peso corporal (por vía oral [po]) una vez al día durante 7 días y en los días 6 y 7, los animales se administraron con tetracloruro de carbono (1,0 ml). / kg de peso corporal 50% v / v con aceite de oliva, po) . Los resultados demostraron que el PHF (400 mg / kg de peso corporal) reduce significativamente el aumento inducido por CCl4 en el nivel de SGPT en suero, ALP en suero y bilirrubina total. PHF (400 mg / kg de peso corporal) previene el nivel de agotamiento de GSH y la disminución de la actividad de SOD en la lesión

hepática inducida por CCl₄ en ratas. Además, el PHF también mostró una disminución significativa en los niveles de LPO, lo que significa la potente actividad antioxidante⁽⁸⁾.

Ji et al, en el año 2016, en China, realizaron un estudio sobre Diseño y síntesis de los análogos de la cajanina contra el virus de la hepatitis C a través del huésped que regula negativamente el sulfato de condroitina N-acetilgalactosaminiltransferasa 1, en el cual La cajanina, un componente estilbénico aislado de *Cajanus cajan* L., se identificó como un potente inhibidor del VHC mediante la detección fenotípica en este trabajo (EC 50= $3.17 \pm 0.75 \mu\text{m}$). La optimización intensiva de la estructura proporcionó información significativa sobre las relaciones estructura-actividad. Además, el estudio MOA reveló que la cajanina inhibía las replications del VHC a través de la regulación negativa de una proteína celular sulfato de condroitina N-acetilgalactosaminiltransferasa ⁽⁹⁾.

Pratima et al, en el año 2016 en Estados Unidos, realizaron un estudio sobre hepatoprotective activity of seedcoat and cotyledon extract of *cajanus cajan* l. against ccl₄ induced hepatotoxicity in mice, en la cual Se administró extracto etanólico de las semillas de *Cajanus cajan* (100 y 500 mg / kg b.w) para determinar la actividad antioxidante hepatoprotectora in vivo en ratones albatinos suizos con hepatotóxicidad inducida por tetracloruro carbono. El resultado fitoquímico mostró la presencia de alcaloides, esteroides, fenoles, flavonoides, taninos, ligninas, glucósidos. El extracto tuvo un efecto protector moderado disminuyendo el nivel sérico de piruvato transaminasa sérica (SGPT), suero oxaloacetato transaminasa (SGOT), Fosfatasa alcalina (ALP), bilirrubina y aumentando el nivel de proteína ⁽¹⁰⁾.

Se observó a una concentración más alta (500 mg / kg) de extracto de semilla y la reducción del nivel sérico SGPT, SGOT y la ALP es comparable con el fármaco hepatoprotector estándar Liv-52 (100 mg / kg de peso corporal) que sirvió como control positivo. La administración de extractos etanólicos al desafío d CCl₄ restauró el estado antioxidante hepático. Estos hallazgos sugirieron que la cubierta de la semilla y el extracto de cotiledón de *C. cajan* protegen las enfermedades crónicas inducidas por CCl₄ en hepatotoxicidad en ratones mediante la restauración del estado antioxidante del hígado⁽¹⁰⁾.

Según Ahsan et al, en el año 2009 en Bangladesh, publicaron un estudio sobre Hepatoprotective Activity of Methanol Extract of Some Medicinal Plants Against Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Albino Rats, en la cual estudiaron los extractos de metanol de *C. cajan* para determinar la actividad hepatoprotectora contra ratones suizos albinos con daño hepático inducido por tetracloruro de carbono (CCl₄). Se encontró que el mismo extracto exhibía un efecto protector moderado al disminuir los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT) o glutamato piruvato transaminasa sérica (SGPT), aspartato aminotransferase (AST) o glutamato piruvato transaminasa sérica (SGOT), aspartato aminotransferase (AST) o glutamato oxaloacetato transaminasa (SGOT) y colesterol medida significativa. La fracción metanol-acuosa (MAF2) del extracto de la hoja también se usó para prevenir el daño hepático inducido por el alcohol en ratas. La administración conjunta de MAF2 revirtió el daño hepático; redujo las actividades de las enzimas marcadoras de hígado y las actividades enzimáticas antioxidantes aumentadas y mostró una promesa de uso terapéutico en la disfunción hepática inducida por el alcohol.⁽¹¹⁾.

2.2 Bases teóricas

Plantas Medicinales:

El término incluye una variedad de plantas utilizadas en herbalismo y muchas de estas plantas tienen una actividad medicinal. Estas plantas medicinales consideran como un rico recurso de ingredientes que son usados para la producción de fármacos. Además de que estas plantas desempeñan una función importante en el avance de las culturas humanas a nivel mundial ⁽¹⁾.

Droga vegetal

Son aquellas partes de una planta que posee una gran o menor cantidad de principios activos que se extraen de las hojas, tallos, frutos, raíces, flores, semillas. Las hojas poseen heterosidos y alcaloides, el tallo es una vía entre las raíz y las hojas sin embargo pueden llegar a tener principios activos en la corteza. Las raíces extraen agua y sales minerales del suelo y lo bombea hacia las hojas, puede acumular a menudo azúcares otras veces vitaminas y alcaloides, la flor puede poseer gran cantidad pigmentos^(12,13).

Extracto hidroalcohólico

Es una mezcla de diversos compuestos químicos que suelen ser físicos o químicos, se extraen a partir de las plantas medicinales que son usados en la medicina popular. Posee un olor característico, el cual es adquirido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico⁽¹³⁾.

***Cajanus cajan* (Guandul)**

El guandul (*Cajanus cajan*), conocido según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación como Guandú, frijol de palo, guisante de paloma, Guandul

(Pigeon pea, red gram, dahl) o quinchoncho, es una leguminosa muy nutritiva, cultivada en países de Asia, África, Islas del Caribe y Sur América ⁽¹⁶⁾.

Esta planta es un arbusto de crecimiento determinado y/o indeterminado, de ciclo perenne, posee hojas alternadas trifolioladas distribuidas en forma espiral a lo largo del tallo, miden generalmente de 1 a 4 m de altura, poseen un follaje verde amarillento a verde púrpura, fuera del periodo de producción son árboles leñosos y crece sobre un amplio rango de suelos bien agotados de playa a arcillas y materiales metamórficos y en zonas húmedas con buen drenaje, en el Perú puede cultivarse hasta los 2500 metros sobre el nivel del mar de altitud ⁽¹⁴⁾.

Origen y Distribución

El *C. cajan* ha sido utilizado por más de cuatro mil años en la India de donde se difundió al oeste de África. En las Indias Orientales se encuentra el *Atylosia cajanifolia* Haines, sinónimo de *C. cajanifolium* (Haines) Maesen, el pariente más cercano; otras variedades del género *Atylosia* en Australia. El *C. kerstingii*, se encuentra en las zonas áridas y semiáridas de África ⁽¹⁵⁾.

Clasificación taxonómica ⁽²⁾

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Sub familia: Faboideae

Tribu: Phaseoleae

Género: *Cajanus*

Especie: Cajanus L

Nombre vulgar: Frejol de palo, Guandul

Nombre científico: Cjanaus cajan L.

Composición del Cajanus cajan

Las investigaciones de los constituyentes químicos han indicado que las hojas de *C. cajan* son ricas en flavonoides y estilbenos. También contienen saponinas, cantidad conspicua de taninos y cantidades moderadas de azúcares reductores, resinas y terpenoides. Los estudios químicos revelan 2'-2 'metil cajanona, 2'- hidroxí genisteína, isoflavonas, cajanina, cahanones, etc., que imparten propiedades antioxidantes , se ha aislado una nueva cumarina cajanuslactona natural de las hojas de *C. cajan*, que es un agente antibacteriano potencial contra microorganismos Gram-positivos⁽²⁾.

Las actividades anti-plasmodiales también se han confirmado en ácido betulínico aislado de raíces y longistylin A y C obtenidos de las hojas. La pinostrobinina, una flavanona sustituida aislada de las hojas posee actividad antiinflamatoria e inhibe la despolarización activada por canal de sodio de los sinaptoneurosomas cerebrales de ratón. Dos isoflavonoides genistein y genistin aislados de las raíces demostraron que poseen actividad antioxidante⁽²⁾.

Se encontraron cuatro compuestos importantes, la pinostrobinina, el ácido cajaninstilbeno, la vitexina y la orientina, aislados de extractos etanólicos de hojas, poseen propiedades antioxidantes significativas. Los isoflavonoides aislados de extracto etanólico de hojas también mostraron actividades

antimicrobianas significativas. Algunas fracciones de proteínas aisladas de las hojas mostraron efectos hepatoprotectores⁽²⁾.

Composición de las hojas de *Cajanus cajan*.

Los polifenoles, especialmente los flavonoides son el compuesto principal para el efecto terapéutico en la salud humana. Son 4 los flavonoides que se encuentran en el extracto de hojas de *Cajanus cajan* : Luteolina, apigenina, quercetina e isorhamnetina, las cuales han mostrado buenas propiedades farmacológicas. En otros estudios, se ha visto que las hojas de guisante tienen ácido cajaninstilbeno y pinostrobinina y estos pertenecen al grupo de estilbenes y flavononas respectivamente. También se ha encontrado que tienen buenas actividades farmacológicas el ácido cajaninstilbeno que es el ácido estilbeno-2-carboxílico, que se encuentra en plantas en muy poca cantidad ⁽¹⁶⁾.

Propiedades antioxidantes. Una nueva cumarina, llamada cajanuslactona (7-hidroxi-5-O-metil-8- (3-metil-2-butileno)-4-fenil-9,10-dihidro-benzopirano-2-ona) fue Aislado de las hojas de *Cajanus cajan*. Gracias a la Pinostrobinina que es un potente flavonoide tiene acción antioxidante. Los flavonoides y los estilbenos son antioxidantes naturales, además contiene vitexina y orientina, hordenine, juliflorina, ácido betulínico, estigmasterol, beta-sitosterol, Carlinoside es un compuesto único conocido por su excelente potencial curativo en la hepatitis ^(16, 17).

Composición de aminoácidos del guandul⁽¹⁸⁾

AMINOÁCIDOS DEL GUANDUL (mg. De aminoácido)	
Histidina	3.276
Isoleucina	5.748
Leusina	10.071
Lisina	8.451
Metionina	1.169
Fenilalanina	7.066
Treonina	6.158
Triptófano	1.035
Valina	6.251
Aminoácido limitante: Metionina	

Fuente: Albornos M, Romero J.Utilización de la harina del Guandúl.

Flavonoides:

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos, se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo ⁽¹⁹⁾.

Contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros 15 metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías,

incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer presentan otras propiedades que incluyen la estimulación de las comunicaciones a través de las uniones en hendidura, el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación tales como las monooxigenasas dependientes de citocromo P-450, entre otras⁽²⁾.

La **quercitina** es un flavonoide amarillo-verdoso. En el hígado se ha descrito que la quercitina es capaz de inhibir la activación de las células estrelladas así como la producción de óxido nítrico, alterando vías de expresión de proteínas celulares y en estudios in vitro se ha comprobado que diversos flavonoides inhiben la expresión de la óxido nítrico sintetasa y la formación de óxido nítrico en macrófagos estimulados por LPS. En ratas con obstrucción biliar en las que se produce estrés oxidativo y una reducción de las defensas antioxidantes, se ha demostrado que el tratamiento con quercitina previene la peroxidación lipídica, atenúa los depósitos de colágeno y el proceso de fibrogénesis hepática, incluso cuando el tratamiento se inicia con la fibrosis claramente establecida⁽¹⁹⁾.

Usos Medicinales:

Se consume para prevenir la disentería, enfermedades renales, inflamación y trastornos sanguíneos⁽¹⁵⁾.

HÍGADO:

Situación:

Es una glándula, con un aspecto liso y de color rojizo oscuro. Su peso aproximado en un adulto es de 1,5 kg, es un órgano voluminoso, situada en la fracción derecha superior de la cavidad abdominal, está compuesto por una sustancia friable, con una capa peritoneal lisa, y está suspendido sobre el diafragma por ligamentos suspensorios que son las reflexiones peritoneales (Ver Anexo 17) ⁽²⁰⁾.

Hepatotoxicidad

Es el resultado de la lesión del hígado como resultado del consumo de xenobióticos, especialmente los agentes medicinales. Los daños hepáticos producidos por fármacos u otras sustancias extrañas es producto de los metabolitos reactivos formados durante su biotransformación y que no han podido ser inactivados ⁽²¹⁾.

Mecanismo de daño hepático

Debido a su metabolismo peculiar y a su cercana relación con el tracto gastrointestinal, el hígado es tremendamente susceptible a las injurias tóxicas. Cerca de un 75% de la sangre que llega al hígado viene directamente de los órganos gastrointestinales y el bazo por medio de la vena porta, el cual trae drogas y xenobióticos de forma concentrada. Son varios los mecanismos responsables bien sea de la inducción del daño hepático o de procesos cotidianos que influyen al daño hepático ⁽²⁰⁾.

Muchos compuestos dañan a la mitocondria, un orgánulo intracelular que produce energía. Su disfunción libera una excesiva cantidad de oxidantes que,

a su vez, causan daño a la célula hepática. La activación de algunas enzimas en el sistema citocromo P450, tales como el CYP2E1 también conllevan a estrés oxidativo. Las lesiones a los hepatocitos y a las células del conducto biliar producen acumulación de bilis dentro del hígado. Ello promueve la aparición de daño adicional hepático. Las células que no pertenecen al parénquima hepático, como las células de Kupffer, células almacenadoras de grasa o células de Ito y leucocitos pueden tener un papel en estos mecanismos tóxicos ⁽²²⁾.

Marcadores de daño hepático

Examen de fosfatasa alcalina sérica: Es empleado para medir la concentración de fosfatasa alcalina (una enzima) en la sangre. Se encuentra en diversos tejidos y con una mayor concentración en el hígado, el tracto biliar y los huesos. Se realiza para determinar una correcta actividad del hígado y descubrir daños hepáticos que pueden producir obstrucción de la bilis, tumores o abscesos ⁽²³⁾.

Aminotransferasas séricas (transaminasas): Esta enzima se libera de las células con daño hepático. La transaminación es un procedimiento reversible que se basa en el traspaso del grupo amino desde un aminoácido a un cetoácido, dando como producto la conversión del aminoácido en un cetoácido y del cetoácido en un nuevo aminoácido. Este proceso es muy importante en el metabolismo de aminoácidos y es catalizada por enzimas llamadas transaminasas o aminotransferasas, las que están presentes en la mayor parte de tejidos animales y vegetales. El cofactor de estas enzimas es el piridoxal fosfato

(PLP). Casi para todas las transaminasas el α -cetoglutarato es el aceptor del grupo amino formándose, por tanto, ácido glutámico ⁽²⁴⁾.

Las transaminasas normalmente se encuentran en el suero en concentraciones bajas. Estas enzimas se liberan a la sangre en grandes cantidades cuando hay daño de la membrana celular hepática que produce una permeabilidad incrementada. Cualquier tipo de lesión hepática puede causar las elevaciones en las transaminasas séricas. El daño hepático es la causa más importante del incremento de estas enzimas en suero. En muchas clases de enfermedades del hígado, la actividad GTP es más alta que la AST. Las actividades de ambas enzimas pueden alcanzar a valores de cien veces más alto que los límites superiores normales, aunque elevaciones de 10 a 40 veces son frecuentemente encontradas ⁽²⁴⁾.

Los valores picos de actividad de transaminasas ocurren entre los días 7mo y 12avo, luego las actividades declinan, alcanzando la normalidad entre la 3ra y 5ta semana si se recupera. Las transaminasas intervienen en el catabolismo de por lo menos 12 aminoácidos. Actualmente se conoce muchas transaminasas, un ejemplo destacado lo cumple la transaminasa de los tejidos animales denominado aspartato transaminasa (AST o GOT) y la alaninatransaminasa (ALT o GPT) ⁽²⁴⁾.

Transaminasas hepáticas séricas

Las principales son:

Transaminasa Glutámico Oxalacetato (GOT)/AST

Este examen mide el nivel de aspartato transaminasa (una enzima que se encuentra en el hígado, riñones, páncreas, corazón, sistema músculo esquelético y glóbulos rojos) que se libera al torrente sanguíneo cuando existen problemas en el hígado o el corazón ⁽²³⁾.

Están aumentadas en suero en infarto agudo de miocardio, hepatopatía aguda, miopatias, por la administración de algunos medicamentos y en cualquier enfermedad o daño donde las células resulten dañadas. Valores muy altos de AST (>500 UI/L) son sugerentes de hepatitis u otra clase de necrosis hepatocelular, pero también tumores necróticos grandes, necrosis o hipoxia, falla congestivo y shock⁽²⁴⁾.

El tiempo de la vida media de Transaminasa Glutámico Oxalacetato (GOT) en sangre es de 17 horas, presenta un peso molecular de 100 000, y se ha demostrado que cada molécula de enzima contiene 2 moléculas de fosfato piridoxal como grupo prostéticos. Cada enzima tiene una especificidad tisular definida. Existen tejidos en el organismo con concentraciones de enzimas más elevadas que otro. La transaminasa glutámico oxalacetato, se encuentra distribuido ampliamente en el organismo, es producido dentro de las células del hígado, corazón, músculo esquelético, riñón y otros tejidos. Incluso con una distribución tan amplia, la Transaminasa Glutámico oxalacetato (GOT) puede suministrar una información diagnóstica valorable se estudian los parámetros

adecuados ⁽²⁵⁾. Los valores de Transaminasa Glutámico Oxalacetato (GOT) sérico se encuentran elevadas sobre sus valores normales cuando hay procesos anormales en el cuerpo animal, como enfermedades hepáticas (hepatopatías, hepatitis, cirrosis), pacientes con lesiones cardiacas (infarto miocárdico), necrosis muscular, enfermedad muscular blanca e inanición. Así mismo, se encuentran elevadas en estados de inflamación y necrosis del hígado, pancreatitis aguda, anemia hemolítica e infección renal ⁽²⁴⁾.

Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT)/ALT:

Este examen mide el nivel de alaninaaminotransferasa (una enzima hallada predominantemente en el hígado) que se libera al torrente sanguíneo como consecuencia de un daño celular agudo del hígado, puede realizarse para evaluar la función del hígado y, o para evaluar el tratamiento de una enfermedad aguda del hígado, como la hepatitis. Es una enzima citoplásmica hepatocelular, con gran concentración en tejido hepático y en menor concentración en los riñones, páncreas, corazón, músculo esquelético y eritrocitos (en orden decreciente), por eso un aumento sérico de ALT/GOT es más específico de daño hepático que la AST/GPT. La enzima es exclusivamente citosólica. Cuando hay un daño en estos órganos la Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) es liberada a la sangre y resulta aumentado en los análisis ^(23, 24).

El daño hepático agudo tiende a producir grandes elevaciones de actividad ALT, y en el daño crónico la ALT puede estar normal o moderadamente incrementada. El grado de incremento de la ALT correlaciona con la cantidad

de hepatocitos dañados y se utiliza para evaluar la extensión del daño hepático. La ALT posee una sensibilidad de 83% y una especificidad de 84% en relación a enfermedades no hepáticas y 97.8% en relación a sujetos saludables. El aumento de ALT se produjo en el 81% de 520 pacientes con enfermedades hepáticas muy diversas ⁽²⁴⁾.

La elevación de ALT es el indicador más sensible del daño hepatocelular, de modo que una subida de ALT es, como regla, de origen hepatocelular. Los concentraciones de ALT están aumentados en:

- 1) Lesión hepatocelular ⁽²⁴⁾.
- 2) Ictericia extrahepática, producto de obstrucción biliar ⁽²⁴⁾.
- 3) Carcinoma hepático primario o secundario ⁽²⁴⁾.
- 4) Cirrosis biliar primaria⁽²⁴⁾.
- 5) Hepatitis alcohólica ⁽²⁴⁾.
- 6) Cirrosis alcohólica ⁽²⁴⁾.

Acrilamida

La acrilamida o 2-propenamida es un sólido cristalino incoloro, inodoro y altamente soluble en agua. Este químico ha sido producido comercialmente desde 1954 y se obtiene mediante la hidratación catalítica del acetonitrilo, sus principales usos son industriales, como floculante en la clarificación de agua, elaboración de pegamentos, estabilizante de suelo, etc. Es una amida insaturada muy reactiva, ya que contiene un doble enlace activado, y es usado alrededor del mundo para sintetizar poliacrilamida. La acrilamida es estable a temperatura ambiente pero polimeriza en la fusión o

expuesta a radiación ultravioleta. Posee un punto de fusión de 84.5°C y un punto de ebullición de 136°C ⁽²⁵⁾.

Aspectos toxicológicos de la acrilamida

Estudios in vitro con células de mamífero en cultivo, e in vivo con ratas y ratones, han demostrado que la administración prolongada de acrilamida daña el material genético de las células y en ratas induce tumores. Debido a que no es posible determinar un nivel de exposición, se debe asumir que, niveles de exposición aunque sean muy bajos, producen riesgos para la salud. En conjunto, y considerando toda la información relevante disponible, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha catalogado a la acrilamida como “probable carcinogénico para los humanos” (clase 2A). Se dispone de información que demuestra que la acrilamida produce lesiones del sistema nervioso en los humanos, en forma generalmente, de neuropatía periférica ⁽²⁶⁾.

Los estudios suecos indicaban que la ingesta podría ser de hasta 100 microgramos por día, lo que equivale aproximadamente a 1.7 microgramos por Kg. de peso corporal/ día, más de mil veces menor que las dosis que causaban efectos sobre el sistema nerviosos o reproductor en los estudios con animales⁽²⁶⁾.

Metabolismo de la Acrilamida:

La Acrilamida es metabolizada a epóxido de glicidamida en ratón, rata y humanos, por lo que es interesante abordar la genotoxicidad/citotoxicidad y

apoptosis causada por este agente sobre el principal órgano de metabolización de los xenobióticos, el Hígado (Ver anexo 16) ⁽²⁷⁾.

III. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis Alternativa (H1):

El extracto hidroalcohólico de hojas de *Cajanus cajan* (Guandúl) tiene efecto hepatoprotector sobre *Rattus norvegicus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida por acrilamida.

3.2 Hipótesis Nula (H0):

El extracto hidroalcohólico de hojas de *Cajanus cajan* (Guandúl) no tiene efecto hepatoprotector sobre *Rattus norvegicus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida por acrilamida.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Diseño de la Investigación:

El presente trabajo de investigación fue de tipo experimental y enfoque cuantitativo.

Los grupos de trabajo fueron divididos de la siguiente manera:

Grupo control negativo: Estuvo conformado por 6 *Rattus norvegicus var. albinus*, sólo recibió alimentación balanceada y agua ad. Libitum por 7 días, los animales de experimentación fueron sometidos a ayuno previo a la obtención de las muestra, el primer día se obtuvo la primera muestra de sangre mediante la técnica de punción cardiaca para determinar los valores iniciales de GOT, GPT y fosfatasa alcalina. Al octavo día se obtuvo la última muestra de sangre nuevamente por punción cardiaca para determinar los valores finales de transaminasas y fosfatasa alcalina de este grupo (28).

Grupo control positivo: Estuvo conformado por 6 *Rattus var. albinus*, recibió alimentación balanceada y agua ad. Libitum, al quinto día de investigación se les indujo a hepatotoxicidad con la administración de acrilamida a una dosis única de 50mg/kg pc por vía intra peritoneal, 12 horas después se obtuvo la primera muestra de sangre mediante la técnica de punción cardiaca para determinar los valores iniciales de transaminasas y fosfatasa alcalina. Al octavo día se obtuvo la última muestra de sangre nuevamente por punción cardiaca para obtener el valor final de GOT, GPT y fosfatasa alcalina de este grupo de experimentación (28).

Grupo experimental 1: Estuvo conformado por 6 *Rattus var. albinus* , recibió alimentación balanceada, agua ad. Libitum, y extracto hidroalcohólico de *Cajanus cajan*, se administró extracto hidroalcohólico de *Cajanus cajan* a una dosis de 300mg/kg pc/día por sonda orogástrica durante 7 días, al quinto día de administración del extracto se les indujo a hepatotoxicidad con la administración de acrilamida a una dosis única de 50mg/kg pc por vía intra peritoneal, 12 horas después se obtuvo la primera muestra de sangre mediante la técnica de punción cardiaca para determinar los valores iniciales de transaminasas y fosfatasa alcalina. Al octavo día se obtuvo la última muestra de sangre nuevamente por punción cardiaca para obtener el valor final de GOT, GPT y fosfatasa alcalina de este grupo de experimentación ⁽²⁸⁾.

Grupo experimental 2: Estuvo conformado por 6 *Rattus var. albinus* , recibió alimentación balanceada, agua ad. Libitum, y extracto hidroalcohólico de *Cajanus cajan*, se administró extracto hidroalcohólico de *Cajanus cajan* a una dosis de 600mg/kg pc/día por sonda orogástrica durante 7 días, al quinto día de administración del extracto se les indujo a hepatotoxicidad con la administración de acrilamida a una dosis única de 50mg/kg pc por vía intra peritoneal, 12 horas después se obtuvo la primera muestra de sangre mediante la técnica de punción cardiaca para determinar los valores iniciales de transaminasas y fosfatasa alcalina. Al octavo día se obtuvo la última muestra de sangre nuevamente por punción cardiaca para obtener el valor final de GOT, GPT y fosfatasa alcalina de este grupo de experimentación ⁽²⁸⁾.

Los 24 especímenes fueron anestesiados con 0.1 ml de ketamina+xilazina por vía intramuscular, después de 3-5 minutos se logró el efecto y se procedió a extraer 2ml de sangre mediante la técnica de punción cardiaca empleando una jeringa de 3 ml,

después que se obtuvo la sangre se pasó a un tubo de ensayo para ser centrifugado a 800 rpm y de esta manera se obtuvo el suero para los respectivos análisis de GOT, GPT y fosfatasa alcalina. Los especímenes fueron sacrificados con halatal a una dosis de 50mg/kg pc⁽²⁸⁾. (Ver Anexo 10)

4.2 Población y Muestra:

Población Vegetal:

Estuvo conformada por la especie vegetal *Cajanus cajan* originaria del distrito de San José de Sisa, provincia El Dorado, departamento de San Martín, ubicado a 600 msnm. (Anexo 01)

Muestra Vegetal:

Se recolectó 3 kg de hojas frescas de *Cajanus cajan* en el distrito de San José de Sisa, provincia El Dorado, departamento de San Martín, en el mes de Agosto 2017 bajo criterios de inclusión y exclusión. (Anexo 02)

La especie vegetal *Cajanus cajan* fue certificada taxonómicamente por el HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo y se encuentra depositada bajo el siguiente código: **59261** (Anexo 03)

Criterios de inclusión:

- ✓ Hojas de *Cajanus cajan* frescas
- ✓ Hojas sanas de *Cajanus cajan*
- ✓ Hojas de *Cajanus cajan* limpias sin contaminantes.

Criterios de exclusión:

- ✓ Hojas de *Cajanus cajan* marchitadas
- ✓ Flores de *Cajanus cajan*
- ✓ Frutos de *Cajanus cajan*

Población biológica

Los animales de experimentación fueron ratas albinas hembras de la cepa albina Sprague Dawley, con peso promedio de 170 a 280g, fueron adquiridas del bioterio de la universidad Cayetano Heredia de la ciudad de Lima (Anexo 4).

Muestra biológica

Estuvo conformado por 24 *Rattus var. albinus* que fueron distribuidas de manera aleatoria en 4 grupos de 6 especímenes cada uno (Grupo control positivo, control negativo, experimental I y experimental II). Los especímenes fueron alojados en jaulas de crianza por grupo para su aclimatación por una semana previa al experimento, con libre acceso a agua ad. libitum y alimento balanceado, con ciclos alternados de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (Ver Anexo 05). Fueron seleccionados bajo criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de Inclusión:

- ✓ *Rattus var. albinus* hembras
- ✓ *Rattus* con peso promedio de 170 a 280 g
- ✓ *Rattus* sanas

Criterios de exclusión:

- ✓ *Rattus albinus* machos
- ✓ *Rattus* con peso menores de 170g, *Rattus* preñadas.

4.3. Definición y operacionalización de las variables:

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
Independiente: Extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Cajanus cajan</i> (Guandul).	Se trata de un extracto que contiene alcohol, cuya función es obtener metabolitos de la planta para obtener un efecto.	Se utilizó 2 dosis del extracto.	<p>Grupo Control negativo: Agua y comida.</p> <p>Grupo control positivo: Acrilamida 50 mg/kg Ip dosis única.</p> <p>Grupo Exp. I: Acrilamida 50 mg/kg Ip dosis única + 300mg/kg pc de extracto hidroalcohólico de <i>Cajanus cajan</i>.</p> <p>Grupo Exp. II: Acrilamida 50 mg/kg Ip dosis única + 600mg/kg pc de extracto hidroalcohólico de <i>Cajanus cajan</i>.</p>	Variable cualitativa Nominal
Dependiente: Efecto hepatoprotector en <i>Rattus novegicus var. albinus</i> .	El efecto hepatoprotector está definido como la regeneración de células hepáticas mediante la estimulación de la función natural del hígado de reemplazar células dañadas.	Se determinó mediante la disminución de los niveles séricos de Transaminasa Glutámico oxalacetato (GOT), Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) y Fosfatasa alcalina.	Cuantificación de Transaminasa Glutámico Oxalacetato (GOT) en UI/L, Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) en UI/L y Fosfatasa Alcalina en UI/L Obtenidas a partir de absorbancias de la muestra.	Variable Cuantitativa de razón

4.4 Técnicas e Instrumentos de Recolección de datos:

4.4.1 Técnicas

Técnica: Recolección e identificación de *Cajanus cajan*

Se recolectó 3 Kg d hojas frescas de *Cajanus cajan*, mediante el método clásico de herborización, seleccionando las hojas frescas y en buenas condiciones, éstas fueron lavadas con agua corriente, luego se procedió a lavar con agua destilada, además se seleccionó 2 ramas de la planta conteniendo hojas, flores y frutos para la identificación taxonómica en el HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo con código de identificación **59261**.

Posteriormente las hojas lavadas fueron secadas bajo sombra a temperatura ambiente sobre papel kraft hasta sequedad por 7 días; obteniéndose 1000g de hojas secas, éstas hojas fueron pulverizadas utilizando un molino manual de acero inoxidable marca Corona, modelo 121-02, luego se tamizó con tamíz de partículas mayores a 150 micras obteniendo un tamaño de partícula de 0,05 nm, se obtuvo 350 g de polvo fino.

Técnica: Preparación del extracto hidroalcohólico de *Cajanus cajan*

Para preparar el extracto hidroalcohólico de *Cajanus cajan* se pesó 350 g de polvo fino tamizado y se diluyó con alcohol al 50% (547 ml de etanol 96° y 503 ml de agua destilada) en proporción 1:3 p/v, la solución fue macerada en un frasco ámbar por 7 días (Ver anexo 06, 07 y 08)

Transcurrido el tiempo de maceración se filtró al vacío con papel de filtro Whatman N° 1. Obteniendo 750 ml de extracto, al líquido filtrado se le denominó extracto hidroalcohólico.

A continuación, el extracto hidroalcohólico se concentró en un rotavapor (Heidolph WB 2000) a presión reducida y temperatura controlada, no mayor a 40° C. finalmente el extracto se colocó en capsulas de porcelana y se llevó a secar a la estufa a 35°C, se obtuvo un extracto seco equivalente a 6.6 g con un porcentaje de rendimiento de la técnica utilizada de 1.88 % p/p. A partir de este extracto seco se prepararon las dosis de 300 mg/kg pc y 600 mg/kg pc (Ver anexo 09) ⁽²⁹⁾.

Pesos y marcación de las *Rattus novergicus var albinus*

Para realizar este trabajo de investigación se empleó 24 *Rattus var. albinus* hembras, para una adecuada agrupación se pesó los especímenes y se marcó en la cola con plumón indeleble por número y se procedió a anotar en un cuaderno de apuntes el número del espécimen con su respectivo peso con la finalidad de tener un buen control al momento de calcular y administrar la dosis del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cajanus cajan* (ver Anexo 11)

Dosificación del extracto hidroalcohólico de *Cajanus cajan*

Los especímenes fueron distribuidos en cuatro grupos donde al grupo experimental I se administró 300mg/kg/pc. de extracto hidroalcohólico de hojas de *Cajanus cajan* y al grupo experimental II la dosis fue de 600mg/kg/pc del extracto hidroalcohólico.

Sondeado de *Rattus var. albinus*.

Se preparó sondas nasogástricas N°18, se adaptó al esófago del animal y se administró a los grupos Experimental 1 y 2, el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cajanus cajan* en dosis de 300 y 600 mg/kg pc respectivamente (Ver Anexo 13)

Inducción de hepatotoxicidad por Acrilamida

Se diluyó 5g de acrilamida en 1 Litro de agua bidestilada, se colocó en un frasco ambar y se agitó con una varilla de vidrio para su posterior uso según Kg de peso del espécimen. Todo el procedimiento se realizó en la cámara de flujo laminar proporcionada por la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo ⁽³⁾.

La dosis para la administración de la acrilamida fue de 50 mg/kg Pc. vía Intraperitoneal en dosis única para el grupo negativo, experimental 1 y experimental 2 (Ver anexo 15).

Punción cardiaca

Técnica utilizada para extracción de la sangre del corazón de las ratas, fueron anestesiadas con 0.1 ml de ketamina+xilazina por vía intramuscular, después de 3-5 minutos se logró el efecto y se procedió a extraer 2 ml de sangre empleando una jeringa de 3 ml, y aguja N° 25 después que se obtuvo la sangre se pasó a un tubo de ensayo para ser centrifugado a 800 rpm por 10 minutos y de esta manera se obtuvo el suero para los respectivos análisis de Transaminasa Glutámico Oxalacética (GOT), Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) y fosfatasa alcalina sérica. (Ver Anexo 12)

DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Transaminasas Transaminasa Glutámico Oxalacetato (GOT) y Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) séricas:

Se utilizó como muestra biológica el suero obtenido por punción cardiaca, que fueron extraídos y extravasados a un tubo de centrifugación para evitar la hemólisis. El

método utilizado fue el colorimétrico descrito para la determinación de Transaminasas 200 (Wiener Lab) (Ver Anexo 14)⁽³⁰⁾.

PROCEDIMIENTO		
En dos tubos de ensayo rotulados con B (blanco) y D (desconocido); colocar:		
	B	D
REACTIVO A (GOT O GPT)	0,5ml.	0,5ml.
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.	0,5ml
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 (500-550nm.); en espectrofotómetro a 505nm o Hg 546, llevando el aparato a cero D.O.con agua destilada.		

Fuente : Wiener Lab

Las lecturas de absorbancias se realizaron en un espectrofotómetro marca UNICO UV-2100.

Determinación de la actividad Fosfatasa Alcalina

Se llevó el reactivo a una temperatura de 37°C⁽³¹⁾.

Preparación del Reactivo de Trabajo: Mezclar 10 ml. de Reactivo 1 con 2 ml. de Reactivo 2. Para la determinación de los valores de fosfatasa alcalina se utilizó el método cinético optimizado según Valtek® (Ver Anexo 15)⁽³¹⁾.

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 405nm. Repetir la lectura a los 60 segundos, exactos.		

Fuente : Valtek®

4.4.2 Instrumentos utilizados:

Balanza, tubos de ensayo, probetas, sondas N° 18, jeringas 3 ml, agujas N° 25, espectrofotómetro, papel filtro, embudo, fuentes, jaulas, bebederas, tubos dragendor, franco ambar.

4.4.3 Recolección de datos:

En la investigación se utilizó un cuaderno de campo para registrar el peso de los animales de experimentación.

4.5 Plan de Análisis:

Los datos fueron tabulados en un software Microsoft Excel versión 2013, para su procesamiento se utilizó un paquete estadístico IBM SPSS V. 20.0, para determinar la normalidad de los grupos de estudio los resultados fueron sometidas a la prueba de CHAPIRO – WILKS; para la comparación entre los grupos control positivo, control negativo, experimental 1 y experimental 2 antes y después se utilizó la prueba de TUKEY y la prueba de ANOVA para encontrar la significancia de los grupos de estudio. (Ver anexo 18, 19 y 20).

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>Cajanus cajan</i> (Guandúl) en <i>Rattus norvegicus var. albinus</i> con hepatotoxicidad inducida por acrilamida.	¿Tendrá efecto hepatoprotector el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Cajanus cajan</i> (Guandúl) en <i>Rattus norvegicus var. albinus</i> con hepatotoxicidad inducida por acrilamida ?	<p>Objetivo General: Demostrar el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Cajanus cajan</i> (Guandúl) en <i>Rattus norvegicus var. albinus</i> con hepatotoxicidad inducida por acrilamida.</p> <p>Objetivos Específicos: Demostrar el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Cajanus cajan</i> en dosis de 300mg/kg pc y 600mg/kg pc sobre los niveles séricos de Transaminasa Glutámico Oxalacetato (GOT) y Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) basal y final en <i>Rattus norvegicus var. albinus</i> con hepatotoxicidad inducida por acrilamida.</p> <p>Determinar el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Cajanus cajan</i> en dosis de 300mg/kg pc y 600mg/kg pc sobre los niveles séricos de fosfatasa alcalina basal y final en <i>Rattus norvegicus var. albinus</i> con hepatotoxicidad inducida por acrilamida.</p>	<p>Hipótesis Alternativa (H1): El extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Cajanus cajan</i> (Guandúl) tiene efecto hepatoprotector sobre <i>Rattus norvegicus var. albinus</i> con hepatotoxicidad inducida por acrilamida.</p> <p>Hipótesis Nula (H0): El extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Cajanus cajan</i> (Guandúl) no tiene efecto hepatoprotector sobre <i>Rattus norvegicus var. albinus</i> con hepatotoxicidad inducida por acrilamida.</p>	El trabajo de investigación fue de tipo experimental, y enfoque cuantitativo	<p>Independiente: Extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Cajanus cajan</i> (Guandul).</p> <p>Dependiente: Efecto hepatoprotector en <i>Rattus rattus norvegicus var. albinus</i>.</p>	<p>Es el producto obtenido a través de la maceración de hojas de <i>Cajanus cajan</i> utilizando agua destilada y alcohol de 50°C.</p> <p>Se determinó mediante la disminución de los niveles séricos de Transaminasa Glutámico oxalacetato (GOT), Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) en UI/L y Fosfatasa Alcalina en UI/L Obtenidas a partir de absorbancias de la muestra.</p>	<p>Grupo Control negativo: Agua y comida.</p> <p>Grupo control positivo: Acrilamida 50 mg/kg Ip dosis única.</p> <p>Grupo Exp. I: Acrilamida 50 mg/kg Ip dosis única + 300mg/kg pc de extracto hidroalcohólico de <i>Cajanus cajan</i>.</p> <p>Grupo Exp. II: Acrilamida 50 mg/kg Ip dosis única + 600mg/kg pc de extracto hidroalcohólico de <i>Cajanus cajan</i>.</p> <p>Variable cualitativa nominal Cuantificación de Transaminasa Glutámico oxalacetato (GOT), Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) en UI/L y Fosfatasa Alcalina en UI/L Obtenidas a partir de absorbancias de la muestra. Variable cuantitativa</p>	Prueba CHAPIRO WILKS para determinar la normalidad de los grupos de estudio, Pruebas paramétricas de ANOVA y TUKEY para el análisis de los resultados

4.7 Principios éticos

Para la ejecución de este trabajo de investigación, se consideró los principios éticos que rigen la actividad investigadora de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, los cuales consisten en ⁽³²⁾:

Protección a los animales.- El animal 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 ⁽³²⁾.

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. El investigador está también obligado a tratar equitativamente a quienes participan en los procesos, procedimientos y servicios asociados a la investigación ⁽³²⁾.

Integridad científica.- Alude al correcto procedimiento de la práctica de la ciencia, y connota honestidad, transparencia, justicia y responsabilidad. Por tanto transmite las ideas de totalidad y consistencia morales ⁽³²⁾

V. RESULTADOS

5.1 Resultados

Tabla 1. Efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de *Cajanus cajan* en dosis de 300mg/kg pc y 600mg/kg pc en *Rattus norvegicus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida por acrilamida a través de los niveles séricos de transaminasa Glutámico Oxalacetato (GOT) y Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) basal y final.

GRUPOS DE TRATAMIENTO	Transaminas a glutámico oxalacetato BASAL UI/L	FINAL UI/L	Transaminas a glutámico pirúvica BASAL UI/L	FINAL UI/L	Significancia P
NEGATIVO	16.5±2.1	14.2±2.28	12.4±2.3	13.9±2.0	
POSITIVO Acrilamida (50mg/kg pc)	121.2±4.1	137.5±4.5	108.2±3.4	136.8±4.1	0.003*
Acrilamida (50 mg/kg pc) + EHA <i>Cajanus cajan</i> 300mg/Kg pc	115.0±3.4	73.1±14.3	106.7±1.9	64.2±2.8	
Acrilamida (50 mg/kg pc) + EHA <i>Cajanus cajan</i> 600mg/Kg pc	102.4± 6.8	57.2±8.1	78.7±2.1	40.7±1.8	

* Prueba ANOVA (p<0.05)

* EHA: Extracto hidroalcohólico

Tabla 2: Efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de *Cajanus cajan* en dosis de 300mg/kg pc y 600mg/kg pc en *Rattus norvegicus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida por acrilamida a través de los niveles séricos de fosfatasa alcalina basal y final.

GRUPOS DE TRATAMIENTO	BASAL UI/L	FINAL UI/L	Significancia P
NEGATIVO	19.2±3.4	15.7±3.3	
POSITIVO Acrilamida (50mg/kg pc)	92.1±3.0	104.2±14.6	0.001*
Acrilamida (50 mg/kg pc) + EHA <i>Cajanus cajan</i> 300mg/Kg pc	70.8±4.6	32.1±4.3	
Acrilamida (50 mg/kg pc) + EHA <i>Cajanus cajan</i> 600mg/Kg pc	59.9±4.6	24.8±4.7	

* Prueba ANOVA (p<0.05)

* EHA: Extracto hidroalcohólico

5.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las transaminasas normalmente se encuentran en el suero en concentraciones bajas. Estas enzimas se liberan a la sangre en grandes cantidades cuando hay daño de la membrana celular hepática que produce una permeabilidad incrementada. Cualquier tipo de lesión hepática puede causar las elevaciones en las transaminasas séricas. El daño hepático es la causa más importante del incremento de estas enzimas en suero. En muchas clases de enfermedades del hígado, las actividades de Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) y de Transaminasa Glutámico Oxalacetato (GOT) pueden alcanzar a valores de cien veces más alto que los límites superiores normales, aunque elevaciones de 10 a 40 veces son frecuentemente encontradas ⁽⁸⁾.

Las actividades de ambas enzimas pueden alcanzar a valores de 100 veces más alto que los límites superiores normales, aunque elevaciones de 10 a 40 veces son frecuentemente encontradas. El daño hepático agudo tiende a producir grandes elevaciones de actividad Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) sérica, mientras que en el daño crónico la actividad Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) sérica puede estar normal o moderadamente incrementada. El grado de incremento en la actividad Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) sérica correlaciona con el número de hepatocitos dañados, el cual puede ser utilizado para evaluar la extensión del daño hepático ⁽⁸⁾.

En la tabla 01, se muestra los valores de Transaminasa Glutámico Oxalacetato (GOT) inicial del grupo Negativo es de 16.5 ± 2.1 UI/L y final 14.2 ± 2.28 UI/L y de Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) inicial del grupo negativo fue 12.4 ± 2.3 UI/L y final 13.9 ± 2.0 UI/L lo cual indica que los valores obtenidos están dentro de los

valores normales y las diferencias obtenidas son mínimas debido al metabolismo de las ratas. Del grupo Positivo las concentraciones de Transaminasa Glutámico Oxalacetato (GOT) inicial fue 121.2 ± 4.1 UI/L y final $137.5.0 \pm 4.5$ UI/L y de Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) fue 108.2 ± 3.4 UI/L y final 136.8 ± 4.1 UI/L esto es debido a la hepatotoxicidad inducida por acrilamida, como sabemos por estudios la acrilamida produce la destrucción completa de innumerables lobulillos contiguos, con liquefacción de los hepatocitos que deja una trama reticular colapsada. La pérdida del parénquima hepático y la retracción del hígado hacen que la trama reticular se condense simulando la convergencia de los espacios porta, produciéndose destrucciones extensas del lobulillo, estos valores según **Risk** relaciona a los diversos marcadores de laboratorio clínico para la lesión hepática, las transaminasas séricas, especialmente la alanina aminotransferasa (ALT), son los indicadores universalmente más importantes para los estudios que van desde las primeras pruebas preclínicas en especímenes hasta el seguimiento posterior a la comercialización del paciente ^(7, 25).

Los valores elevados de transaminasas se deben al daño hepático producido por la administración de acrilamida, según **Benites** la hepatopatía relacionada con el consumo de acrilamida se debe a los efectos genotípicos en el hepatocito, probablemente a través de daño oxidativo del ADN inducido por ROS intracelular y el agotamiento de GSH. La enzima CYP2E1 tiene especial interés para el desarrollo de la hepatopatía, es especialmente activa en la producción de ERO, ya que es una proteína desacoplada que genera ERO, incluso en ausencia de sustrato añadido. La acrilamida es metabolizada por el CYP2E1 y su actividad aumenta después del consumo de esta sustancia ⁽²⁷⁾.

Los valores obtenidos en el grupo experimental I de Transaminasa Glutámico Oxalacetato (GOT) inicial fue 115.0 ± 3.4 UI/L y final 73.1 ± 14.3 UI/L y Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) inicial 106.7 ± 1.9 UI/L y final fue 642 ± 2.8 UI/L, del grupo experimental II la concentración de Transaminasa Glutámico Oxalacetato (GOT) inicial fue 102.4 ± 6.8 UI/L y final 57.2 ± 8.1 UI/L, mientras que la Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) del grupo experimental II el inicial fue 78.7 ± 2.1 UI/L y final 40.8 ± 1.8 UI/L, las variaciones en los valores obtenidos fueron por el consumo de extracto hidroalcohólico de hojas de *Cajanus cajan*, según **Pratima** las hojas del *Cajanus cajan* contienen cuatro compuestos importantes, la pinostrobina, el ácido cajaninstilbeno, la vitexina y la orientina, que poseen propiedades antioxidantes significativas. Algunas fracciones de proteínas aisladas de las hojas mostraron efectos hepatoprotectores, es por ello se evidencia la disminución significativa de Transaminasa Glutámico Oxalacetato (GOT) y Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) después de la administración del extracto hidroalcohólico de *Cajanus cajan* ⁽¹⁰⁾.

El mecanismo antioxidante más importante intracelular es el mediado por el glutatión (GSH), este es un tripeptido (GSH, γ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina) que protege a la célula de diferentes especies oxidantes. EL contenido hepático del GSH oscila entre 5 y 10 nmol/L y está influenciado por varios factores como: la disponibilidad de aminoácidos precursores, la actividad de gama glutamilcisteín sintetasa (GGCS), el flujo de GHS desde el hígado, el uso intracelular del GHS como agente reductor de peróxidos tóxicos, la conjugación con metabolitos electrofilicos y por la combinación de todos estos factores ⁽¹¹⁾.

En la Tabla 02, se observan los promedios de las lecturas de fosfatasa alcalina sérica, la cual se utilizó como segundo marcador para cuantificar el daño hepático porque es un indicador indirecto de daño hepático, ésta asociado a la obstrucción biliar, en esta tabla se puede observar los valores de fosfatasa alcalina inicial del grupo negativo que fue 92.1 ± 3.0 UI/L y final 104.2 ± 14.6 UI/L, el incremento es debido a la hepatotoxicidad generada por la acrilamida. La Fosfatasa Alcalina sérica generalmente se excreta de manera normal vía biliar por el hígado y su incremento está relacionado con la obstrucción del tracto biliar debido a su presencia en la membrana del hepatocito y en la superficie exterior de la membrana de la canalicular biliar, es por ello que el incremento de los niveles plasmáticos de la Fosfatasa Alcalina sérica, el aumento de la actividad de la fosfatasa se acompaña de un aumento de las tasas de excreción de colina y fosfatidilcolina en la bilis. El folato bloquea los aumentos en la actividad de la fosfatasa y en la excreción de colina que normalmente se producen por una mezcla de glicina y heparina o por cortisol. Estas observaciones han sugerido que al menos una de las funciones de la fosfatasa alcalina de la membrana hepática es hidrolizar la fosforilcolina para que la colina pueda ser transportada a través de la membrana canalicular biliar. El nivel de actividad de la enzima parece estar controlado por la cantidad de fosforilcolina disponible para la excreción en la bilis ⁽¹¹⁾.

En la tabla 2, se puede observar los valores de fosfatasa alcalina sérica del grupo experimental I inicial 70.8 ± 40.6 UI/L y final 32.1 ± 4.3 UI/L y del grupo experimental II inicial 59.9 ± 4.6 UI/L y final 24.8 ± 4.7 UI/L, según **Ahsan** las investigaciones de los constituyentes químicos han indicado que las hojas de *C. cajan* son ricas en flavonoides y estilbenos. También contienen saponinas, cantidad conspicua de taninos

y cantidades moderadas de azúcares reductores, resinas y terpenoides. Los estudios químicos revelan 2'-metil cajanona, 2'-hidroxi genisteína, isoflavonas, cajanina, cahanones, etc., que imparten propiedades antioxidantes y hepatoprotectoras⁽¹¹⁾.

VI. CONCLUSIONES:

- ✓ El extracto Hidroalcohólico de hojas de *Cajanus cajan* (GUANDÚL) presenta efecto hepatoprotector en dosis de 300 mg/kg y 600 mg/kg de p.c en *Rattus norvegicus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida por acrilamida, el cual se evaluó mediante la disminución de los niveles séricos de Transaminasa Glutámico Oxalacetato (GOT), Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) y fosfatasa alcalina sérica, demostrando una buena hepatoprotección.

- ✓ La dosis de 600 mg/kg pc del extracto hidroalcohólico de hojas de *Cajanus cajan* ejerció un mayor efecto sobre hepatotoxicidad inducida por acrilamida, en comparación con la dosis de 300mg/kg pc lo cual nos indica una disminución significativa en la medición de Transaminasa Glutámico Oxacélica (GOT), Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) y Fosfatasa alcalina.

ASPECTOS COMPLEMENTARIOS:

- ✓ Se recomienda el estudio de los fitoconstituyentes presentes en *Cajanus cajan* (Guandul) de tal forma que pueda seguirse investigando los posibles usos terapéuticos tanto a nivel hepático como en otros órganos.

- ✓ Sería importante establecer las posibles dosis tóxicas de *Cajanus cajan* para evitar a futuro la aparición de efectos adversos por su consumo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gallegos M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. 2016 [Citado 04 de febrero, 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025558320100400002
2. Chávez J, Chávez J. Estudio farmacognóstico y químico preliminar del extracto de las hojas de fréjol de palo (*cajanus cajan l.millsp*) nativa de la provincia del Guayas Ecuador [Tesis] Universidad de Guayaquil. 2016; Ecuador [Citado 05 de febrero, 2019]. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/21857>
3. Aguilar V, Marcelo M. "Efecto del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Lepidium meyenii* (Maca Roja) sobre lipoperoxidación inducida en células hepáticas de *Rattus norvegicus var. albinus*." [Tesis] Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Perú, 2014 [Citado 04 de febrero, 2019]. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3695/Aguilar%20Ramos%2C%20Vianca%20Luz.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
4. Alwan A. Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud. 10th Revisión. Ginebra. [Internet]. España. 2012. 3ª edición. [Citado el 01 de marzo del 2019]; Disponible en: <http://ais.paho.org/classifications/Chapters/pdf/Volume3.pdf>

5. Caballero J. Efecto hepatoprotector de la almendra de semillas de cucurbita maxima (zapallo macre) en ratas.[Tesis] Universidad Nacional Mayor de San Marcos.Facultad de Medicina.Perú,2014[Citado 04 de febrero,2019].Disponible en:http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3946/Caballero_cj.pdf?sequence=1&isAllowed=y

6. Lipe C. Efecto hepatoprotector del zumo del fruto de *Corryocactus brevistylus* (Sanky) en ratones con daño hepático inducido por etanol.[Tesis]Universidad Nacional Mayor de San Marcos.Facultad de Medicina.Perú,2016[Citado 04 de febrero,2019].Disponible en:http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/5220/Lipe_cc.pdf?sequence=1&isAllowed=y

7. Rizk, Maha Z, Hanan F Aly, Dina M Abo-Elmatty, MM Desoky, N Ibrahim y Eman A Younis. "Efecto hepatoprotector de *Caesalpinia Gilliesii* y *Cajanus Cajanus* Proteínas contra el daño hepático inducido por sobredosis de acetoaminofeno". *Toxicología y salud industrial* 32, no. 5 (mayo de 2016): 877-907.Disponible en:<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0748233713503030>

8. Arka G,Anindita K,Ankit S,Kumar SA,Kumar MS.Preliminary evaluation of hepatoprotective potential of the polyherbal formulation.2015Apr-Jun;4(2):118-24.[Citado 05 de febrero,2019].Disponible en: <https://preview.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26401397>

9. Ji XY,Chen JH,Zheng GH,Huang MH,Zhang L,Yi H et al.Design and Synthesis of Cajanine Analogues against hepatitis C Virus through Down Regulating Host Chondroitin Sulfate NAcetylgalactosaminyltransferase.2016.Nov 23;59(2):10268102841.[Citado 05 de febrero,2019].Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27783522>
10. Pratima H, Liyakat MD, Pratima M. Hepatoprotective activity of seedcoat and cotyledon extract of cajanus cajan L.Against CCL₄ induced hepatotoxicity in mice.Dec 2016,10.21276(7).[Citado 05 de febrero,2019].Disponible en:<http://www.ijabpt.com/pdf/95008-Pratima%20H.pdf>
11. Ahsan R, Islam M. Actividad hepatoprotectora del extracto de metanol de algunas plantas medicinales contra la hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono en ratas.Euro J Sci Res.2009;37:30210).[Citado 05 de febrero,2019]. Disponible en:https://www.researchgate.net/scientificcontributions/2012183917_Rajib_Ahsan
12. Torres V, Castro E. Fitoterapia. Rev. Act. Clin. Med v.42 La Paz mar. 2014. [Citado 25 febrero).[Citado 05 de febrero,2019].Disponible en:2019].Disponible en:[http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S230437682014000300001 & script= sci_arttext](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S230437682014000300001&script=sci_arttext)

13. Zhang X. Medicina tradicional: Definiciones. Medicina tradicional, Medicamentos Esenciales y Política Farmacéutica (EDM) OMS/Ginebra. [Citado 25 febrero 2019]. Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/
14. Navarro C, Restrepo D, Perez J. El Guandul (*Cajanus cajan*) una alternativa en la industria de los alimentos. Vol 12 No.2 (197.206). 2014; Colombia [Citado 07 de febrero, 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v12n2/v12n2a22.pdf>
15. Castillo C, Narváez M, Christine M, Hahn H. Agromorfología y usos del *Cajanus cajan* L. Millsp. (FABACEAE). 2016; Colombia [Citado 09 de febrero, 2019]. Disponible en: [http://boletincientifico.ucaldas.edu.co/downloads/Boletin\(20\)1_5.pdf](http://boletincientifico.ucaldas.edu.co/downloads/Boletin(20)1_5.pdf)
16. Proma R, Sazzad Z, Marzana M, Tanzim K, Pritesh R. Pharmacological and phytochemical properties of *Cajanus cajan* (L.) Huth. (Fabaceae): A review Volume 3; Issue 2; April 2018; Page No. 27.37; Bangladesh [Citado 09 de febrero, 2019]. Disponible en: www.pharmacyjournal.net/download/124/3-2-15-940.pdf
17. Subhasish D, Charan K, Sandip M, Soma S, Rajesh S, Buddhadeb D, et al. Impact of edaphic factors and nutrient management on the hepatoprotective efficiency of Carlinoside purified from pigeon pea leaves: An evaluation of UGT1A1 activity in hepatitis induced organelles. Pages 512523. Vol. 161; 2018; India [Citado 09 de febrero, 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935117317231>

18. Albornoz M, Romero J. Utilización de la harina de guandul (*cajanus cajan linneo*) para incrementar el aporte proteico en la elaboración de pastas alimenticias. [Tesis] Universidad de La Salle Facultad De Ingeniería De Alimentos. 2014, Bogotá [Citado 09 de febrero, 2019]. Disponible en: <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/15990/00798385.pdf?sequence=1>
19. Martínez S, González J, Culebras J, Tuñón J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. 17(6)271.278. 2012; España [Citado 09 de febrero, 2019]. Disponible en: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>
20. Vay D. Anatomía y fisiología humana. 2nd Ed. España, Editorial Paidotribo; 2008 [Citado 07 de febrero, 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=gkqKyVVH3OQC&pg=PA157&dq=fisiologia+del+higado+anatomia&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj0KWanODbAhUOylMKHTQ5AbwQ6AEIKjAB#v=onepage&q=fisiologia%20del%20higado%20anatomia&f=false>
21. Tejada F. Hepatotoxicidad por Fármacos. 2010; España [Citado 05 de febrero, 2019]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699695X2010000300006
22. Cano A, Cifuentes L, Amariles P. Toxicidad hepática causada por medicamentos: revisión estructurada. Colombia. 2015. [Internet]. España. 2012. [Citado el 06 de diciembre del 2017]; Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcg/v32n4/01209957rcg320400337.pdf>

23. Veloz D. "Determinación de la actividad hepatoprotectora de boldo (*Peumus boldus*) en ratas (*Rattus norvegicus*) con intoxicación hepática inducida por paracetamol." Escuela Superior Politécnica De Chimborazo. [Tesis] 2013; Ecuador. [Citado 07 de febrero, 2019]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/2474/1/56T00342.pdf>
24. Idme R. "Determinación del daño hepático causado por la fasciolosis crónica en bovinos y ovinos utilizando marcadores enzimáticos". [Tesis] Universidad Nacional del Altiplano. 2015; Perú. [Citado 07 de febrero, 2019]. Disponible en: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/2782/Idme_Ha%C3%B1ari_Rimberto.pdf?sequence=1
25. Muñoz C. "Mitigación de la formación de acrilamida en hojuelas de papas mediante el uso de fritura al vacío". [Tesis] Universidad de Chile Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Chile 2015 [Citado 05 de febrero, 2019]. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/134944/Mitigaciondelaformaciondeacrilamidaenhojuelasdepapasmedianteelusodefritura.pdf?sequence=1>
26. Valenzuela R, Ronco A. Acrilamida en los alimentos. 2007; Chile [Citado 05 de febrero, 2019]. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071775182007000100001

27. Benitez C, Lucas A, Aispurú G, Alvarez M, Llanos I, Isabel C, et al. Efectos de un potencial hepatotóxico: La Acrilamida Monomérica, en un modelo murino. Universidad Nacional del Nordeste.Ecuador.2004[Citado 05 de febrero,2019]. Disponible en:<http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2004/3Medicina/M-078.pdf>
28. Adeboye O,Olajire M.Hepatoprotective effect of Cajanus cajan on tissue defense system in D.galactosamine induced hepatitis in rats.36(3);237.241.2011[Citado 09 de febrero,2019].Disponible en:<http://turkjbiochem.com/2011/237241.pdf>
29. Bulbul I. Hepatoprotective Activity of Methanol Extract of some medicinal plants against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in Rats.Vol.37 No.2,pp.302-310.2016;Bangladesh[Citado 10 de febrero,2019].Disponible en:https://www.researchgate.net/profile/Israt_Bulbul/publication/239553128_Hepatoprotective_Activity_of_Methanol_Extract_of_Some_Medicinal_Plants_Against_Carbon_Tetrachloride_Induced_Hepatotoxicity_in_Rats/links/570b0ab808ae8883a1fc232f.pdf
30. Wiener Laboratorios S.A.I.C.Transaminasas 200.Argentina.[Citado el 10 de febrero,2019]Disponible en:http://www.wienerlab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/transaminasas200_sp.pdf

31. Valtek S.A.Fosfatasa Alcalina_LS(DGKS).Chile.[Citado 10 de febrero,2019].
Disponible en:<http://andinamedica.com.pe/wp-content/uploads/2016/08/VTK-fosfatasaalcalina-ls.pdf>

32. Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. Código de Ética para La Investigación. Versión 001. Aprobado por acuerdo del Consejo Universitario con Resolución N° 01082016CU Uladech Católica,de fecha 25 de enero de 2016.[Citado 18 de febrero del 2019].Disponible en:<https://www.uladech.edu.pe/images/stories/universidad/documentos/2016/codigodeeticaparalainvestigacionv001.pdf>

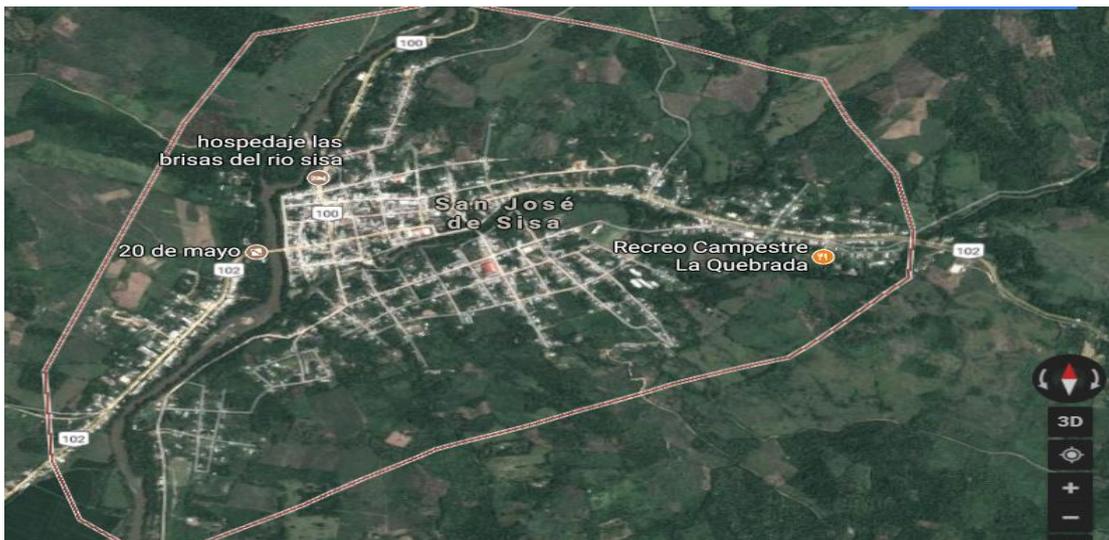
ANEXOS

ANEXO N° 1: *Cajanus cajan* (GUANDÚL)



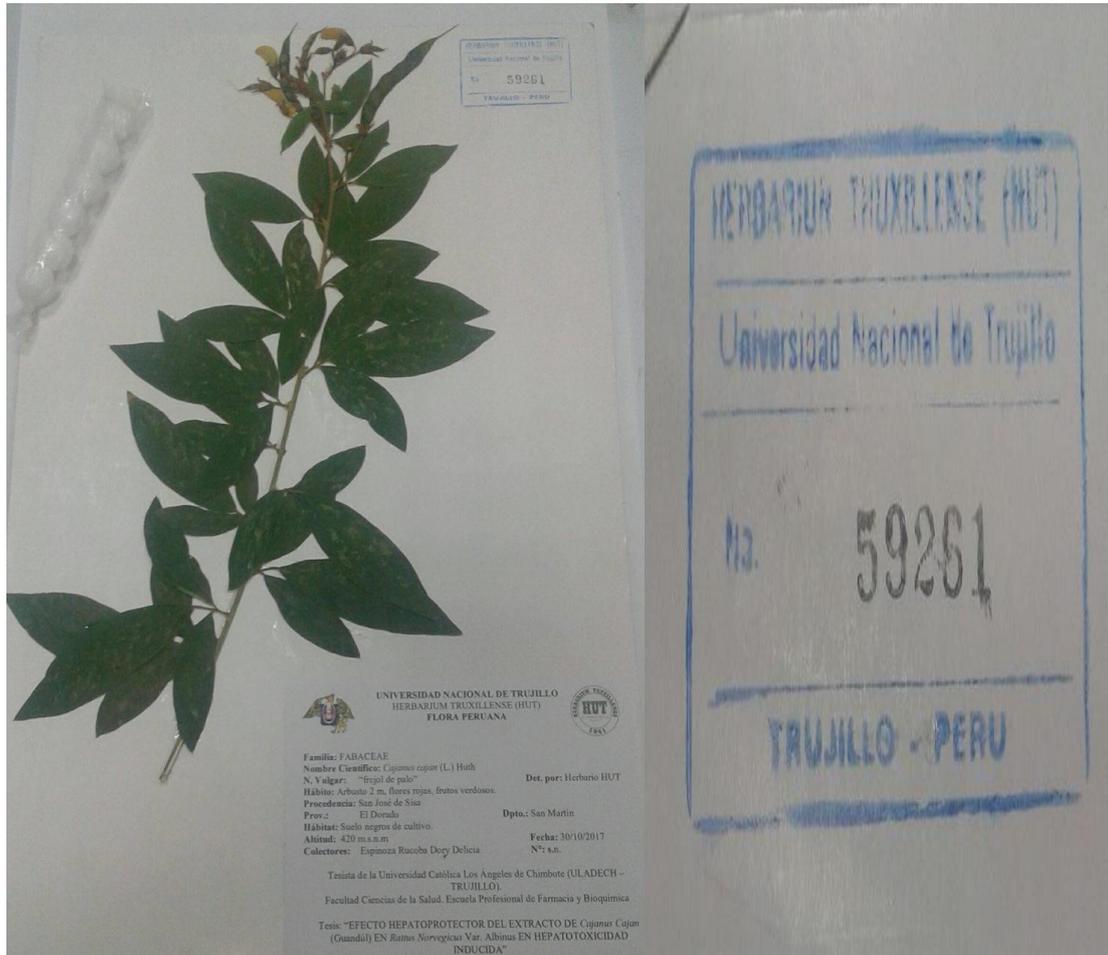
Fuente: Imagen obtenida por la investigadora

ANEXO N° 2: Ubicación Satelital de San José de Sisa - Provincia El Dorado – Departamento de San Martín. Lugar de donde fue recolectada las hojas de *Cajanus cajan* (Guandúl).



Fuente: Vista satelital de San José de Sisa. Disponible en: https://satellites.pro/mapa_de_San_Jose_de_Sisa

ANEXO N° 3: Certificación taxonómica de la planta de *Cajanus cajan* (GUANDÚL)



Fuente: Imagen obtenida por la investigadora

ANEXO N° 4: Obtención de *Rattus rattus norvegicus* var. albinus. De la Universidad Cayetano Heredia.



Fuente: Imágenes obtenidas por la investigadora

ANEXO N° 05: Aclimatación de los animales de experimentación



ANEXO N° 6: Investigadora realizando pesado y molienda de las hojas de *Cajanus cajan*



ANEXO N° 7: Investigadora realizando el tamizado de las hojas de *Cajanus cajan* (Guandúl) para la elaboración del extracto hidroalcohólico en el laboratorio de ULDECH



ANEXO N° 8: Extracto hidroalcohólico de *Cajanus cajan* en proceso de maceración



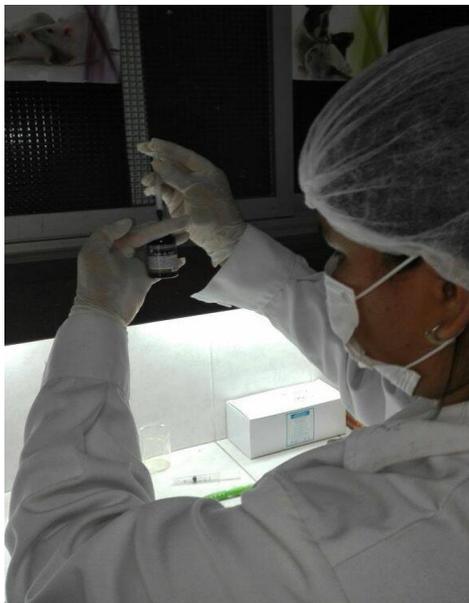
ANEXO N° 9: Investigadora realizando el Peso del extracto hidroalcohólico seco de *Cajanus cajan*



ANEXO N° 10: Investigadora Espinoza Rucoba Dory realizando el pesado y marcado de *Rattus norvegicus* var. albinus.



ANEXO N° 11: Investigadora realizando la preparación y administración de Ketamina + xilacina



ANEXO N° 12: Investigadora realizando la punción cardiaca para la obtención de muestras de sangre.



ANEXO N° 13: Investigadora realizando el sondeo a *Rattus rattus novergicus* var. *albinus* para la administración del extracto hidroalcohólico de *Cajanus cajan*.





Transaminasas 200

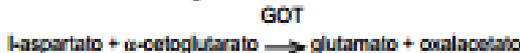
Para la determinación de Transaminasa Glutámico Oxalacética (GOT(AST) y Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT(ALT)

SIGNIFICACION CLINICA

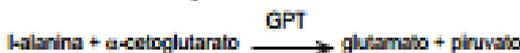
Las transaminasas GOT y GPT son enzimas ampliamente difundidas en el organismo con elevada concentración en corazón, hígado, músculo esquelético, riñón y eritrocitos. La actividad sérica en condiciones normales es baja o nula. Un daño o enfermedad en cualquiera de estos tejidos conduce a un aumento en 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 α -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 α -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-DNPH) 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 alforo. 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: corosivos. 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: 5,1 ml
- Alternativamente pueden disminuirse los volúmenes de Muestra y Reactivos a la mitad.

PROCEDIMIENTO		
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 (UI)	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 (UI)	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 (UI)	GOT (UI)
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 UI o en las antiguas unidades del método (Karmen o Wroblesky), para lo que deben utilizarse las siguientes equivalencias:

UI = UKarmen/ml (o Wroblesky/ml) x 0,482

UKarmen/ml (o Wroblesky/ml) = UI x 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 UI. Si bien se han hallado individuos normales con valores hasta 18 UI, los niveles de transaminasas que se encuentren entre 12 y 18 UI 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 su-

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 UI	± 1,50 UI	7,77 %
49,0 UI	± 2,19 UI	4,47 %
66,5 UI	± 3,44 UI	5,17 %

GPT:

Nivel	D.S.	C.V.
16,5 UI	± 0,79 UI	4,79 %
23,3 UI	± 1,16 UI	4,98 %
44,8 UI	± 2,35 UI	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 UI para un nivel de GOT de 88 UI y 0,2 UI para un nivel de GPT de 64 UI.

c) Rango dinámico: si la actividad de la muestra es mayor de 80 UI 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. 1751002).

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.

ANEXO N° 15: Kit de Fosfatasa Alcalina

FOSFATASA ALCALINA – LS (DGKC)

Reactivo líquido para la determinación de la enzima Fosfatasa Alcalina en suero o plasma optimizado según DGKC.



Para uso en el diagnóstico in Vitro. Apto para usar en autoanalizador.

SIGNIFICANCIA CLINICA

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 y enfermedades óseas, entre otras.

FUNDAMENTOS DEL METODO

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

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

Composición de los Reactivos:

Reactivo 1:	
Buffer DEA pH 9.8	1.2 M
Mg2+	1,2 m M
Estabilizantes no reactivos	c.s.
Reactivo 2:	
p-Nitrofenilfosfato	16 mM
Estabilizantes no reactivos	c.s.

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. Estabilidad del reactivo de trabajo: 10 días entre 2° y 8°C., Descartar el reactivo si su absorbancia es mayor de 0.8 D.O. 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 termoestable, capaz de medir absorbancia a 405 nm, baño termoregulado, cronómetro, pipetas, calibrador y sueros controles.

TECNICA

Llevar el reactivo a la temperatura que se realizará el ensayo (37°C). Las pipetas a utilizar deben estar limpias y libres de residuos para no contaminar el reactivo.

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.

CALIBRACION

- En la calibración se recomienda utilizar calibrador sérico VALTROL-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

Factor = $\frac{\text{Concentración Calibrador}}{\Delta A/\text{min. Calibrador}}$
Actividad PAL (UI/L) = Factor x Abs. Muestra

O bien se puede utilizar el siguiente factor:

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

$$\text{Factor} = \frac{V_t \times 1000}{\sum_{PUP} \times P \times V_m} = 2751$$

Vt= Volumen total de reacción
 \sum_{PUP} = 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 VALTROL-N (código 210-100) y VALTROL-P (código 210-110).

- 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.

-Limite 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.

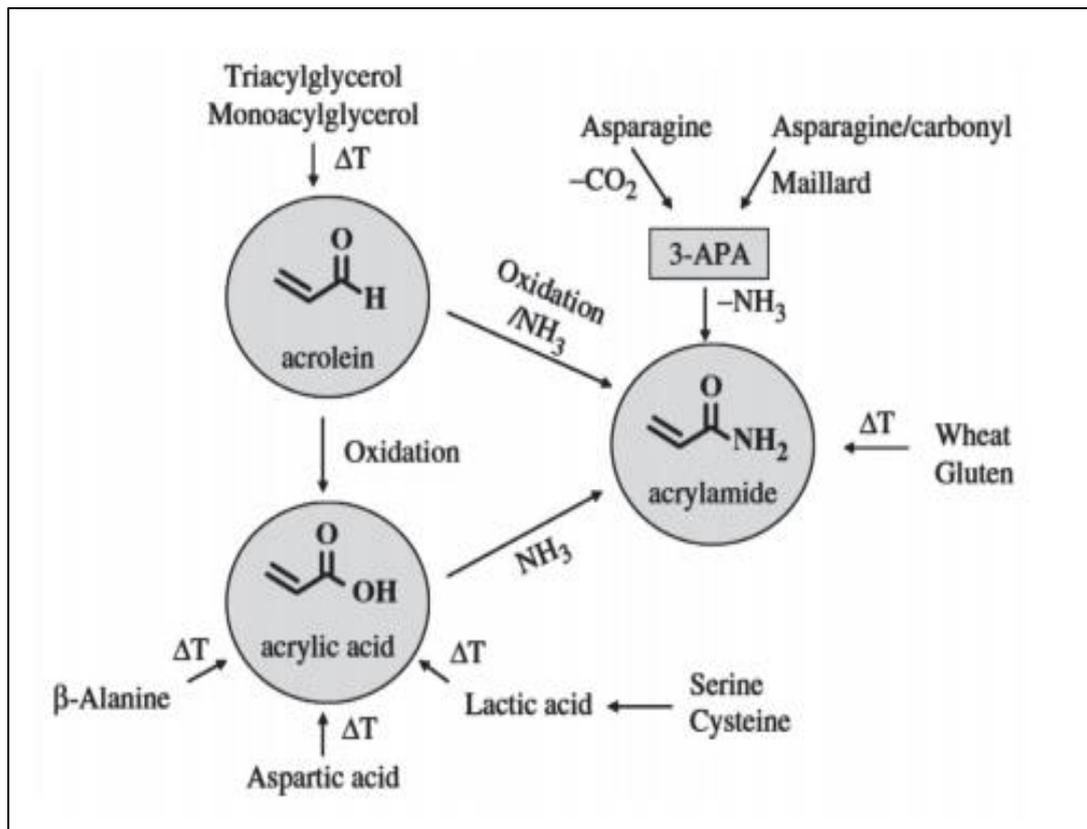
Mujeres	64 – 306
Hombres	80 – 306
Niños hasta 15 años	hasta 644
Niños hasta 17 años	hasta 483

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, 4th ed. AACC Press, 1995.

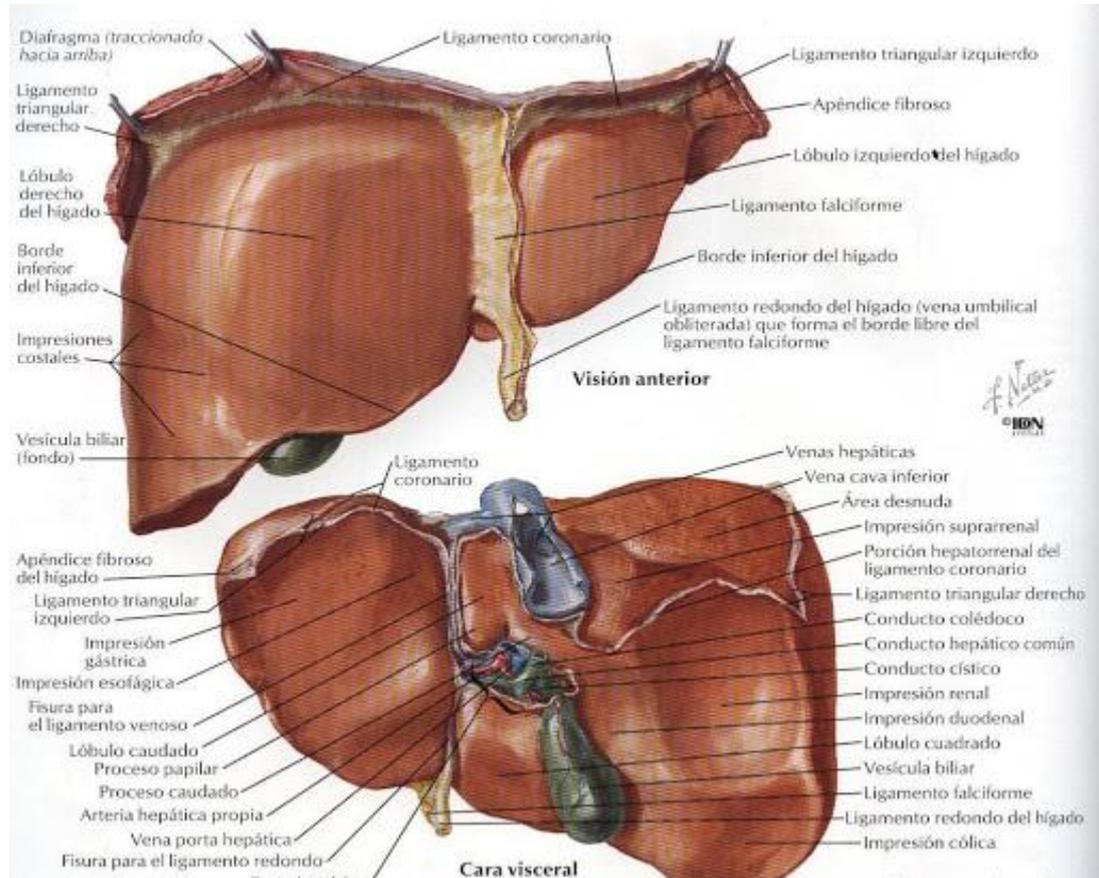
REV N° 1

ANEXO N°16: Adaptación de las posibles vías alternativas de formación de acrilamida.



Fuente: Calderón J. Aspectos sobre acrilamida. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/pml/v10n1/v10n1a11.pdf>

ANEXO N° 17: Presentación esquémica del hígado



Fuente: Picasa. *Caras y lecho del hígado.* Disponible en https://www.google.com.pe/search?dcr=0&biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=KzlsXMOIym5wLSuK3IAw&q=caras+y+lecho+del+higado+NETTER&oq=caras+y+lecho+de+l+higado+NETTER&gs_l=img.3...266220.284990..285484...0.0..0.520.6448.0j23j6j0j1j1.....1....1..gwsizimg.....35i39j0i67j0j0i5i30j0i8i30.KB8_Abq0wBo#imgcr=1BH672EuvwOkM

TABLA N° 01: Valores basales de transaminasas (GOT y GPT) post aclimatación del grupo control Negativo.

GRUPO DE TRATAMIENTO	Transaminasa glutámico oxalacética BASAL	Transaminasa glutámico pirúvica BASAL
CONTROL NEGATIVO	UI/L	UI/L
RATA 1	14	15
RATA 2	14.5	10
RATA 3	15.7	10
RATA 4	18	14.5
RATA 5	19.2	11
RATA 6	17.5	14
PROMEDIO	16.5	12.4
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	2.1	2.3

Fuente: Datos obtenidos por la investigadora

TABLA N° 02: Valores basales de transaminasas (GOT y GPT) post aclimatación del grupo positivo.

GRUPO DE TRATAMIENTO	Transaminasa glutámico oxalacética BASAL	Transaminasa glutámico pirúvica BASAL
POSITIVO	UI/L	UI/L
RATA 1	14	15
RATA 2	16	14
RATA 3	13	10
RATA 4	14	13
RATA 5	16	13
RATA 6	13	10
PROMEDIO	14	12.5
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	1.4	2.1

Fuente: Datos obtenidos por la investigadora

TABLA N° 03: Valores basales de transaminasas (GOT y GPT) post aclimatación del grupo Experimental 1.

GRUPO DE TRATAMIENTO	Transaminasa glutámico oxalacética BASAL	Transaminasa glutámico pirúvica BASAL
EXP 01	UI/L	UI/L
RATA 1	15	11
RATA 2	14	17
RATA 3	17	12
RATA 4	14	15
RATA 5	16	13
RATA 6	13	10
PROMEDIO	14	13
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	1.5	2.6

Fuente: Datos obtenidos por la investigadora

TABLA N° 04: Valores basales de transaminasas (GOT y GPT) post aclimatación del grupo Experimental 2.

GRUPOS DE TRATAMIENTO	Transaminasa glutámico oxalacética BASAL	Transaminasa glutámico pirúvica BASAL
EXP 02	UI/L	UI/L
RATA 1	13	14
RATA 2	14	13
RATA 3	12	14
RATA 4	14	15
RATA 5	15	13
RATA 6	11	11
PROMEDIO	14	13.3
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	1.5	1.4

Fuente: Datos obtenidos por la investigadora

ANEXO N° 18: Prueba de CHAPIRO–WILKS para determinar la normalidad de los grupos de estudio.

Pruebas de normalidad

GRUPOS	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
INICIAL-CN	.886	6	.295
INICIAL – CP	.950	6	.737
INICIAL-EXP01	.861	6	.191
INICIAL-EXP02	.935	6	.618
FINAL-CN	.937	6	.634
FINAL-CP	.965	6	.857
FINAL - EXP 01	.913	6	.457
FINAL - EXP02	.918	6	.488
INICIAL-CN	.873	6	.238
INICIAL – CP	.793	6	.051
INICIAL-EXP01	.989	6	.985
INICIAL-EXP02	.989	6	.985
FINAL-CN	.989	6	.987
FINAL-CP	.901	6	.379
FINAL - EXP 01	.852	6	.164
FINAL - EXP02	.947	6	.720

** Este es un límite inferior de la significación verdadera. a Corrección de la significación de Lilliefors*

INTERPRETACIÓN:

Teniendo en cuenta el número de muestra utilizado en la investigación la prueba que aplica para determinar la normalidad fue la de CHAPIRO – WILKS ($n < 30$). En el gráfico observamos que la significancia el valor $P > 0.05$ ES DECIR SE ACEPTA LA HIPOTESIS NULA por lo que se concluye que los datos provienen de una **DISTRIBUCIÓN NORMAL**.

TABLA 06: Datos válidos según criterio de normalidad

Resumen del procesamiento de los casos

GRUPOS		Casos					
		Válidos		Perdidos		Total	
		N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
GOT	INICIAL-CN	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	INICIAL - CP	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	INICIAL-EXP01	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	INICIAL-EXP02	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	FINAL-CN	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	FINAL-CP	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	FINAL - EXP 01	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	FINAL - EXP02	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
GPT	INICIAL-CN	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	INICIAL - CP	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	INICIAL-EXP01	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	INICIAL-EXP02	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	FINAL-CN	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	FINAL-CP	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	FINAL - EXP 01	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	FINAL - EXP02	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%

INTERPRETACIÓN: Se puede observar que el 100% de los datos obtenidos cumplen el supuesto de normalidad, por lo que no se observan datos perdidos.

ANEXO 19: Prueba ANOVA unifactorial para encontrar la significancia de los grupos de estudio transaminasas (GOT y GPT)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	59285.576	7	8469.368	79.376	.003
Intra-grupos	4267.970	40	106.699		
Total	63553.545	47			
Inter-grupos	24315.583	7	3473.655	36.776	.003
Intra-grupos	3778.227	40	94.456		
Total	28093.810	47			

INTERPRETACIÓN: Aplicando la prueba anova puede observarse que existe que el valor $p < 0.05$ por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, es decir existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tanto antes como después para los valores de GOT Y GPT.

TABLA 07: Prueba de comparaciones multiples de TUKEY para los grupos antes y después

Variable dependiente	(I) GRUPOS	(J) GRUPOS	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
			Límite inferior	Límite superior	Límite inferior
GOT	INICIAL-CN	FINAL-CN	-24.83333(*)	5.96376	.004
		FINAL-CP	-117.16667(*)	5.96376	.000
		FINAL - EXP 01	-54.61112(*)	5.96376	.000
		FINAL - EXP02	-79.55553(*)	5.96376	.000
	INICIAL - CP	FINAL-CN	71.88888(*)	5.96376	.000
		FINAL-CP	-20.44445(*)	5.96376	.028
		FINAL - EXP 01	42.11110(*)	5.96376	.000
		FINAL - EXP02	17.16668	5.96376	.104
	INICIAL-EXP01	FINAL-CN	44.22222(*)	5.96376	.000
		FINAL-CP	-48.11112(*)	5.96376	.000
		FINAL - EXP 01	14.44443	5.96376	.259
		FINAL - EXP02	-10.49998	5.96376	.649
	INICIAL-EXP02	FINAL-CN	36.44445(*)	5.96376	.000
		FINAL-CP	-55.88888(*)	5.96376	.000
		FINAL - EXP 01	6.66667	5.96376	.949
		FINAL - EXP02	-18.27775	5.96376	.068
	FINAL-CN	FINAL-CP	-92.33333(*)	5.96376	.000
		FINAL - EXP 01	-29.77778(*)	5.96376	.000
		FINAL - EXP02	-54.72220(*)	5.96376	.000
	FINAL-CP	FINAL-CN	92.33333(*)	5.96376	.000
		FINAL - EXP 01	62.55555(*)	5.96376	.000
		FINAL - EXP02	37.61113(*)	5.96376	.000
	FINAL - EXP 01	FINAL-CN	29.77778(*)	5.96376	.000
		FINAL-CP	-62.55555(*)	5.96376	.000
FINAL - EXP02		-24.94442(*)	5.96376	.003	
FINAL - EXP02	FINAL-CN	54.72220(*)	5.96376	.000	
	FINAL-CP	-37.61113(*)	5.96376	.000	
	FINAL - EXP 01	24.94442(*)	5.96376	.003	
GPT	INICIAL-CN	FINAL-CN	-19.00000(*)	5.61117	.031
		FINAL-CP	-83.36667(*)	5.61117	.000
		FINAL - EXP 01	-43.40000(*)	5.61117	.000
		FINAL - EXP02	-38.60000(*)	5.61117	.000
	INICIAL - CP	FINAL-CN	29.63333(*)	5.61117	.000
		FINAL-CP	-34.73333(*)	5.61117	.000
		FINAL - EXP 01	5.23333	5.61117	.981
		FINAL - EXP02	10.03333	5.61117	.631
	INICIAL-EXP01	FINAL-CN	14.00000	5.61117	.227
		FINAL-CP	-50.36667(*)	5.61117	.000
		FINAL - EXP 01	-10.40000	5.61117	.589
		FINAL - EXP02	-5.60000	5.61117	.972
	INICIAL-EXP02	FINAL-CN	14.00000	5.61117	.227
		FINAL-CP	-50.36667(*)	5.61117	.000
		FINAL - EXP 01	-10.40000	5.61117	.589

	FINAL - EXP02	-5.60000	5.61117	.972
FINAL-CN	FINAL-CP	-64.36667(*)	5.61117	.000
	FINAL - EXP 01	-24.40000(*)	5.61117	.002
	FINAL - EXP02	-19.60000(*)	5.61117	.024
FINAL-CP	FINAL-CN	64.36667(*)	5.61117	.000
	FINAL - EXP 01	39.96667(*)	5.61117	.000
	FINAL - EXP02	44.76667(*)	5.61117	.000
FINAL - EXP 01	FINAL-CN	24.40000(*)	5.61117	.002
	FINAL-CP	-39.96667(*)	5.61117	.000
	FINAL - EXP02	4.80000	5.61117	.988
FINAL - EXP02	FINAL-CN	19.60000(*)	5.61117	.024
	FINAL-CP	-44.76667(*)	5.61117	.000
	FINAL - EXP 01	-4.80000	5.61117	.988

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

INTERPRETACIÓN: Se puede observar que los valores de P son < 0.05 en la comparación inter grupos antes y después en los grupos resaltados; lo que nos indica que en estos grupos la significancia es $p < 0.05$ es decir EXISTE DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA ENTRE ESOS GRUPOS

TABLA N° 8: Valores Basales post aclimatación de Fosfatasa Alcalina de los cuatro grupos de experimentación.

FOSFATASA BASAL POST ACLIMATACIÓN UI/L				
GRUPOS DE TRATAMIENTO	CONTROL NEGATIVO	CONTROL POSITIVO	EXPERIMENTAL 1	EXPERIMENTAL 2
RATA 1	16	15.1	14.9	15.1
RATA 2	16.5	17.3	15.2	16.3
RATA 3	19.2	16	17.5	18.24
RATA 4	15.8	18.4	19.2	19.2
RATA 5	17.1	15.4	16.4	14.8
RATA 6	14.5	19	15	17.4
PROMEDIO	16.51666667	16.86666667	16.36666667	16.84
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	1.574060566	1.619464932	1.740114939	1.75065702

Fuente: Datos obtenidos por la investigadora.

TABLA N° 09: Prueba ANOVA UNIFACTORIAL para encontrar la significancia de los grupos de estudio-anova fosfatasa Alcalina.

ANOVA		
	F	Sig.
Inter-grupos	.722	.305
Intra-grupos		
Total		
Inter-grupos	221.14	.001
Intra-grupos		
Total		

Fuente: SPSS 20.0 sobre los datos obtenidos por la investigadora en el estudio.

Interpretación:

Se puede observar que los valores de Fosfatasa Alcalina antes de iniciar el tratamiento con *Cajanus cajan* no es significativa (0.305) sin embargo después del tratamiento con los extractos de *Cajanus cajan* los valores nos demuestran que existe diferencia estadística altamente significativa a favor de *Cajanus cajan* (0.001)

ANEXO N° Certificado sanitario de Bioterio-Vicerrectorado de investigación de la Universidad Cayetano Heredia.



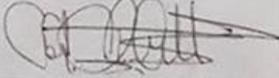
**UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA**
Bioterio - Vicerrectorado de Investigación

CERTIFICADO

San Martín de Porres, 06 de noviembre de 2017

Mediante la presente se certifica que las 16 ratas de la cepa albina Sprague Dawley, hembras, adultas, de aproximadamente 3,5 meses, adquiridas el 06 de noviembre de 2017 por la Sra. Dory Delicia Espinoza Rucoba, están en perfecto estado sanitario y fisiológico, para ser utilizada en cualquier protocolo Biomédico.

Atentamente;


Dr. CHRISTIAN PITOT ALVAREZ
Jefe de Boterio
LID - UPCH
C.M.V. 8885

Av. Honorio Delgado 430, Lima 31. Apartado postal 4314, Lima 100
Teléfono: (511) 319-0000 anexo: 2710