

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



“Determinación del efecto de la *Brassica olerácea L.* (brócoli) sobre la hepatotoxicidad inducida con paracetamol en animales de experimentación, Arequipa 2013.”

Tesis presentada por las Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

CUARESMA ALARCON EDITH MILAGROS

LIZÁRRAGA RAMOS ELIENNTY STEFANNY

Para optar el Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

ASESOR: JOSE VILLANUEVA SALAS, Ph. D

AREQUIPA-PERÚ

2016

DEDICATORIA

Dedicado a nuestro creador Jehová por darnos lo más sagrado que tenemos: la vida. Además por permitirnos alcanzar nuestras metas y darnos las fuerzas necesarias para sobrellevar las vicisitudes de nuestra vida.

A mis padres Dora y Silvestre quienes supieron enseñarme a perseverar, a saber cómo actuar en cada situación y no desfallecer en el camino así también por su paciencia y apoyo infinito.

A mis hermanos por acompañarme a lo largo de mi carrera, por darme

palabras de aliento en los momentos que fueron necesarios y por ser testigos de este logro profesional.

A mi querido esposo, Christian por enseñarme a querer a una persona por sus virtudes pero amarla por sus defectos y por ser uno de mis grandes motivos a seguir adelante.

A mi pequeño Thiago que ya es parte muy importante de mi vida y que se lleva todo mi amor y cariño.

Edith Milagros

Dedicado a Dios por la oportunidad de permitirnos alcanzar nuestros sueños y ser nuestro pilar en todos los momentos de nuestra vida y a quien debemos mucho el solo hecho de estar aquí presentándonos ante un reto que nos da la vida.

A Mamá Aurora, papá Justino y Mami Dionisia por sus buenos deseos y por todos esos hermosos recuerdos y sacrificios por hacerme cada día una persona de bien.

A mis Tías Denisse, Maribel y Roxana por enseñarme tanto y también por pasar esas amanecidas conmigo ayudándome y apoyándome en todo este proceso muy importante para mí donde logro desarrollarme profesionalmente.

A mis padres Ruth y Fernando quienes supieron enseñarme a tener paciencia, a confiar, a trabajar duro, por todos sus consejos y por su infinito apoyo a lo largo de mi vida.

A mi hermano Derly por su apoyo constante.

A mi Papá Jesús Lizárraga, por apoyarme y brindarme su ayuda en los momentos de dificultades que se me presentaron en la universidad.

A ti Elvis porque en ti encontré un verdadero amigo y por ser muy atento, amable y convertirme en un apoyo para mí en los momentos más difíciles y sin querer te convertiste en una de las personas más importantes en mi vida.

Prem Ratan Dhan Payo...

Eliennth Stefanny

AGRADECIMIENTOS

A nuestro querido Asesor José Villanueva, que nos acompañó a lo largo de nuestra formación, por sus consejos y su paciencia en las dificultades que a veces se nos presentaron a lo largo del desarrollo de este proyecto, ha logrado contribuir en mayor grado a lo que hoy somos como personas y como futuros profesionales.

A nuestros docentes y amigos Jeaneth y Stamber por su apoyo constante y guía en cada paso del desarrollo y la culminación de nuestro proyecto.

A nuestros amigos Elvis y Derly que siempre en las dificultades nos han podido apoyar constantemente, enseñándonos y explicándonos los problemas que se nos ha presentado en la realización de nuestro proyecto.

A nuestra amiga Viviana que fue la iniciadora de este proyecto y permitarnos poder realizarlo y culminarlo.

A la Dra. Gaby, Dr. Fernando y la Dra. Mocita por el apoyo constante en nuestro proyecto de investigaciones.

A la Señora Ada encargada del laboratorio quien siempre nos brindó los materiales y reactivos para desarrollar nuestro proyecto.

RESUMEN

En el presente trabajo se investigó el efecto de la *Brassica olerácea L.* sobre las enzimas hepáticas en la intoxicación aguda experimental en *Rattus norvegicus* de variedad Wistar, durante 7 y 14 días, para lo cual se utilizó 35 ratas, las cuales fueron divididas en 5 grupos de 7 animales cada uno, como se menciona a continuación: Grupo 1, denominado grupo paracetamol al cual se le administró una suspensión de 1000 mg/kg de peso de paracetamol; grupo 2, denominado grupo agua, el cual solo recibió agua y alimento *ad libitum*; grupo 3, denominado grupo brócoli el cual recibió una dosis de 1000 mg/kg de peso de brócoli liofilizado; grupo 4, grupo experimental 1 (pre-tratamiento) al cual se le administró primero una suspensión de brócoli liofilizado a una dosis de 1000 mg/kg de peso y luego los siete días posteriores se le administró una suspensión de paracetamol a dosis de 1000 mg/kg de peso; grupo 5, experimental 2 (post-tratamiento) al se le administró primero la suspensión de paracetamol a una dosis de 1000 mg/kg de peso para posteriormente administrar la suspensión de brócoli liofilizado a una dosis de 1000 mg/kg de peso.

Previamente todos los grupos experimentales mencionados fueron aclimatados durante una semana para su posterior tratamiento. La suspensión liofilizada de *Brassica olerácea L.* y la suspensión de paracetamol se administraron por vía orogástrica.

Posteriormente se determinó el contenido de sulforafano, molécula responsable del efecto antioxidante y desintoxicante en el organismo, que deriva de la glucorafanina, principal glucosinolato del brócoli, metabolizada en el organismo. Para determinar la concentración de sulforafano se empleó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), donde se encontró que la cantidad de sulforafano en la muestra de brócoli liofilizado fue de 297.5 mg/kg de brócoli.

El efecto antioxidante y desintoxicante del brócoli se evaluó considerando los siguientes parámetros bioquímicos: fosfatasa alcalina y las enzimas transaminasas mediante un método espectrofotométrico a los días 0, 7 y 14 en los 5 grupos de estudio. Las pruebas estadísticas empleadas a fin de comprobar si existen una diferencia ($p < 0.005$) entre grupos fueron ANOVA, la prueba de múltiples rangos LSD para ver la diferencia entre grupos y la prueba de t-students a fin de determinar el probable efecto preventivo o curativo (grupo 4 y 5)

La suspensión de *Brassica olerácea L.* a dosis de 1000 mg/kg/día produjo una disminución significativa en los niveles de las enzimas: transaminasa glutámico oxalacética (TGO), transaminasa glutámico pirúvico (TGP) y fosfatasa alcalina (FA), y las pruebas estadísticas sugieren que existe una diferencia significativa entre los tratamientos del grupo experimental I (pre-ingestión) y el grupo experimental II (post-ingestión) a lo largo de catorce días de experimentación.

Por tanto es posible concluir que el sulforafano presente en el brócoli liofilizado como metabolito secundario derivado de la hidrólisis de glucorafanina en dosis de 0.074 mg/250 g de peso de animal de experimentación durante 7 días de post-ingestión, disminuye los niveles de las enzimas hepáticas significativamente luego de una intoxicación aguda con una dosis de 1000 mg/Kg de peso de paracetamol.

Palabras clave: *Brassica olerácea L.*, enzimas hepáticas, TGP, TGO y FA, sulforafano, enzimas de fase II.

ABSTRACT

In this paper the effect of *Brassica oleracea L.* on liver enzymes in experimental acute intoxication of *Rattus norvegicus* Wistar strain is investigated for 7 and 14 days, for which 35 rats were used, which were divided into 5 groups of 7 animals each, as mentioned below: Group 1, designated acetaminophen group that was administered a suspension of 1000 mg / kg of acetaminophen; Group 2, called water group, which only received food and water ad libitum; Group 3, called broccoli group which received a dose of 1000 mg / kg of freeze-dried broccoli; Group 4, experimental group 1 (pre-treatment) which was administered first a suspension of lyophilized broccoli at a dose of 1000 mg / kg and after seven days after suspension was administered a dose of acetaminophen 1000 mg / kg; Group 5, experimental 2 (post-treatment) was administered first to the suspension of acetaminophen at a dose of 1000 mg / kg for administering the suspension subsequently lyophilized broccoli at a dose of 1000 mg / kg.

All previously mentioned experimental groups were acclimated for one week for subsequent processing. The lyophilized *Brassica oleracea L.* suspension and the suspension of acetaminophen were administered orogastric.

Subsequently the content of sulforaphane, a molecule responsible for the antioxidant and detoxifying effect on the body, which derives from the glucoraphanin main glucosinolate broccoli, metabolized in the body is determined. To determine the concentration of sulforaphane a liquid chromatograph (HPLC), where it was found that the amount of sulforaphane in broccoli lyophilized sample was 297.5 mg / kg of broccoli was used.

The antioxidant and detoxifying effect of broccoli was evaluated considering the following biochemical parameters: alkaline phosphatase and transaminase enzymes by spectrophotometric method at days 0, 7 and 14 in the 5 study groups. The statistical tests used to check for a difference ($p < 0.005$) between groups were ANOVA, the LSD

multiple range test to see the difference between groups and students t-test to determine the preventive effect or likely healing (group 4 and 5)

The suspension of *Brassica oleracea L.* at doses of 1000 mg / kg / day produced a significant decrease in the levels of the enzymes glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT) and alkaline phosphatase (AP), and testing Statistics suggest a significant difference between treatments in the experimental group I (pre-ingestion) and the experimental group II (post-ingestion) over fourteen days of experimentation.

Therefore one can conclude that the present in the lyophilized broccoli sulforaphane as secondary metabolite derived from the hydrolysis of glucoraphanin in doses of 0.074 mg / 250 g body weight of experimental animals for 7 days post-ingestion, decreased levels of enzymes liver significantly after acute poisoning with a dose of 1000 mg / kg body weight of acetaminophen.

Key words: *Brassica oleracea L.*, liver enzymes, SGOT, SGPT and FA, sulforaphane, phase II enzymes.

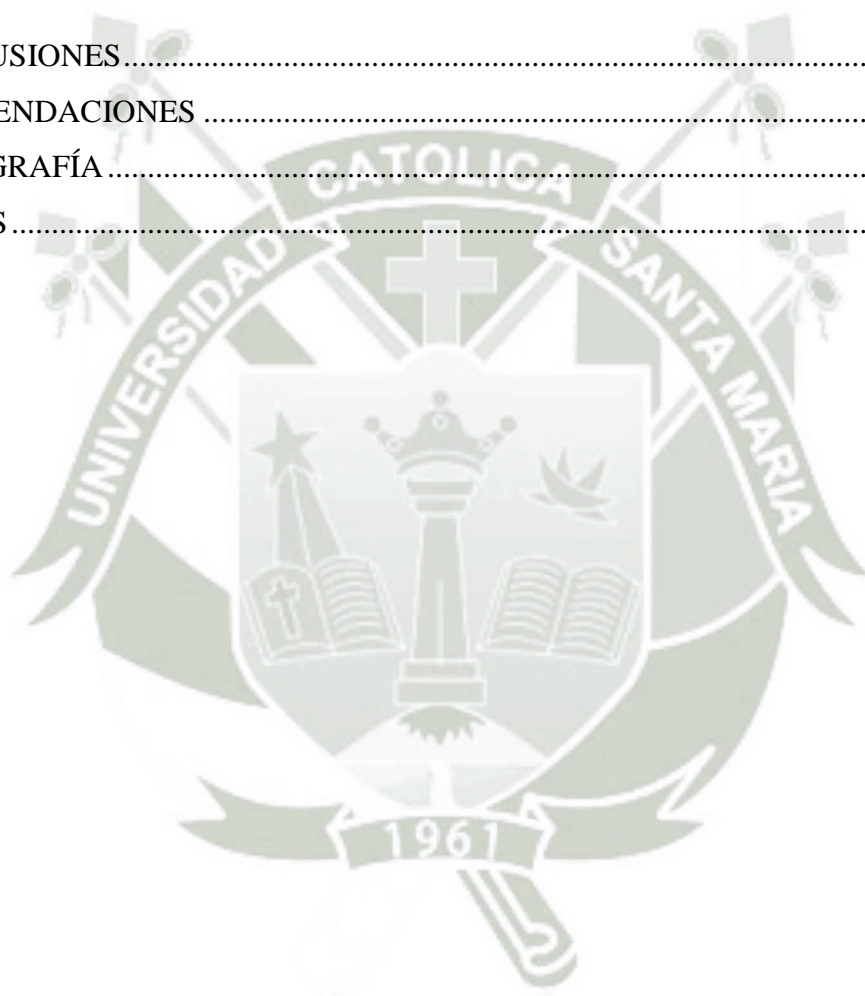
ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE GENERAL.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
INTRODUCCIÓN.....	11
OBJETIVOS.....	13
HIPÓTESIS.....	14
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	15
1.1. <i>Brassica oleracea</i> L. (Brócoli).....	15
1.1.1. Descripción General.....	15
1.1.2. Clasificación taxonómica:.....	18
1.1.3. Composición Química.....	18
1.1.4. Farmacognosia.....	21
1.1.5. Usos y Propiedades.....	23
1.2. Anatomía y fisiología del hígado.....	24
1.2.1. Anatomía del hígado.....	25
1.2.2. Anatomía macroscópica.....	25
1.2.3. Anatomía microscópica.....	26
1.2.4. Fisiología celular del hígado.....	28
1.2.5. Funciones del hígado.....	32
1.2.6. Drogas e hígado.....	32
1.3. Hepatotoxicidad por drogas.....	36
1.4. Anatomía patológica del hígado.....	37
1.4.1. Hepatitis.....	37
1.5. Pruebas de función hepática.....	39

1.6. Paracetamol.....	39
1.6.1. Características	39
1.6.2. Contraindicaciones	40
1.6.3. Mecanismo de acción	41
1.6.4. Propiedades farmacocinéticas	41
1.6.5. Propiedades Farmacodinámicas	43
1.6.6. Mecanismo de toxicidad.....	43
1.6.7. Evolución clínica.....	44
1.6.8. Reacciones adversas.....	46
1.7. Liofilización	47
1.7.1. Principios físicos de la liofilización	47
1.7.2. Ventajas de la liofilización	48
1.7.3. Desventajas de la liofilización.....	49
1.8. Extracción en fase sólida.....	49
1.8.1. Columnas de extracción	50
1.8.2. El proceso de extracción	50
1.8.3. Metodología para la extracción	51
1.9. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	52
CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS	54
2.1. Material biológico	54
2.1.1. <i>Brassica oleracea L.</i> (Brócoli).....	54
2.1.2. Animales de Experimentación	54
2.1.2.1. División de grupos experimentales	55
2.2. Material de laboratorio.....	57
2.3. Equipos.....	57
2.4. Reactivos	57
2.5. Otros.....	58
2.6. Métodos.....	58
2.6.1. Liofilización del material vegetal.....	58
2.6.2. Extracción del sulforafano a partir del glucosinolato-glucorafanina con diclorometano.....	59

2.6.3. Purificación en columna SPE.....	59
2.6.4. Identificación y cuantificación del sulforafano extraído del liofilizado de brócoli a partir del glucosinolato glucorafanina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	60
2.6.5. Determinación de la linealidad.....	60
2.6.6. Determinación de la sensibilidad	61
2.6.7. Determinación de transaminasas en muestra de suero sanguíneo.....	63
2.6.7.1. Determinación de transaminasa glutámico oxalacética (TGO)....	63
2.6.7.2. Determinación de transaminasa glutámico pirúvica (TGP)	64
2.6.7.3. Determinación de fosfatasa alcalina (FA).....	64
2.7. Obtención de muestra.....	66
2.8. Etapa de experimentación	66
2.8.1. Aclimatación	66
2.8.2. Descripción de la prueba piloto para la administración de la suspensión de paracetamol y la suspensión de brócoli liofilizado en animales de experimentación.	66
2.9. Métodos estadísticos	67
2.9.1. Parámetros de distribución Central	67
2.9.2. Pruebas de significancia	68
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	60
3.1. Obtención del liofilizado de <i>Brassica olerácea</i> L. (Brócoli).....	60
3.2. Extracción de sulforafano en brócoli liofilizado.....	61
3.3. Determinación de sulforafano por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	61
3.4. Linealidad.....	62
3.5. Sensibilidad.....	63
3.6. Determinación de sulforafano presente en brócoli liofilizado por cromatografía líquida de alta resolución(HPLC).....	64
3.7. Prueba piloto para la determinación de la dosis de <i>Brassica olerácea</i> L. (Brócoli) administrado a los animales de experimentación.....	65
3.8. Evaluación estadística de las enzimas hepáticas de la prueba piloto para determinar la dosis adecuada de brócoli liofilizado.....	72
3.8.1. Transaminasa glutámico pirúvica (TGP)	72

3.8.2. Transaminasa glutámico oxalacética (TGO).....	74
3.8.3. Fosfatasa alcalina	76
3.9. Estudio del comportamiento de las enzimas hepáticas en animales de experimentación por intoxicación aguda con paracetamol y tratamiento con brócoli liofilizado	78
3.9.1. Transaminasa glutámico pirúvica (TGP)	78
3.9.2. Transaminasa glutámico oxalacética (TGO).....	87
3.9.3. Fosfatasa Alcalina (FA)	95
CONCLUSIONES.....	104
RECOMENDACIONES	105
BIBLIOGRAFÍA	106
ANEXOS.....	116



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1:	Clasificación taxonómica del brócoli ¹¹	18
Tabla N° 2:	Compuestos y elementos presentes en <i>Brassica oleracea</i> L. (Brócoli) ¹⁴	19
Tabla N° 3:	Principales diferencias entre glucosinolatos e Isotiocianatos ¹⁷	22
Tabla N° 4:	Valores normales de flujo venoso en torno al hígado. ³⁶	31
Tabla N° 5:	Reacciones adversas del paracetamol. ⁶³	46
Tabla N° 6:	Distribución de los grupos experimentales y tratamiento.....	55
Tabla N° 7:	Procedimiento para determinar fosfatasa alcalina	65
Tabla N° 8:	Fórmulas de análisis de varianza (ANOVA).	68
Tabla N° 9:	Promedio de las áreas de sulforafano.....	62
Tabla N° 10:	Áreas y concentraciones de sulforafano en extracto de brócoli liofilizado	64
Tabla N° 11:	Análisis de TGP, TGO y FA basal y con tratamiento de brócoli liofilizado a dosis de 500 mg/Kg.....	66
Tabla N° 12:	Variación de las enzimas TGP, TGO y FA con tratamiento de brócoli liofilizado a dosis de 500 mg/Kg.....	68
Tabla N° 13:	Análisis de TGP, TGO y FA basal y con tratamiento de brócoli liofilizado a dosis de 1000 mg/Kg.....	69
Tabla N° 14:	Variación de las enzimas TGP, TGO y FA basal y con tratamiento de brócoli liofilizado a dosis de 1000 mg/Kg.....	71
Tabla N° 15:	Diferencias en los valores de la enzima TGP a dosis de 500 y 1000 mg/Kg de brócoli.	73

Tabla N° 16: Diferencias en los valores de la enzima TGO a dosis de 500 y 1000 mg/Kg de brócoli.	75
Tabla N° 17: Diferencias en los valores de la enzima FA a dosis de 500 y 1000 mg/Kg de brócoli.	77
Tabla N° 18: Efecto de <i>Brassica olerácea</i> L. (Brócoli) sobre los niveles de TGP en ratas de experimentación basal y a los siete días.....	79
Tabla N° 19: Análisis de varianza de las diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima TGP en los grupos de estudio.	83
Tabla N° 20: Prueba de Múltiples rangos mediante LSD para las diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima TGP en los grupos de estudio	85
Tabla N° 21: Comparaciones entre las diferencias reportadas a los siete días y a los 14 días para cada enzima hepática en el grupo experimental 1 (pre-tratamiento).	85
Tabla N° 22: Comparaciones entre las diferencias reportadas a los siete días y a los 14 días para cada enzima hepática en el grupo experimental 2 (post-tratamiento).....	86
Tabla N° 23: Efecto de <i>Brassica olerácea</i> L. (Brócoli) sobre los niveles de TGO en ratas de experimentación basal y a los siete días.	87
Tabla N° 24: Análisis de varianza de las diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima TGO en los grupos de estudio.	90
Tabla N° 25: Prueba de Múltiples rangos mediante LSD para las diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima TGO en los grupos de estudio.....	92

Tabla N° 26: Comparaciones entre las diferencias reportadas a los siete días y a los 14 días para cada enzima hepática en el grupo experimental 1 (pre-tratamiento).	93
Tabla N° 27: Comparaciones entre las diferencias reportadas a los siete días y a los 14 días para cada enzima hepática en el grupo experimental 2 (post-tratamiento).....	94
Tabla N° 28: Efecto de <i>Brassica olerácea</i> L. (Brócoli) sobre los niveles de FA en ratas de experimentación basal y a los siete días.	96
Tabla N° 29: Análisis de varianza de las diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima FA en los grupos experimentales.....	98
Tabla N° 30: Prueba de Múltiples rangos mediante LSD para las diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima FA en los grupos de estudio.....	100
Tabla N° 31: Comparaciones entre las diferencias reportadas a los siete días y a los 14 días para cada enzima hepática en el grupo experimental 1. (pre-tratamiento)	101
Tabla N° 32: Comparaciones entre las diferencias reportadas a los siete días y a los 14 días para cada enzima hepática en el grupo experimental 2 (post-tratamiento).....	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: <i>Brassica olerácea L.</i> (Brócoli).....	15
Figura N° 2: Hojas de <i>Brassica olerácea L.</i>	16
Figura N° 3: Pella de <i>Brassica olerácea L.</i>	17
Figura N° 4: Inflorescencia de <i>Brassica olerácea L.</i>	17
Figura N° 5: Conversión de glucosinolatos a isotiocianatos.	21
Figura N° 6: Estructura química del compuesto sulforafano.....	22
Figura N° 7: Esquema general de la inducción de enzimas fase II por sulforafano	24
Figura N° 8: La cara diafragmática del hígado es convexa, extensa y relativamente lisa.	25
Figura N° 9: Anatomía Macroscópica del Hígado.....	26
Figura N° 10: Hígado teñido con tricrómico de Masson: la flecha mayor señala una sinusoides, la menor corresponde a un hepatocito.....	29
Figura N° 11: Farmacocinética y distribución de los fármacos.....	35
Figura N° 12: Estructura del paracetamol.....	40
Figura N° 13: Biotransformación del paracetamol a dosis normal.....	42
Figura N° 14: Mecanismo de Toxicidad del paracetamol.	44
Figura N° 15: Diagrama de fases del proceso de liofilización.....	47
Figura N° 16: Preparación de la curva de calibración.	61
Figura N° 17: Cromatograma de muestra con estándar de sulforafano (30ppm) y estándar de sulforafano (30 ppm) solamente, superpuestas.	61
Figura N° 18: Gráfico de Calibración correspondiente sulforafano	62
Figura N° 19: Valores promedio de TGP, TGO y FA basales y con tratamiento de brócoli a dosis de 500 mg/Kg	67

Figura N° 20: Diagrama de caja y bigotes de los valores promedio de la variación de las enzimas TGP, TGO y FA con tratamiento de brócoli a dosis de 500 mg/Kg	69
Figura N° 21: Valores promedio de TGP, TGO y FA basales y con tratamiento de brócoli liofilizado a dosis de 1000 mg/Kg.....	70
Figura N° 22: Diagrama de caja y bigotes de los valores promedio de la variación de las enzimas TGP, TGO y FA con tratamiento de brócoli a dosis de 1000 mg/Kg	71
Figura N° 23: Diagrama de caja y bigotes de las diferencias producidas en los valores de la enzima TGP por dosis de 500mg/kg y 1000 mg/kg.	73
Figura N° 24: Diagrama de caja y bigotes de las diferencias producidas en los valores de la enzima TGO por dosis de 500mg/kg y 1000 mg/kg.	75
Figura N° 25: Diagrama de caja y bigotes de las diferencias producidas en los valores de la enzima FA por dosis de 500mg/kg y 1000 mg/kg.	77
Figura N° 26: Valor promedio de la enzima TGP de las concentraciones basales y a los siete días de tratamiento.....	80
Figura N° 27: Valor promedio de la enzima TGP de las concentraciones basales, a los siete y catorce días de tratamiento para los grupos experimentales 1 y 2.	82
Figura N° 28: Diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima TGP en los grupos de estudio.....	84
Figura N° 29: Valor promedio de la enzima TGO de las concentraciones basales y a los siete días de tratamiento.....	88
Figura N° 30: Valor promedio de la enzima TGO de las concentraciones basales, a los siete y catorce días de tratamiento para los grupos experimentales 1 y 2.	90

Figura N° 31: Diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima TGO en los grupos de estudio.	91
Figura N° 32: Valor promedio de la enzima FA de las concentraciones basales y a los siete de tratamiento	96
Figura N° 33: Valor promedio de la enzima FA de las concentraciones basales, a los siete y catorce días de tratamiento para los grupos experimentales 1 y 2.	98
Figura N° 34: Diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima FA en los grupos de estudio.	99



INTRODUCCIÓN

Actualmente el paracetamol ha sido objeto en diversos estudios científicos comprobando propiedades tóxicas en el hepatocito, causado por los radicales libres, siendo por esta razón a la cual nos enfocaremos a estudiar las propiedades antioxidantes del brócoli y efectos sobre la función hepática, ya que siendo el paracetamol un fármaco con propiedades analgésicas y muy utilizado frecuentemente en una serie de productos contra el resfriado común y diversas patologías del dolor. Por otra parte se ve una amplia disponibilidad por parte de la población al adquirirlo sin receta y a su bajo precio, han dado como resultado al uso prolongado (más de una semana), lo que lleva a un desconocimiento de sus principales reacciones adversas ya que en dosis indicadas no afecta a la mucosa gástrica ni la coagulación sanguínea o a los riñones, pero sí afecta al hígado severamente.^{1,2}

El brócoli (*Brassica oleracea L.*), es una planta que contiene cantidades altas de vitamina C, flavonoides y beta-caroteno que son antioxidantes.^{3,4} También el brócoli es rico en glucosinolatos especialmente glucorafanina que al ser degradado por la enzima mirosinasa se obtiene el sulforafano, pues éste influye de una forma muy favorable sobre las enzimas hepáticas de la fase II, que tienen un papel muy importante en el sistema de desintoxicación hepática.¹⁹

Siendo el brócoli la principal fuente natural del isotiocianato, sulforafano, su precursor glucorafanina constituye del 50 al 80 % de los glucosinolatos totales presentes en este vegetal.⁵ Por lo que últimamente se ha recomendado incluir una mayor cantidad de productos vegetales en la dieta y disminuir los productos animales con la perspectiva de mejorar las condiciones de salud del organismo.⁶

Por lo tanto, en el presente trabajo de investigación nos proponemos evaluar el efecto de la *Brassica oleracea L.* sobre la hepatotoxicidad inducida con paracetamol en animales de experimentación sobre las enzimas hepáticas de los grupos experimentales para lo cual se determina cuantitativamente el contenido de sulforafano presente en pellas y tallos secundarios de brócoli liofilizado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

(HPLC), usando un estándar de sulforafano a partir del glucosinolato, glucorafanina que está presente en el brócoli.^{7,8}



OBJETIVOS

1. Evaluar el efecto de la *Brassica olerácea L.* (brócoli) liofilizado, en la actividad de las enzimas hepáticas (TGP, TGO y FA) en animales experimentales con hepatotoxicidad inducida.
2. Determinar la dosis adecuada de *Brassica olerácea L.* (brócoli) liofilizado que disminuye las enzimas hepáticas en estudio contra la hepatotoxicidad inducida en animales de experimentación, mediante una prueba piloto.
3. Determinar el efecto del sulforafano a través del consumo de *Brassica olerácea L.* (brócoli) liofilizada, en el pre-tratamiento y post-tratamiento de la toxicidad hepática aguda inducida en animales de experimentación.
4. Determinar la cantidad de sulforafano requerido para el tratamiento de la hepatotoxicidad aguda experimental presente en la *Brassica olerácea L.* (brócoli) liofilizada.
5. Determinar el rendimiento de la *Brassica olerácea L.* (brócoli) de pellas y tallos secundarios liofilizados.
6. Determinar cuantitativamente el contenido de sulforafano en la *Brassica olerácea L.* (brócoli) liofilizado mediante cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC).

HIPÓTESIS

Se sabe que la medicina tradicional le atribuye a la *Brassica olerácea L.* (Brócoli) propiedades benéficas en el funcionamiento del hígado, es probable que el liofilizado de la *Brassica olerácea L.* (brócoli), tenga efectos positivos sobre la actividad de las enzimas hepáticas.



CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. *Brassica oleracea* L. (Brócoli).

1.1.1. Descripción General

El brócoli es una planta anual, de hábito y crecimiento erecto, con una altura entre 60 a 90 cm, y termina en una masa de yemas funcionales (**Figura N° 1**). Esta necesita vernalización para producir el vástago floral. La parte comestible es una masa densa de yemas florales de color verde grisáceo o morado, que puede alcanzar un diámetro de 20 a 35 cm, dependiendo del cultivo.^{9,10}



Figura N° 1: *Brassica oleracea* L. (Brócoli).^{9,10}

Raíces

Bolaños (2001), describe que poseen una raíz pivotante de la que parte una cabellera ramificada y superficial de raíces. Así mismo, señala que las plantas jóvenes presentan una raíz principal, bien diferenciada, posteriormente hay formación de raíces adventicias lo cual favorece el pegamento de las plantas en trasplante, en general el sistema radicular sería pivotante con raicillas adventicias secundarias.^{9,10} Por lo tanto, son ramificadas, profundas, extendiéndose alrededor del tallo de 45 a 60 cm.

Tallos

Son herbáceos, cilíndricos; el tallo principales relativamente grueso (3 a 6 cm diámetro), de 20 a 50 cm de alto, sobre el cual se disponen las hojas en forma helicoidal, con entrenudos cortos.^{9,10}

Hojas

Son de color verde oscuro, rizado, usualmente alterno, simple o compuesto, entero a variadamente lobuladas o dentadas, sin estipulas, cerosas y a distancias cortas, formando entrenudos cortos, lo que permite una forma de roseta.^{9,10}

Las hojas del brócoli se disponen en forma helicoidal, son de tamaño grande, de hasta 50 cm de longitud y 30 cm de ancho, y varían en número, de 15 a 30, según el cultivo. En la base de la hoja puede dejar a ambos lados del pecíolo pequeños fragmentos de lámina foliar a modo de foliolos, con ligerísimas espículas (**Figura N° 2**).



Figura N° 2: Hojas de *Brassica oleracea* L.^{9,10}

Cabeza o pella

Es la parte comestible de la planta la cual es una masa densa de yemas florales de color verde grisáceo o morado, que puede alcanzar un diámetro de 20 a 35 cm; dependiendo del cultivo. Sin embargo las cabezas de los rebrotes solamente alcanzan 10 cm.^{8,9}

El grado de compactación es menor, presentando pellas más abiertas y no está cubierta por hojas, es de menor tamaño y esta sobre un tallo floral más largo (**Figura N° 3**).



Figura N° 3: Pella de *Brassica oleracea* L. ^{9,10}

Inflorescencia

Gil (2000), indica que a diferencia de la coliflor, el brócoli presenta la inflorescencia, que es por lo natural mayor en el centro y más pequeñas en los laterales. Las yemas están unidas en racimos no recubiertos con hojas, presenta cabezas laterales, que son de colores verde oscuro, ligeramente azulado, aunque también se puede encontrar de otros colores y dependiendo la variedad pueden ser compactas o ligeramente compactas. ^{9, 10} Las flores son de color amarillo sobre inflorescencias racimosas de polinización alógama (Figura N° 4).



Figura N° 4: Inflorescencia de *Brassicaoleracea*L. ^{9,10}

Fruto

Es una silicua (pequeña vaina) de color verde oscuro cenizo, que mide en promedio de 3 a 4 cm. y que contiene de tres a ocho semillas por silicua. ^{9,10}

Semillas

Maroto (2001), indica que las semillas son de color pardusco; en un gramo pueden existir de 250 a 300 semillas, dependiendo del cultivo, con una capacidad germinativa de cuatro años. Las semillas contenidas en el interior del fruto son liberadas al medio al

momento de su madurez, son pequeñas, redondas tienen forma de munición con un diámetro que se encuentra cerca de 2mm.^{9,10}

1.1.2. Clasificación taxonómica:

Tabla N° 1: Clasificación taxonómica del brócoli¹¹

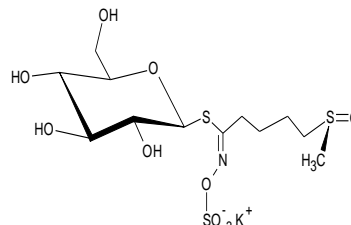
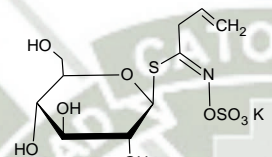
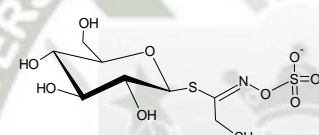
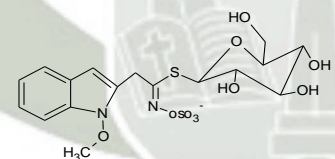
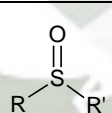
REINO:	Vegetal
SUBREINO:	Fanerógama
DIVISION:	Spermatophytas
SUBDIVISION:	Angiosperma
CLASE:	Dicotiledónea
SUBCLASE :	Arquiclamídea
ORDEN:	Rhoedales
FAMILIA:	Cruciferae
GENERO:	Brassica
ESPECIE :	Olerácea L.

1.1.3. Composición Química

El brócoli es la principal fuente natural del isotiocianato, sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano), su precursor glucorafanina constituye más del 80 % de los glucosinolatos totales presentes en este vegetal.⁸ Las prácticas de cultivo, condiciones de almacenamiento y la preparación del alimento tienen un impacto potencial en el contenido de glucosinolatos.

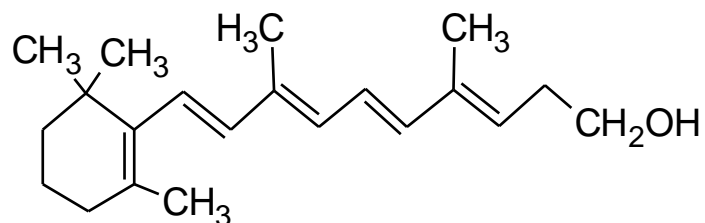
La *Brassica olerácea L.* (brócoli) es muy utilizada ya que es una fuente concentrada de vitaminas, minerales, fibra y sustancias fitoquímicas nutritivas, como por ejemplo compuestos azufrados, los cuales en un trabajo pionero de Wattenberg (1977) se identificaron en las crucíferas que entre sus principales aplicaciones; es la protección contra el cáncer y propiedades antioxidantes.¹² En la **Tabla N°. 2**, se ilustra la composición del brócoli:¹³

Tabla N° 2: Compuestos y elementos presentes en *Brassica oleracea* L. (Brócoli) ¹⁴

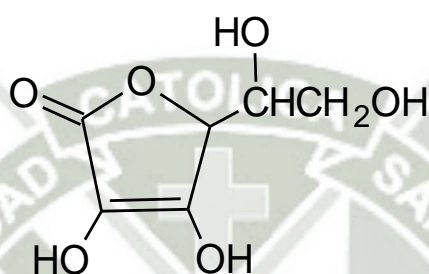
Componente	Precursor 1	Metabolito	Beneficios para la salud
Glucosinolatos	Glucorafanina: 	<u>Isotiocianatos:</u> $R-N=C=S$	En brócoli se aisló el isotiocianato, sulforafano, que es un potente inhibidor de tumores y posee propiedades antioxidantes.
	Sinigrina: 	<u>Isotiocianatos:</u> $R-N=C=S$	Pueden proporcionar protección contra los agentes químicos inductores del cáncer.
	Glucobrasicina: 	<u>Isotiocianatos:</u> $R-N=C=S$	Previene el cáncer en general, también se ha determinado que son protectores de cánceres inducidos por hormonas.
	Neoglucobrasicina: 	<u>Isotiocianatos:</u> $R-N=C=S$	
Sulfoxidos		S-metilcisteín sulfóxido	Inhiben la mutagénesis inducida químicamente y por radiación UV.
Vitamina		Vitamina A, C, Tiamina, Niacina y Rivo flavina	Las vitaminas A y C se ha demostrado que poseen propiedades anticancerígenas.
Minerales		Potasio, Magnesio, Hierro, zinc, fosforo y Calcio.	Ayudan en el crecimiento y fortalecimiento de huesos y dientes sanos.

Del cuadro anterior se puede extraer las fórmulas de las principales vitaminas presentes en el brócoli:

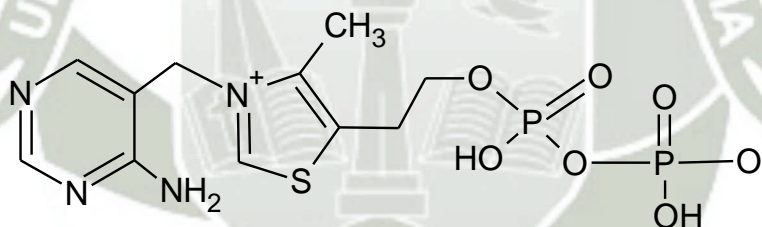
Retinol (Vitamina A):



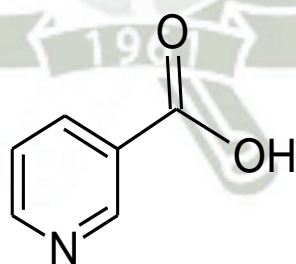
Ácido Ascórbico (Vitamina C):



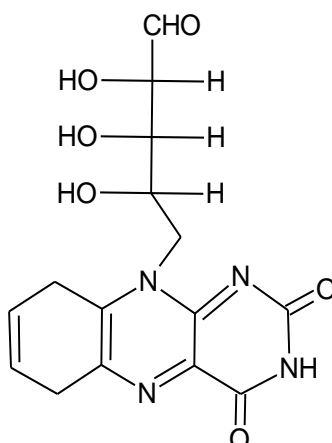
Tiamina (Vitamina B₁):



Niacina:



Riboflavina:



1.1.4. Farmacognosia

Los glucosinolatos son compuestos de origen vegetal y cuyos productos catabólicos son los isotiocianatos, un ejemplo de estos productos es el sulforafano. El sulforafano es un isotiocianato con propiedades antimicrobianas, antioxidantes y anticancerígenas.¹⁴ Este es sintetizado a partir de un precursor, glucorafanina (**Figura N° 5**), encontrado en vegetales crucíferos del genero Brassica, como la coliflor, brócoli, col rizada, repollo y coles de Bruselas. Además se encuentran también en mostaza, berro y rábano .¹⁵

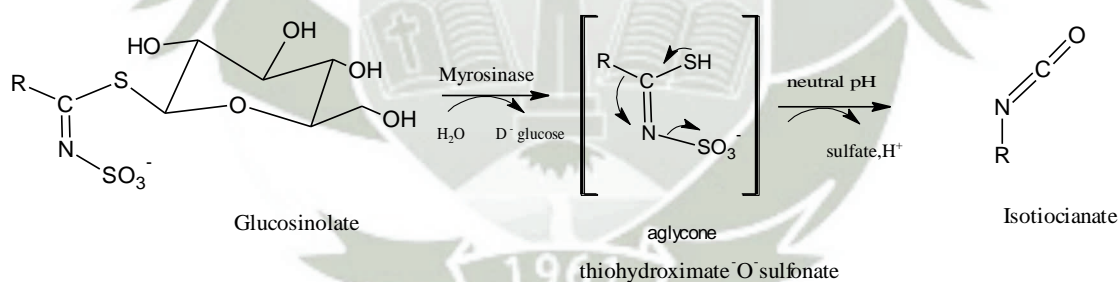


Figura N° 5: Conversión de glucosinolatos a isotiocianatos.¹³

Se han identificado más de 100 compuestos diferentes en plantas, sin embargo su concentración depende del tipo de tejido que tiene el vegetal. Los glucosinolatos se clasifican como S- glucósidos, ya que estos son el resultado de la unión entre un azúcar reductor y el azufre, también conocida como aglucona, por los que estos compuestos son no volátiles y no tienen olor.¹⁴ Por otra parte, los glucosinolatos se sintetizan y almacenan normalmente en las plantas como precursores estables de los isotiocianatos, específicamente en las vacuolas. Sin embargo, los glucosinolatos son solubles en agua

debido a que la molécula de glucosa imparte característica hidrofílica a diferencia de los isotiocianatos que presentan propiedades hidrofóbicas.¹⁶

Tabla N° 3: Principales diferencias entre glucosinolatos e Isotiocianatos¹⁷

GLUCOSINOLATOS	ISOTIOCIANATOS
Solubles en agua	No Solubles en agua
Estables a altas temperaturas	Sensibles al calor
No reactivos	Reactivos

El sulforafano, de acuerdo a la IUPAC su nombre oficial es 1-isotiocianato-4-metilsulfenilbutano y su fórmula molecular es $C_6H_{11}NOS_2$. También se sabe que tiene un peso molecular de 177.29 g/mol.¹⁸ (Ver Figura N° 6).

Este compuesto organosulfurado es ampliamente conocido como anticancerígeno, aunque se ha descubierto que también posee actividad antioxidante y antiinflamatoria.

La función del sulforafano consiste en actuar como un químico-protector-deliberado, que incrementa en el cuerpo mecanismos de defensa que reducen la susceptibilidad a carcinógenos y sustancias tóxicas.¹⁹

También actúa de una forma indirecta, estimulando nuestras defensas anticancerígenas y antioxidantes, de esta forma previene la aparición de tumores y la eliminación de sustancias tóxicas, actúa rápidamente con la desintoxicación por electrófilos y la reactividad del oxígeno a los metabolitos que pueden causar la mutagénesis de las células y la neoplasia.²⁰

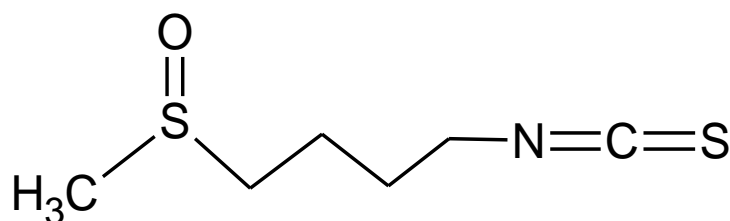


Figura N° 6: Estructura química del compuesto sulforafano¹⁶

1.1.5. Usos y Propiedades

La *Brassica olerácea L.* es un alimento natural utilizado como protector del cáncer o también usado por sus propiedades antioxidantes. Pues en la última década se han realizado estudios demostrando el importante papel de esta crucífera en la prevención de un gran número de tumores, gracias a los isotiocianatos que posee como el sulforafano, proveniente de la glucorafanina presente en brócoli, este compuesto actúa como precursor enzimático, estimulando las defensas anticancerígenas previniendo la formación de sustancias tóxicas, crecimiento y formación de tumores cancerígenos.²¹

En general, los glucosinolatos y sus productos de degradación se consideran componentes potenciales en la defensa de las plantas contra los insectos y los herbívoros (Chen & Andreasson, 2001; Halkier & Du, 1997). Por otra parte, se relacionan con la activación de enzimas de detoxificación de la fase II, tales como glutatión-S-transferasa, y por inhibición de enzimas de la fase I (enzimas del citocromo P₄₅₀), las cuales están involucradas en la activación de carcinógenos químicos y sustancias tóxicas (Li & Kushad, 2004).

Mecanismo de acción

En cuanto al mecanismo de acción, el estudio sistemático de estas fuentes alimentarias de fitoquímicos, indica que estos vegetales contienen unos compuestos naturales que movilizan enzimas implicadas en la detoxificación. Estas enzimas neutralizan los químicos de forma previa para que no produzcan alteraciones en el ADN. El sulforafano es un estimulador potente de las enzimas mencionadas.²²

El mecanismo de acción en las fases iniciales del cáncer, la toxicidad hepática y la inflamación, consiste en la modelación del sistema enzimático fase I y II, que participa en la activación biológica, la eliminación de las sustancias cancerígenas y tóxicas. De este modo el sulforafano elimina las sustancias químicas, tóxicas y cancerígenas y reduce el riesgo de cáncer, toxicidad hepática y la inflamación.²³

Estudios *in vivo* han demostrado que las actividades de enzimas del citocromo como la P₄₅₀ (CYPs), CYP3A4 Y CYP2E1 del hepatocito pueden ser inhibidas por el sulforafano, disminuyendo la producción de carcinógenos y sustancias tóxicas.¹⁶

Además, se ha demostrado que el sulforafano es un potente inductor de las enzimas fase II como de la quinonoreductasa (QR) y la glutatión-S-transferasa (GST) por medio de la separación del complejo Keap1-Nrf2, ya que el sulforafano (SFN) se une a dicho complejo por enlaces disulfuro, lo que ocasiona un cambio conformacional y lleva a la separación del complejo. El Nrf2 (Nuclear response factor 2) viaja al núcleo e induce al elemento de respuesta antioxidante (ARE), que a su vez induce el factor de transcripción de ADN de enzimas fase II que neutralizan los radicales libres y xenobióticos^{24,25} (Figura N°7).

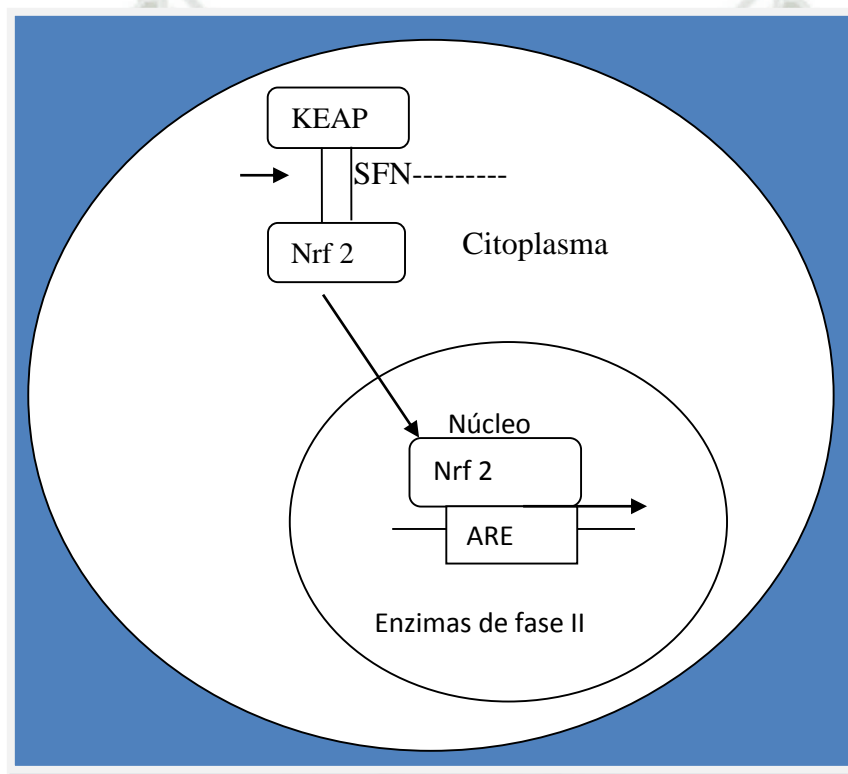


Figura N° 7: Esquema general de la inducción de enzimas fase II por sulforafano²¹

1.2. Anatomía y fisiología del hígado

El hígado es quizá el órgano más impresionante de nuestro organismo, no solo por lo que respecta a su tamaño, sino por la variedad de sus funciones. Por lo tanto es muy importante conocer su anatomía y fisiología para entender fácilmente las patologías que en él se producen.

1.2.1. Anatomía del hígado

El hígado es un órgano intratorácico, situado detrás de las costillas y cartílagos costales, separado de la cavidad pleural y de los pulmones por el diafragma. Localizado en el cuadrante superior de la cavidad abdominal, se proyecta a través de la línea media hacia el cuadrante superior izquierdo.

Tiene la forma de una cuña con la base a la derecha y el ápice a la izquierda, es irregularmente hemisférico con una faz diafragmática que es convexa, extensa y relativamente lisa (**Figura N° 8**), y otra faz visceral que es cóncava y más irregular. La sangre que llega al hígado proviene de dos fuentes: la sangre oxigenada, a través de la Arteria Hepática; y la sangre rica en nutrientes, a través de la Vena porta Hepática.²⁶

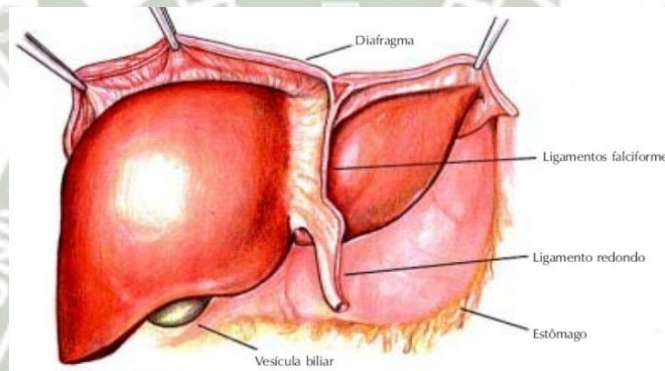


Figura N° 8: La cara diafragmática del hígado es convexa, extensa y relativamente lisa.²⁶

1.2.2. Anatomía macroscópica

El hígado ocupa el hipocondrio derecho y parte del epigastrio e hipocondrio izquierdo. En el adulto tiene un peso cerca de 1200 a 1550 g. y en los niños, es proporcionalmente superior. Por eso, en aquellos muy jóvenes es hasta cierto punto responsable de la protuberancia abdominal.²⁶

Está firmemente adherido al diafragma por el ligamento falciforme que es un pliegue triangular del peritoneo. Está situado debajo del diafragma y suele estar cubierto por las costillas 5-10. Se mueve con la respiración y varía también su posición con cualquier cambio postural que afecte al diafragma ya que está sujeto a la pared abdominal anterior y a la cara inferior del diafragma mediante el ligamento falciforme que es un pliegue del peritoneo y que separa los 2 lóbulos hepáticos, uno derecho y otro izquierdo.²⁷

Presenta 4 caras: anterior, posterior, diafragmática y visceral. La cara diafragmática es lisa y con forma de cúpula. Se amolda a la concavidad del diafragma que la separa de las estructuras intratorácicas. La cara visceral presenta muchas irregularidades. Se relaciona con el estómago, el duodeno, la vesícula biliar y el colon. En ella se encuentra el hilio hepático por el que pasa la arteria hepática, la vena porta, los conductos hepáticos derecho e izquierdo y vasos linfáticos.²⁸

Los dos lóbulos hepáticos están separados funcionalmente (**Figura N° 9**). Cada uno recibe su propio aporte de la arteria hepática y de la vena porta y tiene su propio drenaje venoso.

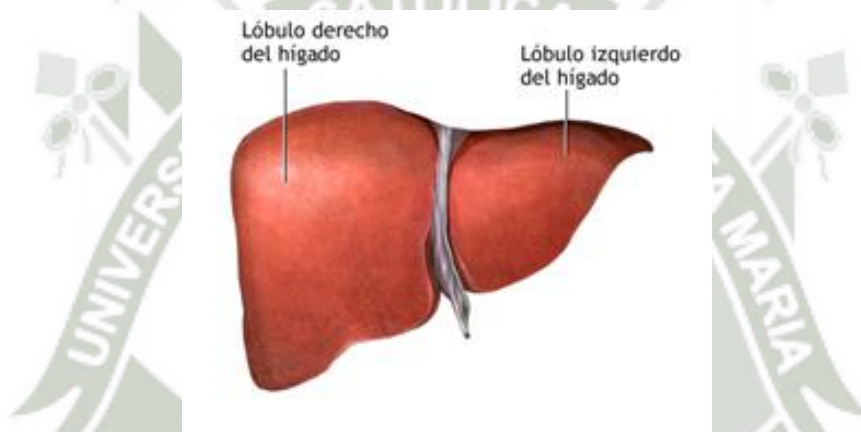


Figura N° 9: Anatomía Macroscópica del Hígado.²⁸

En forma similar, el conducto hepático derecho recoge bilis desde la mitad derecha del hígado y el conducto hepático izquierdo recoge bilis desde la mitad izquierda del hígado.

La distribución de los vasos sanguíneos también forma una base para dividir al hígado en segmentos hepáticos que son quirúrgicamente significativos.²⁸

1.2.3. Anatomía microscópica

El hígado está rodeado por una cápsula fibrosa que en el hilio forma vainas fibrosas alrededor de la vena porta, la arteria hepática y los conductos hepáticos. El parénquima hepático está dispuesto en lobulillos de un diámetro de 1 mm aproximadamente. Cada

lobulillo se compone de dobles láminas de hepatocitos o células hepáticas, separadas entre sí por una red de capilares: los sinusoides hepáticos, que tienen una capa endotelial incompleta, no tienen membrana basal, y algunas de cuyas células son macrófagos (células de Kupffer).

Debido a los espacios que hay entre las células endoteliales que revisten las sinusoides, todos los hepatocitos están en contacto directo con el plasma, que ocupa el espacio de Disse, situado entre las células sinusoidales y los hepatocitos.²⁹

El hígado tiene un doble aporte sanguíneo: un 30% proviene de la arteria hepática y un 70% de la vena porta. La arteria hepática común transporta sangre oxigenada y nace de la arteria aorta abdominal (tronco celíaco) y cerca del hilio hepático se divide en arteria hepática izquierda y arteria hepática derecha, cada una de las cuales irriga una mitad del hígado y se van ramificando. La sangre oxigenada que transportan va a desembocar en los sinusoides hepáticos.³⁰

La vena porta transporta sangre conteniendo los productos de la digestión de los carbohidratos, grasas y proteínas desde el intestino y también recoge sangre del bazo (con restos de la destrucción de hematíes), páncreas y vesícula biliar. La vena porta se forma por detrás del cuello del páncreas, por la unión de las venas mesentérica superior y esplénica.²⁹

Así pues, la red capilar de sinusoides hepáticos recibe sangre tanto de ramas de la arteria hepática como de ramas de la vena porta y desde los sinusoides, los hepatocitos recogen el oxígeno y los nutrientes que necesitan así como otros productos con los que trabajan y a su vez, devuelven algunos de los productos resultantes de su metabolismo y los productos de desecho a los sinusoides. Los hepatocitos intervienen en el metabolismo de glúcidos, lípidos y proteínas, eliminan de la sangre productos metabólicos de desecho generados por otros tejidos y los convierten en compuestos excretables por la orina o las heces, transforman compuestos biológicamente activos como fármacos, hormonas y tóxicos y sintetizan la bilis. Resulta sorprendente la cantidad de reacciones metabólicas diferentes que se llevan a cabo en los hepatocitos.

Las sinusoides, a su vez, llevan la sangre a una vena central de cada lóbulo hepático. Desde esta vena central se forman vasos venosos cada vez más grandes que transportan la sangre hacia las venas hepáticas y éstas a su vez desembocan en la vena cava inferior y la circulación general.²⁹

La bilis es sintetizada por los hepatocitos y excretada a los canalículos biliares situados entre hepatocitos adyacentes y sin contacto con las sinusoides. A partir de estos canalículos se forman los conductos interlobulillares que se unen unos con otros dando lugar a conductos progresivamente más grandes, hasta formar los conductos hepáticos derecho e izquierdo.³¹

1.2.4. Fisiología celular del hígado

Hepatocitos

Los hepatocitos son células poliédricas de 20 nm de longitud por 30 nm de anchura, con núcleo central redondeado u ovalado, pudiendo en 25% de los casos ser binucleados. Representan el 80% de la población celular hepática en el hombre (**Figura N° 10**). Presentan membrana hepatocitaria, citoesqueleto con microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermediarios de citoqueratina y organelas como las mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso y liso, aparato de Golgi, lisosomas y peroxisomas.³²

El citoesqueleto tiene papel funcional en el transporte de sustancias y en la dinámica de los canalículos biliares. Las mitocondrias participan en la fosforilación oxidativa y la oxidación de ácidos grasos. El retículo endoplasmático rugoso se encarga de la síntesis de albúmina, fibrinógeno y diversas proteínas mediadoras de reacciones inflamatorias y de la coagulación sanguínea. En el retículo endoplasmático liso se da depósito de glicógeno, conjugación de bilirrubina, esterificación de ácidos grasos, glicogenólisis, desoxidación de tiroxina, síntesis de colesterol y de ácidos biliares, metabolismo de lípidos y de sustancias liposolubles, de esteroides y de fármacos como fenobarbitúricos, alcohol y tabaco.³³

El aparato de Golgi realiza el transporte de lípidos hacia el plasma, tiene actividad fosfatásica ácida catabólica, produce glicoproteína y promueve la adición de carbohidrato a las lipoproteínas.

Los lisosomas presentan actividad fosfatásica ácida, además de poseer 30 enzimas hidrolíticas responsables del catabolismo de cuerpos extraños, elementos sanguíneos envejecidos y depositar hierro.

Los peroxisomas metabolizan las purinas, los lípidos, el alcohol y el peróxido de hidrogeno, participan en la gluconeogénesis, en la beta-oxidación de los ácidos grasos de cadena larga.³⁴

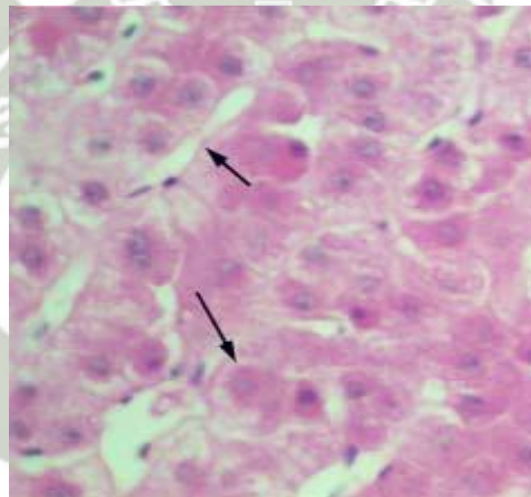


Figura N° 10: Hígado teñido con tricrómico de Masson: la flecha mayor señala una sinusoides, la menor corresponde a un hepatocito.³⁴

Sinusoides

Los sinusoides tienen un diámetro de 105 a 110 μm y ocupan de 6 a 8% de la superficie endotelial (**Figura N° 10**). Realizan endocitosis, intervienen en la síntesis de la matriz extracelular, con producción de colágeno IV, fibronectina, colágeno III. Producen mediadores de reacciones inflamatorias tales como interleucinas 1 y 6, prostaciclina, prostaglandinas E2 y vasorreguladores como el monóxido de nitrógeno, que representa un papel fundamental en el desarrollo de fibrosis e hipertensión portal.³⁴

Células de Kupffer

Las células de Kupffer son células macrofágicas, móviles, ligadas a las células endoteliales, pueden representar el 80 a 90 % de la población macrofágica fija del organismo, con funciones inmunitarias de fagocitosis de agentes infecciosos y de células tumorales. Sintetizan citocinas, eicosanoides y derivados reactivos de oxígeno.³⁴

Células Estrelladas o Células de Ito

Son células perisinusoidales, tienen el rol de depósito de grasa. Sintetizan y modulan la degradación de la matriz extracelular, produciendo colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. Regulan el flujo sanguíneo sinusoidal por su capacidad contráctil en respuesta a diversos agentes como tromboxanos A₂, prostaglandinas F₂, sustancia P y endotelinas 1.³⁴

Matriz Extracelular

Situada en el espacio porta, en continuidad con el tejido conjuntivo de la cápsula de Glisson, en el espacio de Disse perisinusoidal y en las venas centrolobulillares. Está compuesta de colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas.

La interacción entre las células y la matriz extracelular es esencial para el mantenimiento de la homeostasia. Esta interacción es extremadamente compleja y frágil y representa un papel fundamental en la fibrosis y en la oncogénesis hepática.³⁴

Células Tronco

En el hígado normal o patológico estas células surgen de células hijas provenientes de la propia división celular de hepatocitos o de células biliares. Se pueden originar también de las células que limitan el canal de Hering o de células tronco de origen medular que colonizan el hígado por vía sanguínea dando origen a nuevos hepatocitos o nuevas células biliares.³⁴

Hemodinámica

El hígado del adulto está perfundido por 120 mL/min/100 g de tejido hepático, siendo 25% por la arteria hepática y 75% por la vena porta. Sin embargo, el hígado puede ser responsable de hasta el 50% de la captación del oxígeno sanguíneo.³⁵

Tabla N° 4: Valores normales de flujo venoso en torno al hígado.³⁶

FLUJO VENOSO (mL/min)	
Vena Mesentérica Superior	600 a 1100
Vena Esplénica	160 a 240
Vena Porta	840 a 1260
Vena Ázigos	100 a 200
Hepático Total	1200 a 1800

El control del flujo hepático se da en las arteriolas hepáticas, en las vénulas portales, en las vénulas hepáticas y en las arteriolas pre-hepáticas. La cantidad de sangre que llega al hígado por la arteria hepática es inversamente dependiente del flujo portal, regulado por sustancias vasoactivas, dilatadoras arteriales como adenosina, prostaglandinas, glucagón, histamina, o constrictivas como angiotensina, péptidos, endotelinas y vasopresina.³³ La arteria hepática normalmente hace llegar 30 mL/min/100 g de hígado.³⁵

La vena porta normalmente es responsable de un flujo de 90 mL/min/100 g de hígado perfundido. La presión portal varía de 5 a 8 mmHg, con velocidad de flujo portal de 38,3 +/-14,6 cm/seg. Las venas hepáticas drenan la totalidad del flujo hepático, manteniendo un flujo de 1.2 a 1.8 L/min, y su presión libre es de 1 a 2 mmHg.³⁷

El flujo hepático declina con el envejecimiento cerca del 0,5 a 1,5 % por año, pudiendo llegar a una reducción de 40 % a partir de los 65 años, con la consecuente disminución de la tolerancia a la isquemia de la función hepática y de la capacidad regenerativa en individuos con edad superior a 65 años.³⁸

1.2.5. Funciones del hígado

El hígado es un órgano fundamental de nuestro organismo. Los hepatocitos están en contacto directo con el plasma que circula por las sinusoides hepáticas.

Recordamos que en las sinusoides desemboca sangre oxigenada procedente de ramas de la arteria hepática y sangre con productos absorbidos de la digestión procedente de ramas de la vena porta. Las funciones metabólicas del hígado son esenciales para la vida.³⁹

- a) Participa en el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y lípidos.
- b) Sintetiza todas las proteínas del plasma, a excepción de las inmunoglobulinas, incluyendo el complemento, los factores de la coagulación y las proteínas que transportan el colesterol y los triglicéridos.
- c) Secreta la bilis que contiene las sales biliares imprescindibles para la emulsión de las grasas antes de su digestión y absorción.
- d) Transforma amoníaco en urea que es menos tóxica.
- e) Almacena diferentes sustancias como hierro y vitaminas liposolubles.
- f) Interviene en la activación de la vitamina D por la paratohormona.
- g) Metaboliza hormonas y fármacos para que los productos resultantes puedan ser eliminados por la orina o la bilis.

1.2.6. Drogas e hígado

El hígado es un órgano que se afecta en numerosos procesos inflamatorios como infecciones víricas, toxicidad por fármacos y sus metabolitos, metabolopatías, procesos autoinmunes y distintos defectos genéticos. Pues el hígado, por su parte, realiza excreción hacia el sistema biliar, pero su función más importante es metabolizar los fármacos para convertirlos en sustancias más hidrosolubles que puedan ser excretadas más fácilmente.⁴⁰

La transferencia de la droga desde la sangre hasta el hepatocito ocurre a nivel de las sinusoides hepáticas, por lo que debe haber fácil acceso de la droga y sus transportadores hacia el espacio de Disse. La porción de la droga que se encuentre libre (no ligada a proteínas transportadoras) puede entrar con facilidad al hepatocito por difusión pasiva; la porción que se encuentra ligada a las proteínas plasmáticas puede

penetrar por un mecanismo activo que involucra transportadores en la membrana de la célula cuando la constante de disociación sea mayor que la afinidad por las proteínas del plasma.³⁸

Para cumplir adecuadamente con el manejo de las drogas, se requiere también que no exista limitación en el aporte de oxígeno ni obstáculos para el acceso de la sustancia dentro de la célula hasta el sitio de biotransformación enzimática.⁴¹

Metabolismo Hepático de las Drogas

A nivel hepático, los fármacos son sometidos a diversos procesos debido a la transformación, que generalmente los convierten en sustancias más polares que pueden ser excretadas con mayor facilidad hacia el exterior. La mayoría de los metabolitos derivados de esa biotransformación son inactivos, aunque en algunos casos el metabolito puede tener mayor acción que el compuesto original.⁴²

Las reacciones de biotransformación de los fármacos se clasifican en:

a) Reacciones de fase I: son reacciones de hidrólisis y de óxido-reducción. Estas son mediadas por enzimas ubicadas en el retículo endoplásmico y generalmente ocasionan pérdida de la actividad farmacológica.

Anteriormente se conocía también como “fase de oxidación”, denominación que se fundamentaba en el hecho de que gran parte de las transformaciones producidas implicaban este fenómeno redox, siendo catalizadas por enzimas oxidasas de función mixta, generalmente; sin embargo, existen otras posibles transformaciones, como hidrólisis y reducción, que pueden presentarse, pudiendo comprenderse mejor esta fase como una de cambio funcional, con alteraciones menores del peso molecular de la sustancia original. En general, se da lugar a metabolitos más polares, que pueden o no tener menor actividad que el precursor.⁴³

Entre las reacciones de fase I más frecuentes se encuentran las siguientes: O-de alquilación, N-de alquilación, Hidroxilación, N-Oxidación, S-Oxidación, de aminación, hidrólisis y reducción.

b) Reacciones de fase II: en esta fase, llamada también de conjugación, se produce la unión covalente de un fármaco (o un metabolito generado de fase I) con sustancias más polares, siendo la más común la unión con ácido glucurónico, sulfato, aminoácidos, glutatión, etc. Las enzimas involucradas en estas reacciones se hallan en el citosol de las células.

Los metabolitos obtenidos son altamente polares y rara vez presentan actividad farmacológica. Estas acciones pueden o no ocurrir para un fármaco dado, pero cuando se presentan ambas el metabolito obtenido es sumamente soluble en comparación con la molécula original y se excreta generalmente por vía urinaria.

Aparte de la glucuronización, entre las reacciones de fase I más frecuentes se encuentran la sulfatación y la acetilación.⁴⁴

Sistema del citocromo P₄₅₀

El citocromo P₄₅₀ es el término con el que se agrupa a un gran número de enzimas responsables de la oxidación de numerosas drogas y compuestos endógenos. Cada P₄₅₀ es una proteína con un grupo Hem, que se encuentra en estrecha relación con la reductasa de NADPH-citocromo P₄₅₀. Cada enzima P₄₅₀ está codificada por un gen separado.

De acuerdo con la similitud de la secuencia de aminoácidos, las enzimas de este sistema han sido agrupadas en 12 familias y a su vez, esta se ha subdividido en subfamilias. Las familias 1, 2 y 3 del citocromo P₄₅₀ son las que participan más extensamente en las reacciones debido a la transformación de los medicamentos; específicamente, la subfamilia CYP3A4 está involucrada en el metabolismo de la mayoría de los fármacos. Si bien algunas drogas tienen una gran afinidad por una enzima P₄₅₀ específica, la mayoría de estas enzimas pueden oxidar diferentes tipos de sustrato.⁴⁴

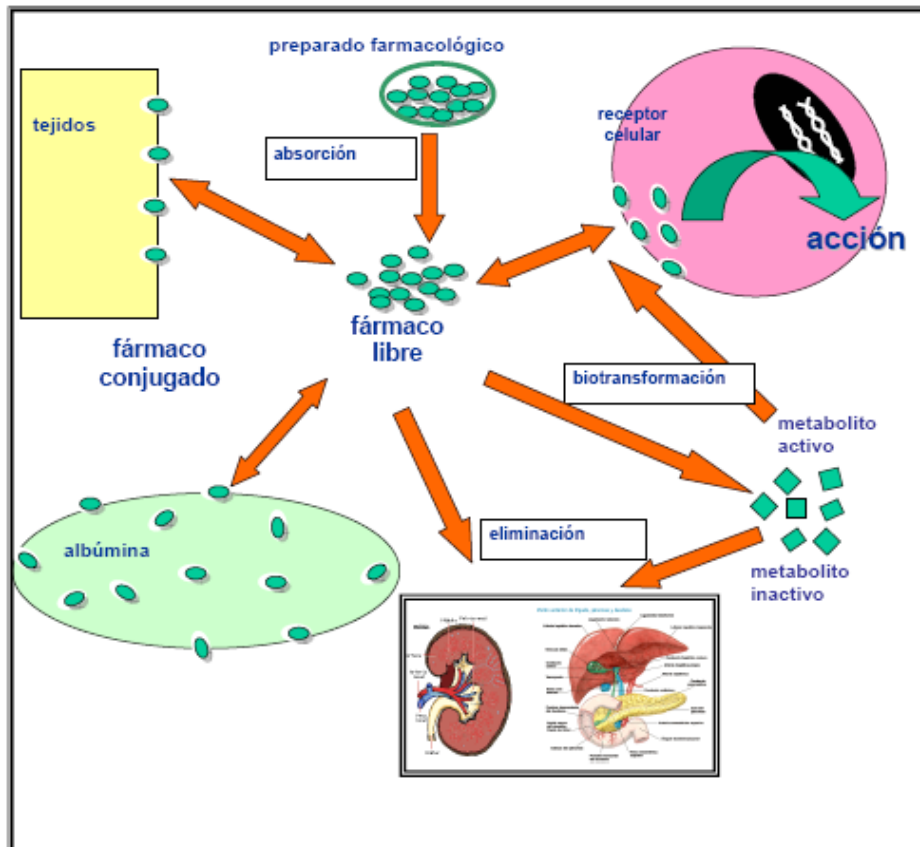


Figura N° 11: Farmacocinética y distribución de los fármacos⁴⁵

La actividad de las enzimas del citocromo P₄₅₀ puede ser modificada por diversos factores, entre ellos:

- a) Fármacos o sustancias químicas pueden producir inducción de la actividad de la enzima y, por lo tanto, acelerar el metabolismo. Entre los Inductores más conocidos se encuentran el humo del cigarrillo, los anticonvulsivantes, los glucocorticoides, antituberculosos como: la isoniacida y la rifampicina, entre otros tenemos la espirolactona y el etanol;⁴⁶
- b) Inhibición, cuando 2 o más fármacos compiten por el sitio activo de la misma enzima, ocasionando disminución en el metabolismo de aquel fármaco que se encuentre en concentraciones menores y que sea menos a fin por la enzima. También pueden inhibir la enzima al formar un complejo con el hierro del grupo Hem del citocromo correspondiente. Entre los inhibidores más conocidos se

encuentran la cimetidina, el ketoconazol, la eritromicina, la quinidina, el alopurinol, el diltiazem y los estrógenos;⁴⁷

- c) Diferencias genéticas;
- d) La edad avanzada ocasiona pérdida

1.3. Hepatotoxicidad por drogas

El daño hepático por fármacos (DHF) constituye un problema clínico relacionado directamente con una intervención médica, siendo su diagnóstico difícil porque no existen exámenes de certeza. La prevalencia de consumo de fármacos en el paciente adulto y especialmente en el paciente anciano es elevada, y lo más frecuente frente a una reacción hepatotóxica es el antecedente de consumo de múltiples fármacos.

Muchos medicamentos, al igual que agentes tóxicos de uso no terapéutico pueden causar una gran variedad de lesiones hepáticas por lo que los mecanismos fisiopatológicos por los que se producen estas lesiones son complejos.

En un extremo del espectro existe un efecto tóxico directo en los hepatocitos, que sin embargo es previsible y dependiente de la dosis y conduce a una franca necrosis hepatocelular. Esta es la forma típica de lesión producida por el acetaminofén y el tetracloruro de carbono, los cuales ocasionan una necrosis hepatocelular centrolobulillar en prácticamente todos los individuos que han ingerido una cantidad suficiente de cualquiera de esos dos productos.⁴⁸

Es fundamental sospechar de entrada una reacción hepática por medicamentos y, si es posible, diagnosticar la causa. La severidad es mucho mayor si se sigue dando la droga después de la aparición de los síntomas o del aumento de las transaminasas séricas.⁴⁹

Necrosis hepatocelular de la zona 3

El acontecimiento primario parece ser un daño hepatocelular. Esto se debe raras veces a la droga misma, sino por lo general el agente causal es un metabolito tóxico. Las enzimas encargadas del metabolismo de las drogas activan a drogas químicamente estables para producir metabolitos electrófilos. Estos potentes agentes alquilantes,

establecen enlaces covalentes con moléculas hepáticas esenciales para la vida del hepatocito y sobreviene necrosis. Esto es consecutivo al agotamiento de sustancias intracelulares del tipo glutatión, que son capaces de conjugarse de modo preferencial con el metabolito tóxico. El resultado final es la muerte del hepatocito, porque no se bombea calcio desde el citosol y porqué se deprime la función mitocondrial.⁵⁰

1.4. Anatomía patológica del hígado

1.4.1. Hepatitis

El término hepatitis se aplica a un amplio grupo de alteraciones clínico patológicas del hígado, que resultan de agresiones virales, tóxicas, farmacológicas o con medición inmunitaria.

Entre las características anatomopatológicas comunes de la hepatitis figuran la necrosis hepatocelular, que puede ser focal o difusa, y la infiltración del hígado por células inflamatorias, que a veces predomina en las regiones de la porta o extenderse y penetrar en el parénquima.

Desde el punto de vista clínico, puede haber dolor y agrandamiento del hígado, con o sin ictericia, y constantemente se encuentran datos de laboratorio propios de lesión hepatocelular, que se manifiestan por elevación de las cifras de transaminasas. Sin distinción de la causa, la evolución clínica de la hepatitis puede oscilar de un proceso leve o asintomático hasta una enfermedad con signos de insuficiencia hepatocelular grave, ictericia intensa, afección de la coagulación y trastornos funcionales neurológicos. La hepatitis se divide en tipo agudo y crónico según los criterios clínicos y patológico.⁴⁸

Hepatitis Aguda, Se llama a un proceso que dura menos de seis meses y que termina con resolución completa de la lesión hepática y recuperación de la estructura y función normales del hígado, o bien, con evolución rápida de la lesión aguda hacia una necrosis extensa, con un pronóstico mortal.⁴⁸

La Hepatitis Crónica, se define como un proceso inflamatorio sostenido del hígado que dura más de seis meses.

Es sumamente difícil distinguir entre las formas aguda y crónica de la hepatitis con base en criterios histológicos. En las muestras de biopsias tomadas en pacientes con formas graves de hepatitis crónica se observan que las células inflamatorias se extienden más allá de los límites de los espacio porta, rodean a grupos aislados de hepatocitos (necrosis “en migajas”), y se extienden desde las regiones porta o desde las centrolobulillares por bandas de inflamación, necrosis y colapso de la arquitectura hepática (necrosis en puente).

Sin embargo, los mismos datos pueden encontrarse en la hepatitis aguda no complicada que con el tiempo acaba por resolverse. Para el diagnóstico exclusivamente histológico de la hepatitis crónica suele ser necesario comprobar la existencia de signos de empeoramiento o de evolución progresiva hacia cirrosis, como son un grado importante de cicatrización fibrosa y rotura de la arquitectura lobulillar.⁴⁸

Hepatitis inducida por paracetamol

Mediante el citocromo P₄₅₀ hepático, que forma parte del sistema de transformación metabólica de los fármacos, el acetaminofén se convierte en un metabolito potencialmente tóxico que, más tarde, al conjugarse con glutatión, se vuelve menos nocivo. Si se toman dosis masivas (más de 10 a 15g), la formación excesiva de metabolitos tóxicos agota el glutatión disponible y se produce necrosis hepática.

La sobredosificación de acetaminofén produce, al principio, náuseas y vómitos; estos síntomas remiten más tardes, y a las 24 a 48 h van seguidos de datos clínicos y de laboratorio de necrosis hepatocelular (cifras altas de transaminasas) y de alteraciones de la función hepática (tiempo de protrombina prolongado, encefalopatía hepática). Datos similares surgen con dosis terapéuticas de acetaminofén en enfermos con alcoholismo crónico. La necrosis hepatocelular extensa puede ocasionar insuficiencia hepática fulminante y la muerte. Es posible pronosticar una lesión hepática grave a partir de la concentración del fármaco en sangre, medida entre 4 y 12 h de la ingestión. Puede

salvarse la vida tratando precozmente a los pacientes de alto riesgo con N-acetilcisteína (en las primeras 16h de la ingestión), sustancia que se supone estimula la síntesis de glutatión hepático.⁴⁸

1.5. Pruebas de función hepática

Transaminasas (Aminotransferasas)

La transaminasa glutámico oxalacética (TGO, Aspartato-Transaminasa) es una enzima mitocondrial que existe en grandes cantidades en el corazón, hígado, músculo esquelético y riñón; su nivel sérico sube siempre que estos tejidos sufren destrucción aguda, tal vez porque e libera de las células dañadas.

La transaminasa glutámico pirúvica (TGP, Alanina-Transaminasa) es una enzima citosólica que también está en el hígado. Aunque la cantidad absoluta es menor que la de TGO, el hígado contiene una mayor proporción que el corazón y el músculo esquelético. Por lo tanto, su aumento sérico es más específico de daño hepático que en el caso de la TGO.⁵¹

Fosfatasa Alcalina (FA)

Es una enzima ampliamente distribuida en el organismo. En el adulto, la fosfatasa alcalina proviene en parte del hígado y en parte del hueso; en los niños en edad de crecimiento se encuentran principalmente en el hueso.

Entre las patologías que afectan la actividad de la FA se pueden citar: carcinomas metastásicos en hígado y hueso (productores de esta enzima), hepatotoxicidad incluso en lesiones en vías de reparación tales como infarto agudo de miocardio, infarto pulmonar y renal.⁵¹

1.6. Paracetamol

1.6.1. Características

Es un polvo finamente cristalizado de color blanco, su fórmula química es $C_8H_9NO_2$ (Figura N° 12) y tiene un peso molecular de 152.17 g/mol, con una densidad de

1.263 g/cm³, su punto de fusión es de 169 °C (336 °F) y su solubilidad para agua a 20°C es de 14 g/L, para etanol y acetona a 20°C es soluble.⁵²

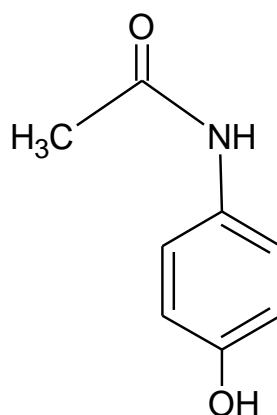


Figura N° 12: Estructura del paracetamol⁵²

El Paracetamol o acetaminofén es un analgésico y antipirético ampliamente utilizado con propiedades antiinflamatorias leves, indicado para reducir la fiebre y en la analgesia temporal de dolores menores, malestares asociados con fiebre y dolor, cefalea (dolor de cabeza), neuralgias (dolor a lo largo de un nervio), dolores articulares, otalgias (dolor de oído), síntomas del resfriado común, dolor menstrual, fiebre pos-vacunal, dolor asociado a procedimientos quirúrgicos menores y post-amigdalotomía (posterior a extracción de amígdalas), dolores dentales y posterior a cirugías o procesos invasivos del área estomatológica.^{53,54}

Es bien tolerado y no genera muchos de los efectos colaterales que genera la aspirina y puede obtenerse sin receta, razón por la cual ha ocupado un sitio destacado como analgésico casero común. Sin embargo, la sobredosis aguda ocasiona lesión hepática mortal, y en años recientes ha crecido en forma alarmante el número de autointoxicaciones y suicidios con dicho producto.⁵³

1.6.2. Contraindicaciones

Contraindicado en sujetos con hipersensibilidad conocida al paracetamol, algunas enfermedades pulmonares, cardíacas, hepáticas y renales, ingestión de anticoagulantes, trastornos de coagulación, úlcera péptica activa, el embarazo, la lactancia, fenilcetonuria, anafilaxia, periodos asmáticos, hipersensibilidad a AINES.^{55,56}

1.6.3. Mecanismo de acción

El paracetamol posee una acción antipirética y analgésica rápida y eficaz debidas a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Este actúa inhibiendo levemente la acción de las ciclooxigenasas (COX) 1 y 2, pero más específicamente a la recién descubierta COX3. El efecto analgésico se logra mediante la elevación del umbral del dolor y el efecto antipirético mediante su acción sobre el centro termorregulador en el hipotálamo.⁵⁶

1.6.4. Propiedades farmacocinéticas

Se absorbe rápida y completamente. Su vida media es de 2 horas eliminándose casi en su totalidad a través de la orina.^{57, 58} Es metabolizado extensamente en el hígado por acción de las enzimas microsomales hepáticas.⁵⁷ En condiciones normales el paracetamol es glucuronizado y sulfatado en el hígado en un 90% y luego eliminado por vía urinaria. Del 10% restante, la mitad es excretada directamente por los riñones y la otra mitad es metabolizada por el citocromo P₄₅₀.

Las subfamilias CYP2E1, 1A1 y 3A4 de este citocromo transforman al paracetamol en N-acetil-p-benzoquinonemina (NAPQI), un metabolito intermedio altamente reactivo y electrofílico. Este compuesto es capaz de unirse covalentemente a macromoléculas del hepatocito, produciendo estrés oxidativo y necrosis hepatocelular. NAPQI es conjugado rápidamente con glutatión, formando cisteína y mercaptano, que no son tóxicos y cuando hay una sobredosis de paracetamol, las otras vías se saturan y una proporción mayor del medicamento va a la vía del citocromo. Cuando las reservas de glutatión se agotan en un 70%, NAPQI comienza a acumularse produciendo daño hepatocelular.⁵⁹ Los niños muestran menor capacidad de glucuronización del paracetamol que los adultos. **(Figura N° 13).**

1.6.5. Propiedades Farmacodinámicas

Se cree que el paracetamol aumenta el umbral del dolor inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, mediante el bloqueo de Ciclooxygenasas en el Sistema Nervioso Central (específicamente la COX-3). Sin embargo, el paracetamol no inhibe de forma significativa las Ciclooxygenasas en los tejidos periféricos.

La acción antitérmica está relacionada con la inhibición de la síntesis de PGE1 en el hipotálamo, órgano coordinador fisiológico del proceso de termorregulación.⁶¹

1.6.6. Mecanismo de toxicidad.

Toxicocinética

El paracetamol se absorbe por vía digestiva, alcanza un pico plasmático a los 40-60 minutos. En sobredosis, la mayor parte de paracetamol se absorbe en 2 horas, pero no alcanza el pico plasmático hasta las 4 horas. Atraviesa la barrera hemato-encefálica y placentaria.

Cuando el paracetamol es administrado a dosis terapéuticas en adultos, el 95% es metabolizado en el hígado y el resto se excreta inalterado por la orina. De la fracción metabolizada por el hígado, el 90% sufre conjugación con ácido glucurónico o sulfatos y el resto es metabolizado por el citocromo P₄₅₀ en un metabolito tóxico: N-acetil-p-benzoquinoneimida (NAPBQ).

Este metabolito es rápidamente detoxificado gracias a la conjugación con glutatión (**Figura N° 14**).⁶²

Para poder tratar correctamente la intoxicación por paracetamol, es muy importante conocer tanto la dosis ingerida como el tiempo transcurrido desde su ingesta.

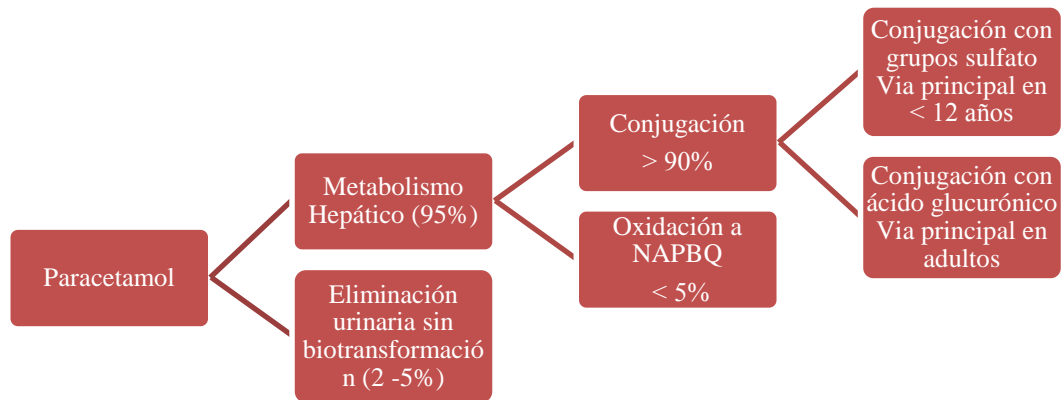


Figura N° 14: Mecanismo de Toxicidad del paracetamol.⁶³

1.6.7 Evolución clínica

Intoxicación aguda

La intoxicación por paracetamol produce un cuadro clínico dominado por el desarrollo de una insuficiencia hepática por necrosis. Este cuadro puede ser dividido en cuatro etapas, según el intervalo de tiempo que transcurre desde el momento de la ingesta:⁶²

- a) **Estadio I** (0-24 horas post-ingestión): Los enfermos suelen encontrarse completamente asintomáticos. Es posible la aparición de náuseas, vómitos y malestar general. También pueden presentar epigastralgia y dolor en hipocondrio dcho. A veces se observan descensos del índice de Quick sin aumento de las transaminasas, que no indican necesariamente el desarrollo de Hepatotoxicidad. En casos de intoxicaciones muy graves: > 20 g o concentraciones séricas > 240 µg/mL, las manifestaciones clínicas pueden ser coma, shock y ECG con signos de isquemia miocárdica.
- b) **Estadio II** (24-48 horas post-ingestión): El paciente puede seguir asintomático o iniciar síntomas relacionados con la hepatotoxicidad como hepatomegalia dolorosa e ictericia muco-cutánea. La elevación de las transaminasas comienza entre las 24 y 36 horas, pero en algunos casos puede ocurrir a las 16 horas o antes. Marcadas elevaciones de niveles de transaminasas (mayores de 1000 UI/L en las primeras 24 horas), bilirrubina o TP en las primeras 36 horas, sugieren que el tiempo de ingestión es previo al mencionado. En esta fase pueden

aparecer signos de disfunción renal (por necrosis tubular) aunque la uremia pueda ser normal, ya que en presencia de daño hepático hay una disminución de su síntesis. El paciente puede evolucionar favorablemente hacia la normalización en 3 a 4 días o entrar en el siguiente estadio.

- c) **Estadio III** (72-96 horas post-ingestión): Es la fase de mayor lesión hepática. El paciente puede mostrarse asintomático o sufrir un fallo hepático fulminante con encefalopatía y coma. Los niveles de transaminasas (ALT y AST) pueden superar hasta 100 veces los valores normales.

La mayoría de los pacientes se recuperará completamente con el tratamiento adecuado, y si el paciente fallece generalmente ocurrirá de tres a siete días tras la ingestión de paracetamol. La muerte en estos pacientes es debida a la encefalopatía hepática, hemorragia por coagulopatía y fallo multiorgánico. Aunque el fallo renal sea severo, es casi siempre reversible.

- d) **Estadio IV** (4 días a 2 semanas post-ingestión): Si el daño generado durante el estadio III no ha sido irreversible, los hepatocitos pueden regenerarse y el paciente sobrevive.

La recuperación es a menudo completa en 5 a 6 días, pero si la toxicidad ha sido importante la recuperación puede prolongarse durante más de 2 semanas. La mayoría de los pacientes que sobreviven a una intoxicación por paracetamol no presentan ninguna disfunción hepática crónica.

Intoxicación subaguda

Ocurre en aquellos casos en los que la ingestión de dosis fraccionadas de paracetamol se produce durante un corto periodo de tiempo. Estos pacientes pueden desarrollar también cuadro clínico grave con náuseas, vómitos, dolor abdominal y afectación hepatocelular.

Los alcohólicos crónicos son especialmente sensibles a este tipo de intoxicación.⁶²

1.6.8 Reacciones adversas

Las reacciones adversas a medicamentos (RAM), aparecen en gran número de pacientes (hasta un 30%), afortunadamente de carácter leve y transitorio en la mayoría de los caso (ver Tabla N° 5). De forma reciente se utiliza el término Problemas Relacionados con los Medicamentos (PRM), donde e amplia la valoración de los efectos indeseables a los ocasionados por una incorrecta selección del medicamento, de su dosis, de la técnica de administración o del cumplimiento terapéutico.⁶² Las que más se han informado durante el periodo de utilización de paracetamol son: hepatotoxicidad, toxicidad renal, alteraciones en la fórmula sanguínea, hipoglucemia y dermatitis alérgica.⁶⁴

Tabla N° 5: Reacciones adversas del paracetamol.⁶³

FRECUENCIA		
Raras (>1/10.000, <1/1.000)	Trastorno vasculares:	Hipotensión
	Trastorno hepatobiliares:	Niveles aumentados de transaminasas Hepáticas
	Trastorno generales y alteraciones en el lugar de administración	Malestar
Muy Raras(<1/10.000)	Trastorno de la sangre y del Sistema Linfático	Trombocitopenia, agranulocitosis, leucopenia, anemia hemolítica
	Trastornos del metabolismo y de la nutrición	Hipoglucemia
	Trastornos hepatobiliares	Hepatoxicidad(ictericia)
	Trastornos renales y urinarios	Piuria estéril (orina turbia), efectos renales adversos.
	Trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración :	Reacciones de hipersensibilidad que oscilan, entre una simple erupción cutánea o una urticaria y shock anafiláctico.

1.7. Liofilización

El procedimiento llamado criodeshidratación, criodesecación o liofilización, consiste en congelar el producto para luego deshidratarlo al vacío, aprovechando la propiedad de sublimación que posee el hielo, es decir, la propiedad que le permite pasar de una fase sólida a la fase gaseosa sin fundirse. Mediante este proceso se elimina a muy baja temperatura, el agua de un producto que se mantiene congelado y rígido mientras está húmedo. En esas condiciones el producto no sufre el calor por la presencia de agua y se deshidrata conservando su forma y volumen original.⁶⁵

1.7.1. Principios físicos de la liofilización

La liofilización es un proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, pero preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada.⁶⁵

En el diagrama de fases (**Figura N° 15**), la frontera entre el gas y líquido va desde el punto triple hasta el punto crítico. La liofilización (flecha azul) lleva el sistema alrededor del punto triple, evitando así la transición directa de líquido a gas de un secado tradicional (flecha verde).

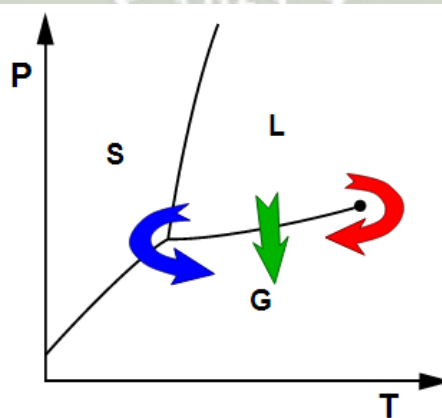


Figura N° 15: Diagrama de fases del proceso de liofilización

Para llevar a cabo el proceso de liofilización se necesita determinar los siguientes parámetros.

- a) Punto eutéctico del producto.
- b) Presión.
- c) Temperatura.

En el caso del brócoli la temperatura de congelación es de -30°C y la operación dura 48 horas. El vacío utilizado en el túnel está dado por la temperatura del brócoli congelado correspondiente a -56°C y un vacío de 0.013 torr.

La reducción de la presión existente en la cámara, con temperatura y presión por debajo de la correspondiente al punto triple, hace que inmediatamente se inicie la evaporación de la humedad. La fase de sublimación concluye cuando ya no hay hielo para retirar del producto.

El producto seco liofilizado tiene una estructura porosa, debido a que las moléculas de agua han abandonado sus sitios dejándolos así, por tanto estos poros tienden a llenarse con aire atmosférico, el cual es muy dañino por contener oxígeno que da lugar al oxidamiento y ranciamiento, es por esto que se busca un gas inerte o aire seco para evitar estos fenómenos, una vez secado el producto, va a un tambor de producto terminado, posteriormente se realiza la molienda y el tamizado.

1.7.2. Ventajas de la liofilización

La liofilización ofrece múltiples ventajas:⁶⁶

- a) Calidad superior del producto final.
- b) Longevidad del producto procesado, manteniendo sus propiedades.
- c) En efecto, la baja presión del proceso y la débil conductividad de los productos liofilizados (debido a la textura porosa) afectan de manera significativa y negativa la transferencia de calor y de masa y por consecuencia la duración de la operación de deshidratación.

- d) Se reduce considerablemente la desnaturalización proteica, de modo que los tejidos se conservan en estado viable. Debido en parte a las bajas temperaturas empleadas y también a la ausencia de migración de sales y otros solutos, el producto final tiene exactamente el mismo grado de uniformidad que el material primitivo.
- e) La pérdida de constituyentes volátiles, tales como aceites esenciales, es generalmente menor que otros métodos de desecación.
- f) La desecación es uniforme y rara vez observa un endurecimiento superficial.
- g) En las condiciones de baja temperatura en que se realiza la desecación no se produce ningún crecimiento bacteriológico, ni cambio enzimático.
- h) En virtud del elevado vacío empleado, en comparación en el empleado en la evaporación ordinaria, la cantidad de oxígeno presente es tan pequeña que resultan protegidos, incluso, los componentes fácilmente oxidables.
- i) Los productos liofilizados pueden almacenarse por largo tiempo completamente secos, bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad.

1.7.3. Desventajas de la liofilización⁶⁶

- a) Elevado costo debido a que el proceso es relativamente largo y complejo.
- b) El producto debe conservarse en condiciones adecuadas de temperatura y humedad ya que es fácilmente reconstituible.
- c) En el caso de polvo liofilizado, este es muy higroscópico si está expuesto al ambiente sin ningún tipo de cuidado.

1.8. Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (SPE) es una modalidad de preparación de las muestras que ha tenido amplia difusión desde fines de la década del 70 y principios del 80. Consiste en una extracción líquido-sólido a través de una columna o cartucho. Más recientemente se han desarrollado sistemas de extracción en los que la preparación de las muestras se realiza sobre discos que contienen el material de separación impregnado en PVC. El vasto desarrollo que esta metodología ha experimentado en los últimos años, permite actualmente operar con columnas conteniendo los materiales de relleno más variados, con lo cual es posible resolver un gran número de aplicaciones.⁶⁷

1.8.1. Columnas de extracción

La extracción en fase sólida se lleva a cabo en pequeñas columnas o cartuchos de plástico (usualmente polipropileno). Estas columnas se rellenan con cantidades variables (desde 100 hasta 500 mg) de distintos materiales similares a los empleados para el relleno de las columnas de HPLC, de mayor granulometría (típicamente de 40 μm) y con una pequeña distribución de tamaños de partícula.

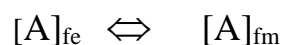
Los materiales que se emplean para el relleno comprenden desde adsorbentes muy polares como la sílica, hasta poco polares como la sílica unida a los grupos C18, pasando también por materiales de intercambio iónico, pudiendo tratarse de fases enlazadas a la sílice o a polímeros como estireno-divinilbenceno.

En general, la capacidad de retención de solutos de una columna de SPE depende del tipo de material de relleno, del tamaño de la columna, del tipo de analito y las condiciones de extracción.⁶⁷

1.8.2. El proceso de extracción

La extracción en fase sólida tiene lugar mediante mecanismos desorción-desorción de los analitos en la superficie del material activo de las columnas. La retención y elución obedece o bien a una partición o bien a los mismos principios tratados anteriormente para fase reversa, fase normal e intercambio iónico.

La SPE puede considerarse como una extracción líquido-sólido aunque algunos de los mecanismos que involucran la retención obedezcan a fenómenos diferentes.⁶¹ Existe un equilibrio entre la concentración de analito en la fase estacionaria $[A]_{fe}$ y la fase móvil $[A]_{fm}$, es decir:



Para que el analito presente en la muestra se retenga en la columna este equilibrio debe estar desplazado hacia la izquierda, mientras que para conseguir la elución del analito en cuestión el equilibrio debe desplazarse hacia la derecha. Los mecanismos para desplazar estos equilibrios se describirán más adelante.

1.8.3. Metodología para la extracción

La selección de las condiciones óptimas para la extracción, dependen de la naturaleza del analito y de la matriz que lo rodea.⁶⁷ Para la preparación de las muestras se utilizan los pasos que se describen a continuación:

- a) **Lavado y activación de la columna**, esta operación tiene por objeto solvatar los grupos funcionales del material de relleno de la columna. Los analitos no pueden interactuar con el relleno de la columna si sus grupos no se encuentran totalmente activados, especialmente en el caso de las cadenas del material de relleno de fase reversa que deben estirarse para lograr la interacción. El primer paso, se utiliza además para eliminar las sustancias provenientes de muestras anteriores que quedaron retenidas en la columna, y se realiza fluyendo metanol u otros solventes menos polares como acetonitrilo. El segundo paso, se utiliza para equilibrar la columna con un solvente igual o similar al empleado como medio de disolución de las muestras.
- b) **Aplicación de la muestra**, la muestra se aplica en la columna utilizando un caudal determinado (típicamente 1-10 mL/min), este paso debe efectuarse lentamente porque caudales demasiados rápidos a través de la columna pueden producir efectos cinéticos en el material de relleno que conducen a bajas recuperarse de analito. Esta operación puede efectuarse de dos maneras diferentes de acuerdo al modo de trabajo que se seleccione, estas dos modalidades son:
 - Aplicación directa de la solución a inyectar de manera tal de lograr la elución del analito y la retención de impurezas cuyo comportamiento sea muy afín a la columna. En este caso la preparación de la muestra finaliza con esta operación.
 - Retención del analito en la columna utilizando un solvente débil, en general seguido de un lavado con un solvente con el cual no eluya el analito y posterior elución con un solvente fuerte. Este método es el más habitual y puede utilizarse para la pre-concentración de muestras pasando grandes volúmenes a través de la columna.

- c) **Lavado de la columna**, esta operación se refiere a la eliminación de las impurezas retenidas en el paso anterior utilizando un solvente relativamente débil con el cual el analito no eluye. El lavado de la columna no es indispensable, pero en general es recomendable porque produce muestras más limpias, con menos sustancias que interfieren.
- d) **Elución del analito**, finalmente el analito se eluye con un solvente tal que posea la fuerza de elución apropiada utilizando para ello desde 5 hasta 20 volúmenes de columna. Dependiendo del diseño de las columnas y de las necesidades del usuario, el solvente a pasar puede impulsarse con la ayuda de una jeringa o aspirarse con vacío.

Es importante aclarar que durante la operación de aplicación de la muestra y en los sucesivos pasajes de solvente, lavado y elución, las columnas deben mantenerse húmedas y no dejar que se sequen para obtener una buena recuperación de analito.⁶⁷

1.9. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Las siglas HPLC hacen referencia a la cromatografía líquida de alta resolución o “high performance liquid chromatography”.⁶⁸ Es un método cromatográfico poderoso que permite separaciones de mezclas complejas en periodos de tiempos cortos.⁶⁹

A. Principios generales:

En este tipo de cromatografía, la muestra pasa a través de una fase estacionaria empaquetada en una columna, llevada por una fase móvil líquida a elevada presión. Durante ese tiempo los componentes de la muestra son separados en la columna.⁶⁸ Se pueden analizar trazas de materiales orgánicos e inorgánicos en concentraciones de 10^{-6} y 10^{-12} dependiendo del detector elegido.^{68,70}

En HPLC, la fase estacionaria y la fase móvil son capaces de interactuar con la muestra de forma selectiva.⁷⁰ Tradicionalmente las columnas de HPLC eran polares (como la sílica), y las fases móviles usadas eran relativamente no polares, esta forma de HPLC es llamada de fase normal.⁶⁸

Sin embargo, hoy en día la forma más común de HPLC es la de fase reversa. Aquí las columnas son hidrofóbicas y la fase móvil está constituida por una combinación miscible de agua y modificadores orgánicos (los más comunes son metanol y acetonitrilo). Por lo tanto, en este tipo de HPLC los analitos hidrofóbicos son los más retenidos, y son eluidos con mayor facilidad a medida que la proporción del componente hidrofóbico de la fase móvil aumenta.⁶⁸ La separación depende de la interacción hidrofóbica entre las moléculas de soluto en la fase móvil y la fase estacionaria.⁷¹

B. Instrumentos

El equipo de HPLC tiene los siguientes componentes:^{72,73,74}

- ✓ **Reservorio de solvente:** El cual alimenta al sistema con la fase móvil.
- ✓ **Bomba:** Fuerza el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna, impulsando la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector y desde allí hasta la columna.
- ✓ **Inyector:** Permite la introducción de la muestra, sin interrumpir el flujo del solvente a través del sistema.
- ✓ **Columna analítica:** Es el lugar donde se produce la separación, es el corazón del sistema cromatográfico. Las columnas analíticas eficientes deben tener una fase estacionaria homogénea y de tamaño de partícula pequeño.
- ✓ **Detector:** Sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna, debe ser capaz de reconocer una sustancia cuando eluye de la columna, convertir esto en una señal eléctrica y transmitirla al *display*, donde es mostrada como una desviación de la línea base.
- ✓ **Sistema de registro:** El registro de los datos provenientes del detector y su eventual manipulación se obtienen a partir de un sistema de toma y procesamiento de datos, constituido por un registrador gráfico, integrador y computadora.

CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los Laboratorios H-202 y el Laboratorio de investigación Proyecto Mercurio, UCSM.

2.1. Material biológico

2.1.1. *Brassica oleracea* L. (Brócoli)

El material utilizado fueron pellas y tallos secundarios frescos de *Brassica oleracea* L., seleccionándolos teniendo en cuenta su aspecto, color y tamaño para finalmente liofilizarlas.

Brassica oleracea L.

- Cantidad: 1.5 kg.
- Procedencia: Mercado de Abastos Andrés Avelino Cáceres – Arequipa.

El material biológico fue cortado en pequeños trozos y refrigerado hasta su posterior liofilizado (**Ver Anexo 1, Fotografía N°1**).

2.1.2. Animales de Experimentación

Para efectuar el presente trabajo, se utilizaron un total de 35 animales de experimentación de la especie Wistar, variedad *novergicus*, los cuales fueron adquiridos y criados en el bioterio de la Universidad Católica Santa María.

Se eligieron ratas Wistar con las siguientes características:

- Especie : “*Rattus novergicus*”.
- Edad : 4 – 6 meses.
- Sexo : Machos.
- Peso : 290 a 320 g.

2.1.2.1. División de grupos experimentales

A cada grupo de se le ubicó en distintas jaulas (Ver Anexo 1, Fotografía N° 8, 9), tal como se señala en la **Tabla N° 6**.

Tabla N° 6: Distribución de los grupos experimentales y tratamiento

Grupos de Estudio	Designación	Tratamiento	Días de intoxicación /tratamiento
Grupo 1	Grupo Paracetamol	Suspensión de paracetamol (1000 mg/kg).	7 días de intoxicación
Grupo 2	Grupo Agua	Agua y alimento <i>ad libitum</i> .	21 días de estudio.
Grupo 3	Grupo Brócoli	Suspensión de brócoli liofilizado (1000 mg/kg).	7 días de tratamiento.
Grupo 4	Experimental 1	Suspensión de brócoli liofilizado (1000 mg/kg/día) y la suspensión de paracetamol (1000 mg/kg).	Una semana de tratamiento previo a 7 días de la intoxicación con la suspensión de paracetamol.
Grupo 5	Experimental 2	Suspensión de paracetamol (1000 mg/kg) y la Suspensión de brócoli liofilizado (1000 mg/kg/día)	Una semana de intoxicación con la suspensión de paracetamol previo a 7 días de tratamiento con la suspensión de brócoli.

Fuente: Elaboración propia

Esquema de Tratamiento

El primer día de experimentación (día 1), se tomaron muestras de sangre a todos los animales de los 5 grupos de estudio para determinar los valores de TGO, TGP y FA basales, y posteriormente los días de toma de muestras fueron los días 8° y 15°.

Grupo paracetamol

Después del periodo de estandarización se le procedió a administrar una dosis diaria de 1000 mg/kg de peso de suspensión de paracetamol por 7 días mediante una sonda orogástrica, luego del cual se les mantuvo con agua y alimento *ad libitum* hasta el final del estudio.

Grupo agua

Este grupo recibió solo agua y alimento *ad libitum* durante todo el estudio.

Grupo Brócoli

Luego de aclimatarlos se les administró una dosis diaria de 1000 mg/kg de peso de brócoli liofilizado por 7 días para después solo tenerlas con alimento *ad libitum* hasta terminar el estudio de investigación.

Grupo experimental 1(pre-ingestión):

Luego del periodo de estandarización se les administró una vez por día, el liofilizado de brócoli en dosis de 1000 mg/kg de peso, durante 7 días por vía oral con ayuda de una sonda orogástrica.

Al día siguiente de la última administración del tratamiento con brócoli (día 8°) se le administró 1000 mg/kg de peso de suspensión de paracetamol por espacio de 7 días, por vía oral con ayuda de una sonda orogástrica, y finalmente se les realiza la última toma de muestra.

Grupo experimental 2 (post-ingestión):

Luego del periodo de estandarización se les administró por 7 días, 1000 mg/kg de peso de suspensión de paracetamol.

Al día siguiente de la última administración tóxica de la suspensión de paracetamol (día 8°), se le administró el liofilizado de brócoli disuelto en suspensión con ayuda de una sonda orogástrica, en dosis de 1000 mg/kg de peso por espacio de 7 días, tomando muestras de sangre, los días 8° y 15° respectivamente.

2.2. Material de laboratorio

- Tubos de ensayo de 15 x 100 mm, Pirex.
- Micropipetas automáticas de 10-50 μ L y 10-100 μ L.
- Beaker de 500 y 1000 mL.
- Matraz aforado x 250 mL.
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL.
- Probetas de 100mL.
- Bagueta de vidrio.
- Capilares sin heparina
- Jeringa de 10mL.
- Termómetro.
- Filtro de celulosa.
- Viales.
- Mortero.
- Cartuchos Merck Lichrolut RP-18.
- Tamizador N° 41.

2.3. Equipos

- Balanza Analítica Stanton Unimatic C1-41.
- Centrifuga de 12 tubos Zec Centra CL₂.
- Espectrofotómetro Cary 60 de agilent.
- Baño termostático Memmert.
- Sistema HPLC Lachrom Elite UV/Software EzChrom.
- Agitador magnético y calentador regulable con plato Corning modelo PC 420.
- Estufa FISHER Scientific serie 500 Sotemp.
- Desgasificador.
- Licuadora Oster.
- Equipo de filtración al vacío.

2.4. Reactivos

- Acetonitrilo Grado HPLC.

- Metanol Grado HPLC.
- Acetato de etilo.
- Silicagel.
- Carboximetilcelulosa.
- Principio activo de acetaminofeno.
- Citrato de sodio.
- Kit de Reactivo para dosar TGO Valtex.
- Kit de Reactivo para dosar TGP Valtex.
- Kit de Reactivo para dosar Fosfatasa Alcalina Valtex.
- Estándar DL- sulforafano Sigma Aldrich.

2.5.Otros

- Algodón.
- Espátulas.
- Gradillas.
- Papel filtro.
- Pinzas.
- Rejillas.
- Soportes Universales.
- Trípodes.
- Alcohol 97°.
- alcohol yodado.

2.6.Métodos

2.6.1.Liofilización del material vegetal

Se utilizaron las muestras refrigeradas mencionadas en el apartado 2.1.1. Se procedió a lavarlas con agua destilada y se eliminó el exceso de humedad. Posteriormente se coordinó con el operador del equipo de liofilización de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de San Agustín, quien realizó el proceso, entregándonos el producto final en bolsas herméticas (**Ver Anexo 1, Fotografía N° 2**), este se trituró en una licuadora a una velocidad constante (**Ver Anexo 1, Fotografía N°**

3). Además para lograr una máxima homogenización y obtener partículas más finas se procedió a pasar por un tamiz N°41 (**Ver Anexo1, Fotografía N° 4**).

2.6.2.Extracción del sulforafano a partir del glucosinolato-glucorafanina con diclorometano

Luego de obtener la muestra de brócoli liofilizada y tamizada, se procedió a pesar 1g de este y se disolvió en 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitado de 80 mL de capacidad, allí se colocó además una pastilla de agitador magnético pequeña y finalmente se dejó en el equipo de agitador magnético con calentador regulable a una velocidad constante y a una temperatura de 45°C, controlándose estos dos parámetros por espacio de 2 horas, retirando el vaso del equipo y se dejó enfriar por 5 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente llevarlo al equipo de filtración al vacío por 10 minutos y el extracto obtenido que fue de un tono verdusco se colocó en una pera de decantación (**Ver Anexo 1, Fotografía N° 5**), allí se le agregó 20 mL de diclorometano dejándose en reposo por 24 horas. Luego de este tiempo se observó claramente la existencia de dos fases, una acuosa y una orgánica, separamos la fase orgánica y desechamos la fase acuosa; puesto el compuesto que buscamos (sulforafano) es de naturaleza apolar y por tanto soluble en solventes orgánicos como el diclorometano.

2.6.3.Purificación en columna SPE

El extracto orgánico obtenido en la etapa anterior se purificó en un cartucho de 3 mL SPE (SiOH) de acuerdo al método de Bertelli et al.⁷⁵ El cartucho se activó pasando 3 mL de diclorometano, luego se pasó todo el extracto orgánico. A continuación se enjuagó el cartucho con 3 mL de acetato de etilo para eliminar las impurezas. Para eluir el sulforafano se pasaron 3 mL de metanol.

La solución colectada se secó con aire comprimido (se requirió aproximadamente media hora). El residuo se disolvió con 2 mL de acetonitrilo por sonicación durante 30 segundos, y el extracto se filtró a través de una membrana de celulosa de 0.45 µm. Para finalmente enrasarla en una fiola de 10 mL.

2.6.4. Identificación y cuantificación del sulforafano extraído del liofilizado de brócoli a partir del glucosinolato glucorafanina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la identificación y cuantificación del Sulforafano por cromatografía líquida de alta resolución HPLC-UV, (**Ver Anexo 1, Fotografía N° 6**).se establecieron las siguientes condiciones:

- Columna: Chromolith RP-18e 10 mm.
- Fase móvil: Para identificar el sulforafano se utilizó una solución isocrática metanol, acetonitrilo y agua en proporción de 15: 15: 70.
- Flujo: 1 mL/min.
- Detector: Ultravioleta-visible a 205 nm.
- Inyección: 20 μ L.
- Tiempo de corrida: 13 min.

De la muestra final obtenida en la etapa de purificación en columna SPE se utilizaron 20 μ L por cada inyección a la columna de HPLC (**Ver Anexo 1, Fotografía N° 7**).

2.6.5. Determinación de la linealidad

Sirve para determinar la proporcionalidad entre la concentración del principio activo y su respuesta en presencia de la matriz del producto.

Preparación del estándar

En una fiola de 10 mL se colocó los 10 mg del estándar de sulforafano al 88.3 % de pureza, se cubrió con papel aluminio, se enrasó con la mezcla disolvente y se sometió al ultrasonido por 10 minutos, (concentración de la mezcla de estándar: 883 mg/L o ppm).

Preparación de la curva de calibración

Se preparó una solución stock con el estándar de sulforafano, correspondiente a una concentración de 883 mg/L con mezcla disolvente hasta su completa disolución. A partir de esta solución se tomaron alícuotas de 28, 57, 114, 170 y 227 μ L, llevando a cada una de ellas a fiolas de 5 mL, enrasándolas con mezcla disolvente (metanol), obteniendo

concentraciones de 5, 10, 20, 30 y 40 mg/L respectivamente. Transferir estas soluciones a viales para HPLC y proceder a inyectar por duplicado.

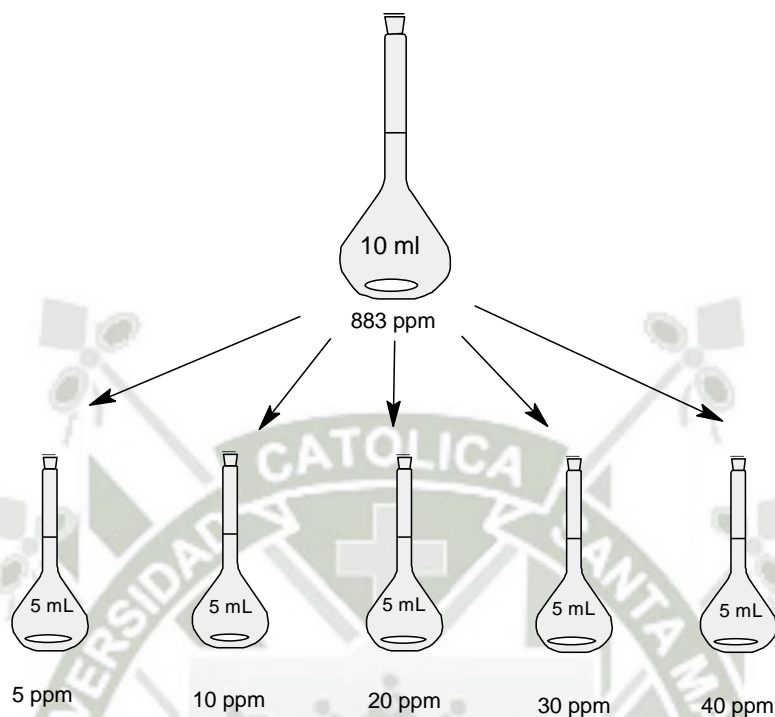


Figura N° 16: Preparación de la curva de calibración.

2.6.6. Determinación de la sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de **detección** y de **cuantificación**.

- Límite de **detección** corresponde, según la, USP XXX, a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc.),
- Límite de **cuantificación** corresponde, según la misma referencia, a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y se expresa también en unidades de concentración.

Análisis estadístico

Los límites de detección y cuantificación pueden estimarse a partir de la curva de regresión, siempre que se hayan considerado concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concentración cero.

Se determina la pendiente de la curva de calibración (concentración vs respuesta) en el rango apropiado: b

Se obtiene otra curva de calibración, leyendo cada punto por triplicado, pero en este caso para concentraciones menores de analito, determinándose la ecuación de esta nueva recta de calibración y se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco: Y_{bl}

Se determina la desviación estándar correspondiente a cada concentración del punto 2, se calcula la recta correspondiente a concentración vs s y se extrapola como en el caso anterior la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado S_{bl} correspondiente a la desviación estándar del Grupo Blanco,

Se calcula el límite de detección (3 desviaciones estándar del blanco) y el límite de cuantificación (10 desviaciones estándar del blanco) para n medidas individuales como:

Límite de Detección:

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

(Ecuación 1)

Límite de Cuantificación:

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

(Ecuación 2)

2.6.7. Determinación de transaminasas en muestra de suero sanguíneo

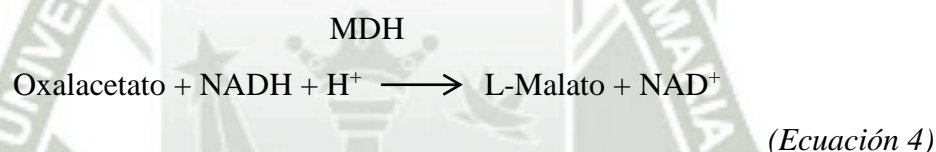
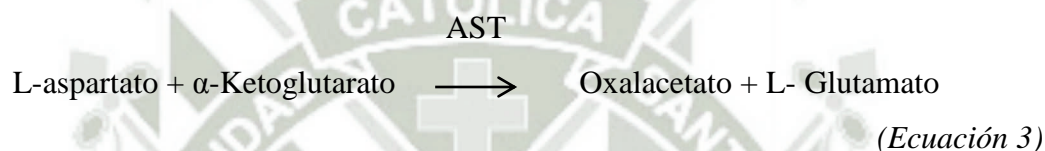
Se utilizó el espectrofotómetro Cary 60 de Agilent a 590 nm (Ver Anexo 1, Fotografía N° 17).

2.6.7.1. Determinación de transaminasa glutámico oxalacética (TGO)

Fundamento

El piruvato formado (el oxalacetato es inestable y se transforma en piruvato), reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidrazina produciéndose, en medio alcalino, un compuesto coloreado (2,4-dinitrofenolhidrazona) que se mide a 340 nm.

La GOT cataliza la siguiente reacción:



Procedimiento

- Procedimiento de dos reactivos: Se tomó del reactivo 1, 200 μL ; y del reactivo 2 50 μL .
- Mezclar, esperar 25 segundos y agregar 25 μL de muestra.
- Mezclar y después de 50 segundos de incubación, mida el cambio de absorbancia a 340 nm, durante 150 segundos.
- Cálculo para hallar la concentración :

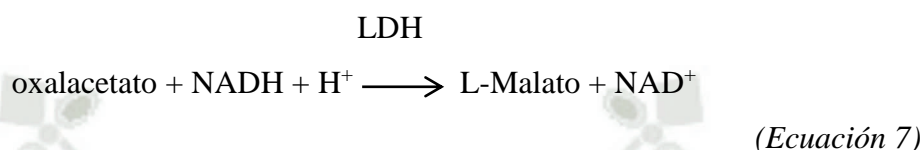
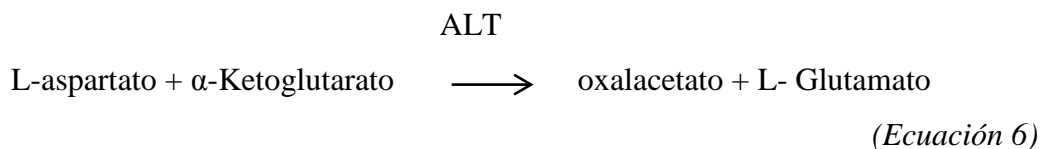
$$\text{Actividad (U/L)} = A/\text{min} \times 1746$$

(Ecuación 5)

2.6.7.2. Determinación de transaminasa glutámico pirúvica (TGP)

Fundamento

La TGP cataliza la siguiente reacción:



El piruvato formado (el oxalacetato es inestable y se transforma en piruvato), reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidrazina produciéndose, en medio alcalino, un compuesto coloreado (2,4-dinitrofenolhidrazona) que se mide a 340 nm.

Procedimiento

- Procedimiento de dos reactivos: Se tomó del reactivo 1, 200 μL ; y del reactivo 2 50 μL .
- Mezclar, esperar 25 segundos y agregar 25 μL de muestra.
- Mezclar y después de 50 segundos de incubación, mida el cambio de absorbancia a 340 nm, durante 150 segundos.
- Cálculo para hallar la concentración:

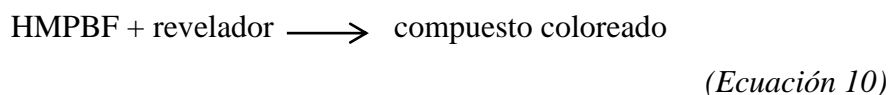
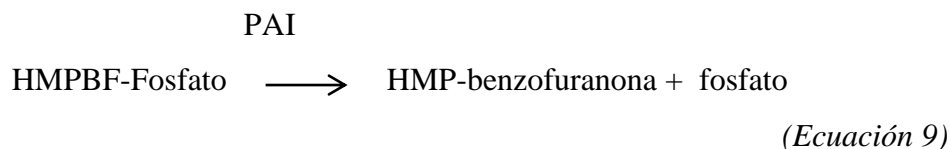
$$\text{Actividad (U/L)} = \text{A/min} \times 1746$$

(Ecuación 8)

2.6.7.3. Determinación de fosfatasa alcalina (FA)

Fundamento

La fosfatasa alcalina actúa sobre el HMP-benzofuranona fosfato en medio tamponado alcalino. Posteriormente, al agregar el reactivo revelador, se obtiene un cromógeno azul en forma proporcional a la concentración de enzima en la muestra.



Cálculos:

$$\text{Actividad (UI/L)} = \text{FACTOR} \times \text{Absorbancia muestra}$$

(Ecuación 11)

$$\text{FACTOR} = \frac{100}{\text{Absorbancia Standar}}$$

La Técnica que se utilizó para hallar los niveles de Fosfatasa alcalina en suero sanguíneo, se puede observar en la **Tabla N°7**:

Tabla N° 7: Procedimiento para determinar fosfatasa alcalina

TUBO	Blanco	Standard	Muestra
Buffer Fosfato μL	100	100	100
Preincubar 3 minutos a 37°C			
Agua Destilada μL	5	-----	-----
Solución Standard μL	-----	5	
Muestras	-----	-----	5
Mezclar e incubar EXACTAMENTE 10 minutos a 37°C			
Reactivo Revelador mL	0.5	0.5	0.5
Mezclar y leer las absorbancias a 590 nm. Llevando a cero el instrumento con el blanco reactivo.			

Fuente: Kit valtek de fosfatasa alcalina.

2.7. Obtención de muestra

Las muestras sanguíneas se obtuvieron por la técnica de Dartman, que consiste en la obtención de sangre del seno retro orbitario por punción capilar a nivel del ángulo interno del ojo del animal (**Ver Anexo 1, Fotografía N° 13**). Recolectando la sangre en endopercutores de 1.5 mL de capacidad hasta obtener también 1.5 mL de sangre, para proceder a centrifugarla a 5000 rpm por 5 minutos, y obtener el suero sanguíneo (**Ver Anexo 1, Fotografía N° 14**).

2.8. Etapa de experimentación

Las etapas de experimentación del presente estudio son las siguientes:

2.8.1. Aclimatación

Las ratas son aclimatadas antes de iniciar el presente estudio según el peso, que fue entre 290-320 g. Bajo las mismas condiciones ambientales con alimento *ad libitum*, la cual consistió en darles arroz cocido y agua a voluntad propia por día, la que se les proporcionó siempre a la misma hora.

Esta etapa se realiza siete días antes de la conformación de los grupos experimentales. Posteriormente son distribuidas aleatoriamente en cada grupo. Con lo cual se conformaron dichos grupos, cada grupo constituido por 7 animales.

2.8.2. Descripción de la prueba piloto para la administración de la suspensión de paracetamol y la suspensión de brócoli liofilizado en animales de experimentación.

Para la producción de la hepatotoxicidad y la determinación de la dosis de la suspensión de brócoli liofilizado se procedió a la aclimatación de los animales durante siete días con alimento y agua *ad libitum* para posteriormente proceder a:

Inducción de la toxicidad hepática experimentalmente

Posteriormente a la aclimatación de los animales se procedió a la división en dos grupos experimentales, cada grupo constituido por cuatro animales. Luego se tomó la primera muestra de sangre (Basal) donde las concentraciones de las tres enzimas

hepáticas se pueden observar en el **Anexo N° 9**. Después a cada grupo se le comenzó a administrar las dosis respectivas como se señalan a continuación; Al primer grupo se le administró una dosis tóxica de 500 mg/kg de peso durante siete días y al segundo grupo se le administró una dosis de 1000 mg/kg de peso de la suspensión de paracetamol por el mismo periodo de tiempo. Posteriormente se procedió a la segunda toma de muestra de sangre para hallar las concentraciones de las enzimas transaminasas y fosfatasa alcalina (**Ver Anexo N° 10**).

Determinación de la dosis de la suspensión de *Brassica olerácea* L. (Brócoli) liofilizado.

Luego de la aclimatación se dividió a los animales en dos grupos experimentales constituidos cada uno por cinco ratas a las dosis como se señala a continuación; al primer grupo se le administrará una dosis de 500 mg/kg de peso de brócoli liofilizado mientras que al segundo grupo se le administrará una dosis de 1000 mg/kg de peso. Se procedió a la toma de la primera muestra de sangre basal y donde las concentraciones de las tres enzimas se pueden observar en los **Anexos N° 7 y 8**. Y luego de la administración de las dosis respectivas a cada grupo se procedieron a realizar la segunda toma de muestra de sangre tras los siete días de tratamiento (**Ver Anexo N° 7 y 8**).

2.9. Métodos estadísticos

2.9.1. Parámetros de distribución Central

Promedio:

Valor que representa un conjunto de datos. Señala el centro de los valores, que es la suma de todas las medidas divididas por el número de medidas.

$$x = \frac{\sum x}{n}$$

(Ecuación 12)

Dónde:

Σx : Sumatoria del conjunto de datos.

n: Numero de datos.

2.9.2. Pruebas de significancia

El análisis de varianza (ANOVA) es una técnica estadística muy potente que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación. Un ANOVA de un factor contrasta la existencia de diferencias significativas entre medias cuando están presentes más de dos muestras.

Las fórmulas que se emplearon se pueden observar en la **Tabla N°8**:

Tabla N° 8: Fórmulas de análisis de varianza (ANOVA).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Estadístico F
Entre Tratamientos	K-1	SCE	$\frac{SCE}{K-1} = CME$	$\frac{CME}{CMD} = F$
Entre bloques o columnas	N-K	SCD	$\frac{SCD}{N-K} = CMD$	
Total	N-1	SCT		

Dónde:

N: n° de datos.

K: n° de grupos experimentales.

Para probar la significación en la relación F se recurre a tablas. Se analiza si el valor calculado para F es menor o mayor que el que se indica en tablas de acuerdo a los grados de libertad. En el primer caso, se concluirá que todos los grupos son iguales, en caso contrario se concluirá que no todos los grupos son iguales, entre algunos o todos existe una diferencia estadísticamente significativa.

Contraste de la Mínima Diferencia Significativa (LSD)

Este procedimiento fue sugerido por Fisher en 1935 y es el primer método de comparaciones múltiples que vamos a utilizar. Dicho procedimiento consiste en una prueba de hipótesis por parejas basada en la distribución t. Este método debe aplicarse cuando previamente se haya rechazado la hipótesis nula del test F del análisis de la varianza. Para ello, se determina el siguiente estadístico

$$LSD = t_{\left(\frac{\alpha}{2}; N-1\right)} \sqrt{\frac{2MSE}{n}}$$

(Ecuación 13)

Dónde:

$N - I$: el número de grados de libertad de la varianza residual.

$T_{\alpha/2; N-I}$: el valor crítico de la distribución t con $N - I$ grados de libertad que deja una probabilidad a su derecha igual a $\alpha/2$.

M : Son los grados de libertad.

n : Tamaño de la muestra de cada grupo.

T de student

En estadística, una **prueba t de Student**, **prueba t-Student**, o **Test-T** es cualquier prueba en la que el estadístico utilizado tiene una distribución t de Student si la hipótesis nula es cierta. Se aplica cuando la población estudiada sigue una distribución normal pero el tamaño muestral es demasiado pequeño como para que el estadístico en el que está basada la inferencia esté normalmente distribuido, utilizándose una estimación de la desviación típica en lugar del valor real. Es utilizado en análisis discriminante.

$$t = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}}$$

Dónde:

\bar{x}_1 : es la media del primer conjunto de datos

\bar{x}_2 : es la media del primer conjunto de datos

S_1^2 : es la desviación estándar del primer conjunto de datos

S_2^2 : es la desviación estándar del primer conjunto de datos

N_1 : es el número de elementos en el primer conjunto de datos

N_2 : es el número de elementos en el primer conjunto de datos



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES

El presente trabajo de investigación busca evaluar el efecto en la función hepática de *Brassica olerácea L.* a través de los niveles de las enzimas hepáticas (TGP, TGO y FA) en sangre usando animales de experimentación con toxicidad aguda experimental, para ello se inició con la búsqueda, análisis y selección bibliográfica donde no se encontró reportes de investigaciones sobre el efecto de *Brassica olerácea L.* en la función hepática. Por otra parte se hallaron investigaciones donde se desarrollan metodologías analíticas para determinar los niveles de sulforafano a partir de la hidrolisis del glucorafanina en brócoli por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), hallando fases móviles probables, obteniendo una concentración de 499.65 µg/g de sulforafano en brócoli fresco.^{67, 68, 69, 70,71}

Por los resultados satisfactorios de estas metodologías analíticas, dicha metodología fue considerada para el desarrollo del presente trabajo.

En el presente proyecto se utilizó brócoli liofilizado para la determinación de sulforafano usando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con un estándar de sulforafano (Chromadex) de 88.3 % de pureza.

3.1. Obtención del liofilizado de *Brassica olerácea L.* (Brócoli)

Después de obtener 1.5 kg de pellas y tallos secundarios de *Brassica olerácea L.* (Brócoli) procedentes del centro de abastos Andrés Avelino Cáceres, se procedió a su liofilización en la Facultad de Industria Alimentaria de la Universidad Nacional de San Agustín; obteniendo 250 g de brócoli liofilizado. Luego se homogenizó para luego tamizar la muestra en un tamiz N° 41, obteniendo un polvo fino del liofilizado de brócoli, el cual se almacenó teniendo la precaución de guardarlo en una frasco herméticamente cerrado y ausente de luz. Siendo el porcentaje de rendimiento del 17%.

3.2. Extracción de sulforafano en brócoli liofilizado

La extracción de sulforafano se realizó con diclorometano, ya que el sulforafano resulta muy soluble en este solvente, además gracias a su bajo punto de ebullición no es necesario llevarlo a altas temperaturas para su evaporación con lo que se evita la descomposición de sulforafano provocado por altas temperaturas.

3.3. Determinación de sulforafano por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para identificar y establecer las condiciones cromatográficas del método se procedió a preparar una solución estándar de 30 ppm de sulforafano, que fue analizada por Cromatografía Líquida de Alta Resolución usando una columna RP. 18e y como fase móvil acetonitrilo, metanol, agua en proporciones de 15:15:70 respectivamente, obteniéndose como resultado un pico simétrico, una vez que se establecieron las condiciones cromatográficas se procedió a analizar el extracto de brócoli liofilizado, obteniéndose un tiempo de retención de 3.67 min perteneciente a sulforafano lo cual fue corroborado con una prueba de adición de estándar de sulforafano (**Ver Figura N° 17**).

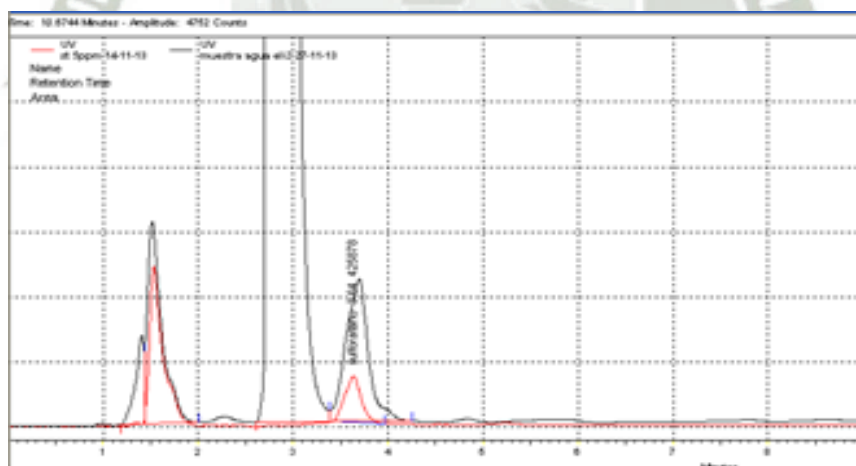


Figura N° 17: Cromatograma de muestra con estándar de sulforafano (30ppm) y estándar de sulforafano (30 ppm) solamente, superpuestas.

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas y la presencia de sulforafano en brócoli se procedió a cuantificar los niveles del mismo usando los siguientes parámetros:

3.4. Linealidad

En la **Tabla N°9**, se muestra el promedio de las tres curvas de calibración, que se prepararon a partir de una solución madre de cuya concentración fue de 883 mg/L de estándar de sulforafano.

Tabla N° 9: Promedio de las áreas de sulforafano

CONCENTRACION ppm	AREA 1	AREA 2	AREA 3	PROMEDIO	DS	DSR
5	367166	497609	585625	483466.670	109914.002	22.700
10	747185	830617	931017	836273.000	92046.422	11.000
20	1551829	1649467	1688071	1629789.000	70220.285	4.300
30	2336049	2404021	2459376	2399815.330	61770.972	2.600
40	3046413	3183766	3097327	3109168.670	69437.961	2.200

FUENTE: Elaboración propia

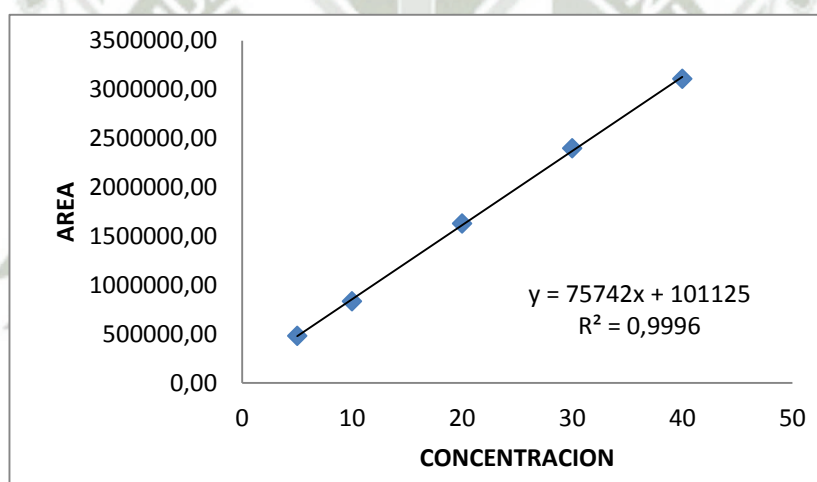


Figura N° 18: Gráfico de Calibración correspondiente sulforafano

En la **Figura N°18**, se muestra la curva de calibración correspondiente a la **Tabla N° 8**, obteniendo como resultado un coeficiente de correlación r^2 de 0.9996, siendo este superior a lo establecido por la USP ($r^2 > 0.995$) por lo tanto se afirma que existe una correlación lineal entre la concentración y el área.

De la **Figura N°18** también se puede obtener el valor de **A**: 101125 y **B**: 75742.

3.5. Sensibilidad

Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de **detección** y de **cuantificación**.

Se prepararon los estándares de sulforafano a concentraciones de 5, 10, 20, 30 y 40 ppm (**Ver Tabla N°9**). Para realizar la ecuación de la recta se tomaron los datos de la **Figura N° 18**, la cual fue construida con los promedios de las áreas de cada concentración que se corrieron por triplicado y se calculó la respuesta a concentración cero.

El valor de Y_{bl} es de 101125 y se obtiene por extrapolación de la respuesta a concentración cero y el valor de “b” es de 75742 que es el valor de la pendiente, siendo la ecuación de la recta: $y = 75742x + 101125$

Siguiendo con el procedimiento se determinó la desviación estándar de las áreas correspondientes a cada concentración, construyéndose una gráfica de sulforafano vs desviación estándar. Del mismo modo se halla la ecuación de regresión lineal a partir de estos datos: $y = -1178.2x + 105419$; donde el valor de S_{bl} se halla por extrapolación de la desviación estándar a concentración cero.

Con los datos obtenidos, se proceden a hallar los límites de detección y cuantificación como se ve a continuación:

➤ **LIMITE DE DETECCIÓN**

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$$

(Ecuación 14)

$$LD = \frac{101125 + 3(105419)}{75742} \times \frac{1}{\sqrt{5}}$$

$$LD = 2.46 \text{ ppm}$$

➤ **LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN:**

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b}$$

(Ecuación 15)

$$LC = \frac{101125 + 10(105419)}{75742} \times \frac{1}{\sqrt{5}}$$

$$LC = 6.82 \text{ ppm}$$

De este modo, se halla un límite de detección de 2.46 ppm, que representa la cantidad mínima de analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada por el método analítico que se propone; y un límite de cuantificación de 6.82 ppm que representa la cantidad mínima de analito que este método puede cuantificar con precisión y exactitud apropiada.

3.6. Determinación de sulforafano presente en brócoli liofilizado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Una vez determinadas la linealidad y precisión referente al estándar de sulforafano, se procede a determinar la concentración de éste en la muestra de brócoli liofilizado. La muestra se procesó por quintuplicado, obteniéndose como resultado las áreas y concentraciones de estas, observándose en la **Tabla N° 10**.

Tabla N° 10: Áreas y concentraciones de sulforafano en extracto de brócoli liofilizado

MUESTRA	AREA (mAU)	CONCENTRACION (mg/L)
1	2322745.5	29.331
2	2215169.0	27.911
3	2265169.0	28.571
4	2256009.5	28.450
5	2258282.9	28.138
PROMEDIO		28.480
DESVIACION ESTÁNDAR		0.542
RSD %		1.903

FUENTE: Elaboración propia

La concentración promedio de sulforafano en la suspensión de brócoli fue de 28.48 mg/L que equivale a 284.8 mg/kg de brócoli liofilizado.

Si:

$$\frac{28.480 \text{ mg}}{1 \text{ L}} \times 0.01 \text{ L} = 0.285 \text{ mg de sulforafano}$$

28.480 mg de sulforafano → 1 L de solución

x → 0.01 L

X = 0.285 mg de sulforafano

$$\frac{0.2848 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} = 284.8 \text{ mg/kg}$$

0.2848 mg de sulforafano → 1 g de brócoli

y → 1000 g de brócoli

y = 284.800 mg/kg de brócoli

Investigaciones previas ^{71, 72, 73, 74,75}, refieren que la concentración de sulforafano es aproximadamente 513 mg/kg de brócoli, mientras que en el brócoli liofilizado es de 284.8 mg, esto se puede deber a que la muestra liofilizada de brócoli durante el proceso de liofilización, haya disminuido la concentración de sulforafano; también se puede atribuir la diferencia a las condiciones y al tiempo de almacenamiento.

Sin embargo para el propósito del presente trabajo de investigación este valor es aceptable ya que la dosis de sulforafano requerida para el tratamiento es de 0.074 mg de sulforafano por 250 g de peso de rata (**Ver Anexo N°6**).

3.7. Prueba piloto para la determinación de la dosis de *Brassica oleracea* L. (Brócoli) administrado a los animales de experimentación

Con la finalidad de determinar una dosis apropiada para la administración del extracto del brócoli liofilizado, se procedió a formar dos grupos, cada uno conformado por 5 animales de experimentación (ratas), los cuales fueron aclimatados previamente con

alimento *ad libitum* por un periodo de 7 días, ambos grupos recibieron una dosis tóxica de paracetamol a una dosis de 1000 mg/kg durante 7 días.

A continuación al grupo N° 1 se le administró una dosis de 500 mg/kg de brócoli liofilizado por 7 días y al grupo N° 2 se le administró una dosis de 1000 mg/kg de brócoli por el mismo periodo de tiempo.

Posteriormente se obtuvieron los resultados de las tres enzimas hepáticas de los animales de experimentación (TGP, TGO, FA) a los que se les administró la dosis de 500 mg/kg de brócoli liofilizado, midiéndose la variación de las enzimas y reportándolas en la **Tabla N°11**, donde se puede observar el promedio, la desviación estándar y el sesgo concluyendo que los valores registrados para las tres enzimas hepáticas siguen una distribución normal.

Tabla N° 11: Análisis de TGP, TGO y FA basal y con tratamiento de brócoli liofilizado a dosis de 500 mg/Kg

	TGP		TGO		FA	
	Basal	7 Días	Basal	7 Días	Basal	7 Días
Recuento	5	5	5	5	5	5
Promedio	175.856+/- 9.255	173.128+/- 9.465	95.978+/- 9.105	94.690+/- 8.355	54.037+/- 15.354	53.662+/- 14.762
Mediana	175.27	170.28	97.998	95.281	49.37	49.481
Desviación Estándar	7.883	8.061	7.704	7.015	13.375	12.871
Varianza	62.1361	64.9826	59.3519	49.2078	178.878	165.654
Mínimo	167.390	165.050	87.110	86.500	41.732	41.574
Máximo	185.900	183.980	105.320	103.210	72.441	71.098
Sesgo Estand.	0.228	0.534	-0.098	-0.010	0.609	0.557
Curtosis Estand.	-0.95467	-0.873606	-0.980635	-0.958189	-0.811665	-0.878707

Fuente: Elaboración propia.

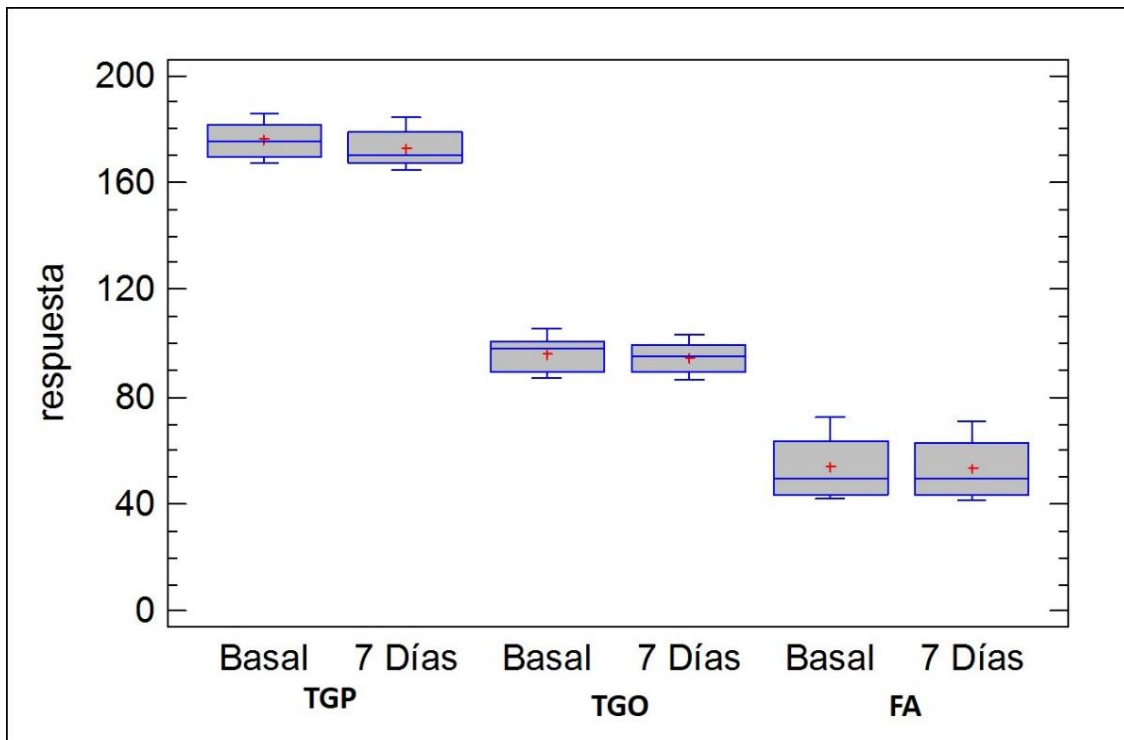


Figura N° 19: Valores promedio de TGP, TGO y FA basales y con tratamiento de brócoli a dosis de 500 mg/Kg

En la **Figura N° 19**, se puede observar la variación que presentaron las tres enzimas hepáticas con respecto a la toma basal y posterior a los siete días de administración de la dosis de 500 mg/kg de brócoli liofilizado, no notándose mayor decrecimiento en las tres enzimas. Así mismo se observa que la enzima TGP presenta un promedio mayor, seguido de TGO y finalmente FA, siendo necesario pruebas estadísticas para su confirmación.

Las comparaciones realizadas fueron hechas en base a la diferencia encontrada entre el valor final y el valor inicial de cada enzima, esto debido a que a pesar que los animales de experimentación fueron aclimatados los valores basales de las enzimas presentan ligeras variaciones, lo cual se puede considerar como error inherente al material experimental, por ello se trabajó con la variación reportada en los niveles de las enzimas luego de someter al animal a las diferentes sustancias.

En la **Tabla N°12**, podemos ver los promedios de las variaciones registradas en las enzimas hepáticas luego de aplicado los tratamientos, los cuales fueron: de -2.728 ± 1.598 para la enzima TGP, de -1.287 ± 1.343 para el caso de la enzima TGO y para la enzima FA fue de -0.375 ± 0.719 , con sus desviaciones estándares; 1.287, 1.081 y 0.579 para TGP, TGO y FA respectivamente. Y por último vemos el sesgo estandarizado, siendo para las tres enzimas hepáticas menor a 2, por lo que podemos confirmar que los datos tienen una distribución normal.

Tabla N° 12: Variación de las enzimas TGP, TGO y FA con tratamiento de brócoli liofilizado a dosis de 500 mg/Kg

	TGP	TGO	FA
Recuento	5	5	5
Promedio	-2.728 ± 1.598	-1.287 ± 1.343	-0.375 ± 0.719
Mediana	-2.34	-0.86	-0.158
Desviación Estándar	1.287	1.081	0.579
Varianza	1.6571	1.1696	0.3352
Mínimo	-4.990	-2.717	-1.343
Máximo	-1.920	-0.140	0.111
Sesgo Estandarizado	-1.865	-0.475	-1.454
Curtosis Estandarizada	1.9661	-0.8939	1.1612

Fuente: Elaboración propia.

En la **Figura N°20**, se observa los promedios de la variación de cada enzima para la dosis de 500 mg/kg de brócoli liofilizado, encontrándose que la variación generada en los valores de la enzima FA al cabo de siete días fue menor (-0.375) respecto a las otras dos enzimas estudiadas presentando un valor de, -1.287 y -2.728 para TGO Y TGP respectivamente.

Es importante aclarar que el signo negativo considerado es debido a la disminución de los valores de las enzimas transcurridas los siete días de tratamiento. Adicionalmente para el caso de la enzima TGP se observa un posible dato atípico el cual se encuentra fuera del límite inferior del diagrama de caja y bigote, realizando por ello la prueba de

Grubb de la cual se obtuvo un valor -p de 0.014 ($p < 0.05$) comprobándose que este correspondía a un dato aberrante, por lo tanto no se consideró en el análisis realizado.

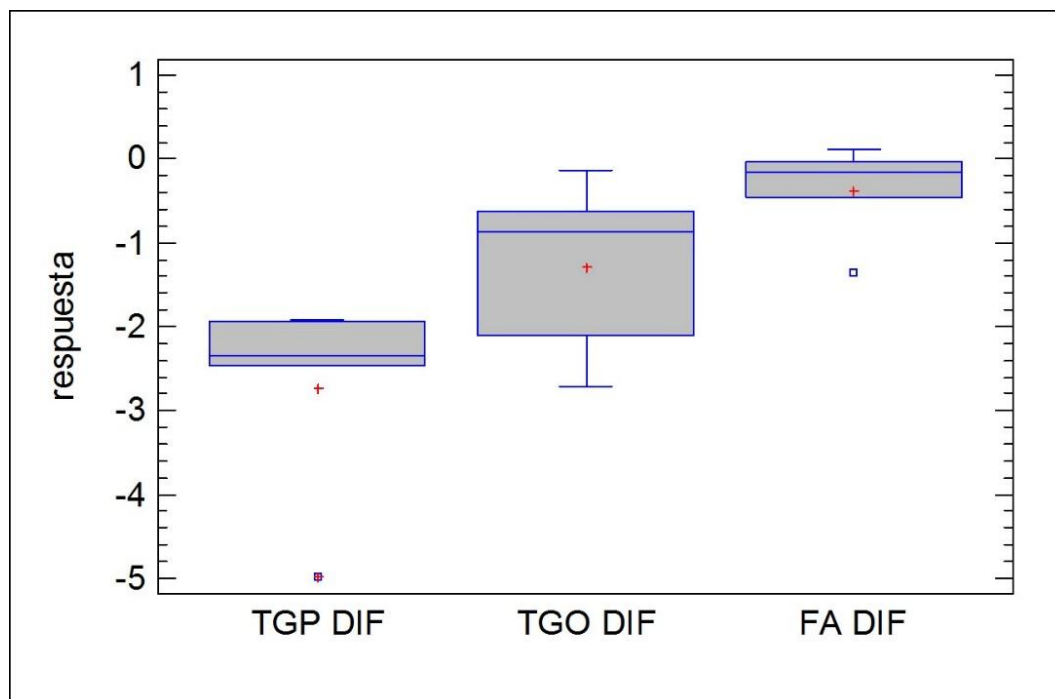


Figura N° 20: Diagrama de caja y bigotes de los valores promedio de la variación de las enzimas TGP, TGO y FA con tratamiento de brócoli a dosis de 500 mg/Kg

Tabla N° 13: Análisis de TGP, TGO y FA basal y con tratamiento de brócoli liofilizado a dosis de 1000 mg/Kg

	TGP		TGO		FA	
	Basal	7 Días	Basal	7 Días	Basal	7 Días
Recuento	5	5	5	5	5	5
Promedio	181.460+/- 9.29	151.37+/- 9.2	104.18+/- 9.57	76.84+/- 10.76	63.31+/- 16.34	40.07+/- 11.23
Mediana	183.155	152.125	105.315	81.368	64.567	39.623
Desviación Estándar	7.483	7.413	7.706	8.668	13.161	9.047
Varianza	55.9933	54.9508	59.3895	75.1301	173.205	81.8407
Mínimo	170.314	140.664	91.840	62.395	41.732	26.230
Máximo	189.616	160.981	111.091	83.077	75.276	50.197
Sesgo Estand.	-0.708	-0.312	-1.125	-1.476	-1.266	-0.739
Curtosis Estand.	0.05680	0.4580	0.6548	1.0369	0.98740	0.4499

Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente evaluamos los resultados obtenidos con la dosis de 1000 mg/kg de brócoli liofilizado, los datos los podemos observar en la **Tabla N°13**, los promedios, desviaciones estándar de cada enzima hepática evaluada y por último vemos el sesgo estandarizado de las muestras basales y tomadas a los siete días de tratamiento. Siendo este sesgo menor a 2, con lo que podemos concluir que los datos siguen una distribución normal.

En la **Figura. N° 21**, podemos evidenciar los valores promedio de las tres enzimas hepáticas basales y a los siete días de tratamiento, donde podemos percibir que los valores de las tres enzimas hepáticas (TGP, TGO y FA), tuvieron un decrecimiento notable posterior al tratamiento con brócoli liofilizado a una dosis de 1000 mg/kg.

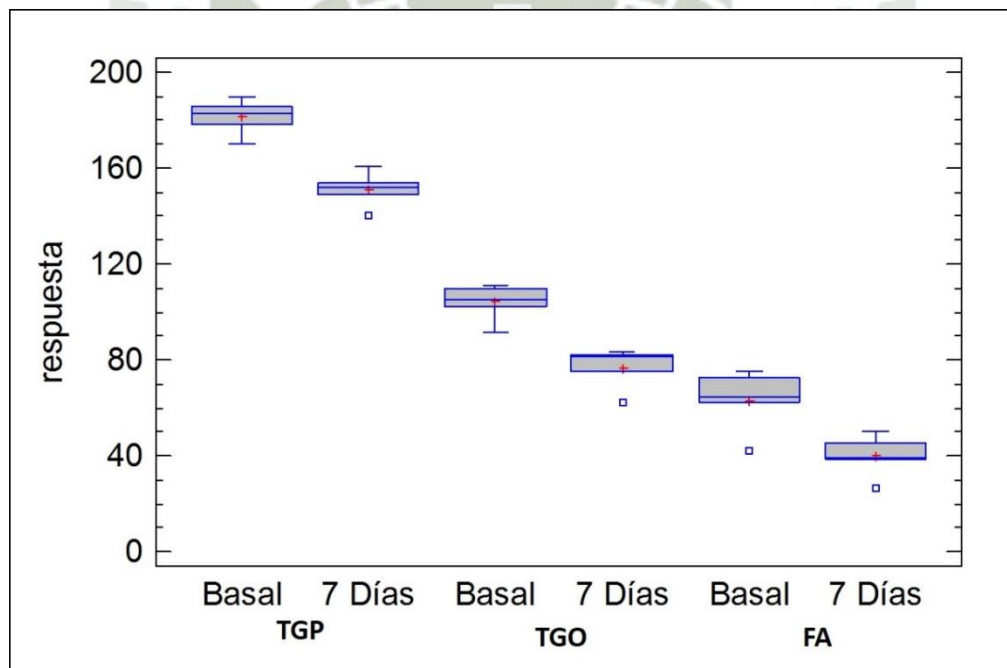


Figura N° 21: Valores promedio de TGP, TGO y FA basales y con tratamiento de brócoli liofilizado a dosis de 1000 mg/Kg

Una vez obtenidos los resultados posteriores al tratamiento por siete días con la dosis de 1000 mg/kg de brócoli liofilizado realizamos un análisis de la variación de las enzimas en estudio. Observándose en la **Tabla N° 14** los valores de los promedios, el cual fue para la enzima TGP de -30.088 ± 1.690 , de la enzima TGO de -27.335 ± 7.226 y de la enzima FA de -23.241 ± 5.645 , con sus desviaciones estándares de: 1.361, 5.820 y

4.547 respectivamente. También podemos ver que el sesgo estandarizado de cada enzima es menor a 2, por lo tanto podemos acotar que los datos siguen una distribución normal.

Tabla N° 14: Variación de las enzimas TGP, TGO y FA basal y con tratamiento de brócoli liofilizado a dosis de 1000 mg/Kg

	TGP	TGO	FA
Recuento	5	5	5
Promedio	-30.088+/-1.690	-27.335+/-7.226	-23.241+/-5.645
Mediana	-29.65	-28.823	-25.079
Desviación Estándar	1.361	5.820	4.547
Varianza	1.85298	33.8719	20.6714
Mínimo	-31.936	-34.889	-26.723
Máximo	-28.635	-19.571	-15.502
Sesgo Estandarizado	-0.493	0.122	1.602
Curtosis Estandarizada	-0.7282	-0.1474	1.4199

Fuente: Elaboración propia

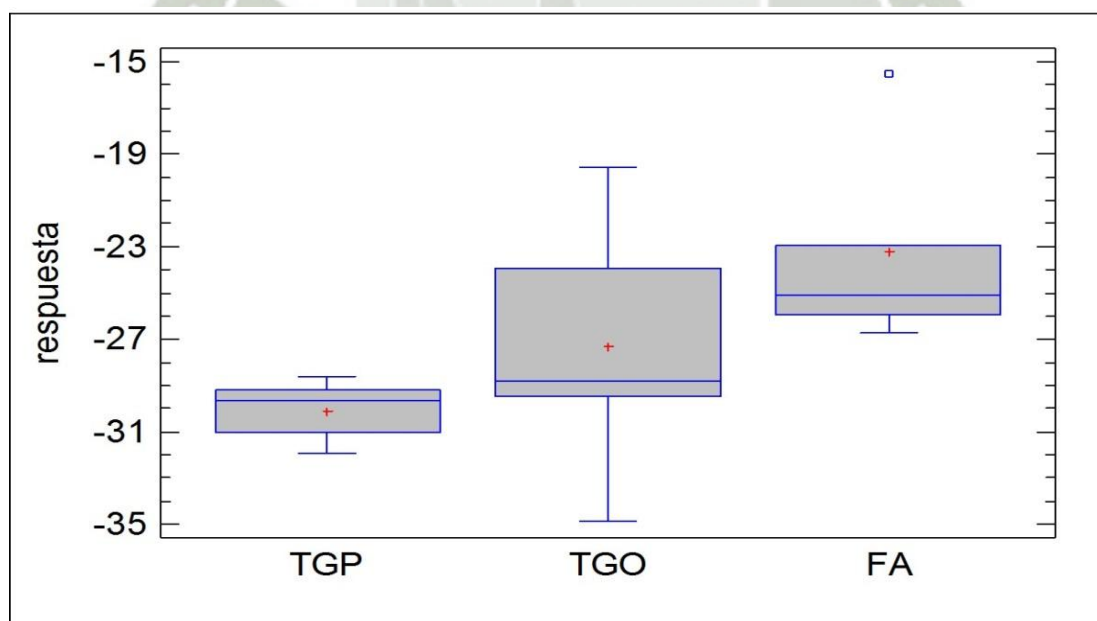


Figura N° 22: Diagrama de caja y bigotes de los valores promedio de la variación de las enzimas TGP, TGO y FA con tratamiento de brócoli a dosis de 1000 mg/Kg

En la **Figura. N° 22**, podemos notar la diferencia de la variación con respecto a los promedios hallados de las tres enzimas hepáticas evaluadas. Donde se puede observar que tuvieron un decrecimiento de dichas enzimas entre un rango de 23 y 31 UI/L de cada enzima evaluada en comparación a la dosis de 500 mg/kg (**Ver Figura. N° 22**).

Se puede observar que para el caso de la enzima FA tenemos un dato atípico al cual le realizamos la prueba de Grubb's, obteniéndose un valor -p de 0.063, comprobándose que no corresponde a un dato aberrante.

3.8. Evaluación estadística de las enzimas hepáticas de la prueba piloto para determinar la dosis adecuada de brócoli liofilizado

Después de la administración de la suspensión de brócoli liofilizado a las dosis de 500mg/kg de peso y de 1000 mg/kg de peso a ambos grupos experimentales procedimos con la evaluación estadística comparando ambas dosis y posteriormente se les realizó la prueba de t-student, los cuales presentaron diferencia significativa para el caso de las tres enzimas hepáticas: TGP, TGO y FA.

3.8.1. Transaminasa glutámico pirúvica (TGP)

Los resultados de los valores tomados posterior a los 7 días de tratamiento de ambos grupos, dosis de 500 mg/kg y dosis de 1000 mg/kg de brócoli liofilizado, para el caso de la enzima transaminasa glutámico pirúvica (TGP) se muestran en los **Anexos 7 y 8**.

Con los datos obtenidos se procedió a analizar la diferencia de los valores para esta enzima. Se muestran en la **Tabla N° 15**, los resultados del promedio, la desviación estándar y el sesgo estandarizado para el caso de las dosis de 500 mg/kg y de 1000 mg/kg. Siendo estas menores a 2 los cuales nos indican que nuestros datos siguen una distribución normal.

Previamente se plantearon las hipótesis correspondientes como se detallan a continuación.

Planteo de hipótesis.

H₀: Dosis 500 mg/kg = Dosis 1000 mg/kg.

H₁: Dosis 500 mg/kg < Dosis 1000 mg/kg.

Tabla N° 15: Diferencias en los valores de la enzima TGP a dosis de 500 y 1000 mg/Kg de brócoli.

	Dosis 500 mg/kg	Dosis 1000 mg/kg
Recuento	4	5
Promedio	-2.16 +/- 0.44	-30.08 +/- 1.69
Mediana	-2.135	-29.65
Desviación Estándar	0.278613	1.36124
Varianza	0.0776	1.8529
Mínimo	-2.46	-31.936
Máximo	-1.92	-28.635
Sesgo Estandarizado	-0.128219	-0.492622
Curtosis Estandarizada	-0.7282	-1.9903

Fuente: Elaboración propia.

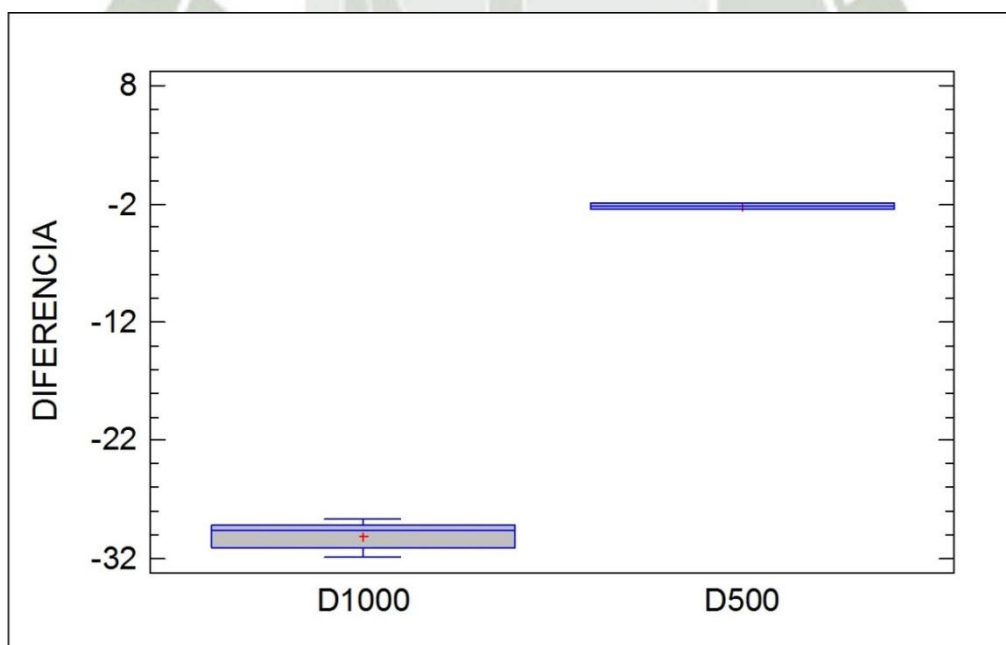


Figura N° 23: Diagrama de caja y bigotes de las diferencias producidas en los valores de la enzima TGP por dosis de 500mg/kg y 1000 mg/kg.

Posteriormente al realizar la prueba de t de student respectiva, sin suponer varianzas iguales, se obtuvo un valor p estadístico de $4.91616E-7$ (0.00000049), siendo este menor a 0.05, confirmando que si existe diferencia estadísticamente significativa a un 95% de confianza entre las dosis de 500 mg/kg y la de 1000 mg/kg de peso de brócoli liofilizado. Siendo la dosis de 1000 mg/kg, quien tuvo un decrecimiento significativo en esta enzima en comparación a la dosis de 500 mg/kg (**Ver Figura N° 23**), aceptando la hipótesis alternativa, donde nos señala la diferencia entre ambas dosis.

3.8.2. Transaminasa glutámico oxalacética (TGO)

De la misma forma que para el caso de la enzima transaminasa pirúvica se procedió a la segunda toma de la muestra de sangre posterior al tratamiento con las dosis de 500 mg/kg y 1000 mg/kg de brócoli liofilizado, y se determinaron los valores de esta enzima, los resultados se muestran en los **Anexos 7 y 8**.

En la **Tabla N° 16**, se muestran los resultados con respecto al promedio que fue de 1.2874 para la dosis de 500 mg/kg de brócoli liofilizado y para la dosis de 1000 mg/kg de brócoli liofilizado fue de 27.335, donde podemos ver que para el grupo al que se le administró la dosis de 1000 mg/kg de brócoli liofilizado tuvo un mayor decrecimiento en los valores de esta enzima. También podemos observar la desviación estándar y el sesgo estandarizado que para el caso ambas dosis fue menor a 2, lo que nos señala que los datos siguen una distribución normal. Seguidamente antes de realizar la prueba t-students se planteó las siguientes hipótesis:

Planteo de hipótesis.

H₀: Dosis 500 mg/kg = Dosis 1000 mg/kg.

H₁: Dosis 500 mg/kg < Dosis 1000 mg/kg.

Tabla N° 16: Diferencias en los valores de la enzima TGO a dosis de 500 y1000 mg/Kg de brócoli.

	Dosis 500 mg/kg	Dosis 1000 mg/kg
Recuento	5	5
Promedio	-1.2874	-27.335
Mediana	-0.86	-28.823
Desviación Estándar	1.08149	5.81995
Varianza	1.1696	33.8719
Mínimo	-2.717	-34.889
Máximo	-0.14	-19.571
Sesgo Estandarizado	-0.4747	0.1219
Curtosis Estandarizada	-0.8938	-0.1474

Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente se realizó la prueba de t- de student correspondiente a los niveles de TGO, tras los 7 días de tratamiento para ambas dosis. Obteniéndose como resultado un valor-p de 0.0000095787, siendo menor a 0.05, por lo tanto podemos aceptar la hipótesis alternativa, la cual señala que sí existe diferencia significativa entre la dosis de 1000 mg/kg de peso y la dosis de 500 mg/kg de peso de brócoli liofilizado (**Ver Figura N° 24**).

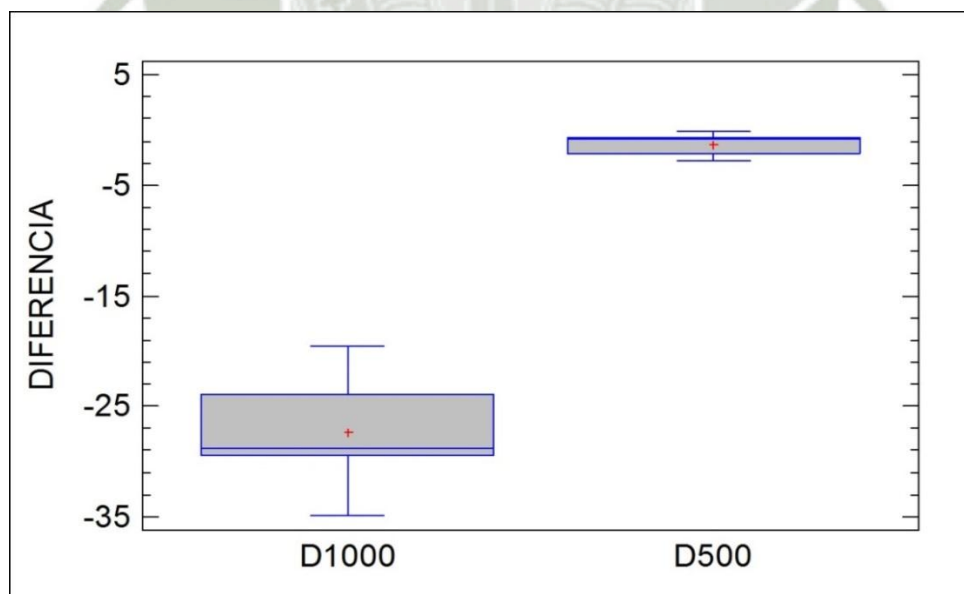


Figura N° 24: Diagrama de caja y bigotes de las diferencias producidas en los valores de la enzima TGO por dosis de 500mg/kg y 1000 mg/kg.

3.8.3. Fosfatasa alcalina

Siguiendo con el mismo procedimiento de las otras dos enzimas (TGP y TGO) que posterior a la administración de la dosis de 500 y 1000 mg/kg de peso de brócoli liofilizado, se procedió a la segunda toma de muestra de sangre y los resultados de los valores obtenidos para esta enzima se puede observar en los **Anexos 7 y 8**.

En la **Tabla N° 17**, se puede observar el valor del promedio que fue de -0.38 ± 0.71 , con una desviación estándar de 0.579009 y un sesgo de -1.45375 para la dosis de 500 mg/kg y para la dosis de 1000 mg/kg de brócoli liofilizado tuvo un promedio de -23.24 ± 5.65 , con una desviación estándar de 4.54658 y un sesgo de 1.60183.

Teniendo un promedio y una desviación estándar mayor la dosis de 1000 mg/kg de peso de brócoli liofilizado. Luego se procedió al planteamiento respectivo de las hipótesis como se señala a continuación:

Planteo de hipótesis.

H₀: Dosis 500 mg/kg = Dosis 1000 mg/kg.

H₁: Dosis 500 mg/kg < Dosis 1000 mg/kg.

Posteriormente se realiza la prueba t-student, correspondiente a los niveles de FA luego de los 7 días de tratamiento. Obteniéndose un valor P estadístico de 0.0003, siendo inferior a 0.05 con un nivel de confianza del 95%.

Por tanto se concluye que la dosis 1000 mg/kg de peso de brócoli liofilizado presenta un mayor decrecimiento de esta enzima que la dosis de 500 mg/kg de peso de brócoli liofilizado. (**Ver Figura N° 25**).

Tabla N° 17: Diferencias en los valores de la enzima FA a dosis de 500 y1000 mg/Kg de brócoli.

	Dosis 500 mg/kg	Dosis 1000 mg/kg
Recuento	5	5
Promedio	-0.38 +/- 0.71	-23.24 +/- 5.65
Mediana	-0.158	-25.079
Desviación Estándar	0.579009	4.54658
Varianza	0.3352	20.6714
Mínimo	-1.343	-26.723
Máximo	0.111	-15.502
Sesgo Estandarizado	-1.4537	1.6018
Curtosis Estandarizada	1.1612	1.4199

Fuente: Elaboración propia.

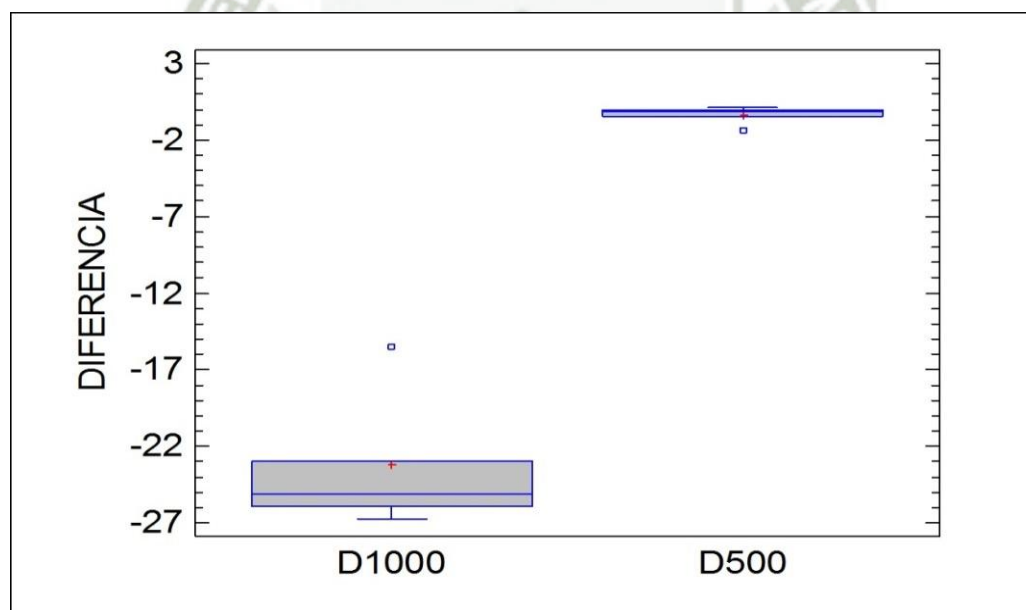


Figura N° 25: Diagrama de caja y bigotes de las diferencias producidas en los valores de la enzima FA por dosis de 500mg/kg y 1000 mg/kg.

Por lo tanto se establece que la dosis de 1000 mg/kg de peso de brócoli liofilizado es la adecuada, ya que después de haber realizado la prueba de t-student con cada una de las

tres enzimas; transaminasa glutámico pirúvica (TGP), transaminasa glutámico oxalacética (TGO) y fosfatasa alcalina (FA), mostraron resultados estadísticos menores a 0.050, aceptándose las hipótesis alternativas para el caso de las enzimas hepáticas; TGP y TGO, a excepción de la enzima FA la cual no presentó diferencia significativa. Por lo que se determinó utilizar dicha dosis en el desarrollo del presente proyecto.

3.9. Estudio del comportamiento de las enzimas hepáticas en animales de experimentación por intoxicación aguda con paracetamol y tratamiento con brócoli liofilizado

Una vez establecida la dosis de 1000 mg/kg de brócoli liofilizado como la dosis adecuada para el tratamiento de los grupos de estudio, la cual es equivalente a 0.074 mg de sulforafano, para un peso promedio de 250 gr. por rata, se tomó cinco grupos experimentales como se describe en la **Tabla N°6**.

A continuación se muestran los resultados hallados antes, durante y después de los tratamientos para los cinco grupos de estudio para el caso de las tres enzimas hepáticas. (Ver Anexos 11 al 19).

3.9.1. Transaminasa glutámico pirúvica (TGP)

Antes de la intoxicación con paracetamol y la administración de brócoli liofilizado se determinó las concentraciones basales para las tres enzimas hepáticas (TGP, TGO y FA) de los cinco grupos de estudio, tras siete días de aclimatación con alimento *ad libitum*, se procedió a su administración respectiva como se indica a continuación: al grupo brócoli se le administró una dosis de 1000 mg/kg de peso de brócoli liofilizado en solución acuosa, durante siete días; al grupo paracetamol se le administró una dosis de 1000 mg/kg de peso de paracetamol en suspensión por siete días; al grupo agua se les mantuvo en condiciones normales con alimento y agua *ad libitum*; al grupo experimental 1 (pre-tratamiento) se le administró una dosis 1000 mg/kg de peso de brócoli liofilizado en suspensión, durante siete días; y finalmente al grupo experimental 2 (post-ingestión) se le administró una dosis de 1000 mg/kg de peso de paracetamol en suspensión, por el mismo periodo de tiempo que a los demás grupos de estudio.

Tabla N° 18: Efecto de *Brassica oleracea* L. (Brócoli) sobre los niveles de TGP en ratas de experimentación basal y a los siete días.

	BASAL (U/L)	7 DIAS	Δ 7 DIAS
Grupo Brócoli	174.91+/-9.38	147.07+/-10.26	-27.84+/-8.94
Grupo Paracetamol	171.02+/-5.62	194.87+/-14.55	23.85+/-12.41
Grupo Agua	164.71+/-18.50	158+/-20.78	-6.71+/-6.27
Exp. 1 (pre-tratamiento)	177.98+/-8.29	152.14+/-9.32	-25.84+/-6.74
Exp.2 (post-tratamiento)	163.74+/-9.13	189.8+/-10.62	26.06+/-5.06

Fuente: Elaboración propia.

En la **Tabla N°18**, se puede ver el promedio y las desviaciones estándares de las concentraciones, correspondiente a la enzima transaminasa glutámico pirúvica de los cinco grupos de estudio presentando concentraciones basales entre un rango de 163.74 a 177.98 lo cual indica que no existe una gran variación entre las concentraciones de esta enzima en los animales de experimentación antes de iniciar con el trabajo de investigación.

Una vez determinado las concentraciones basales para la enzima transaminasa glutámico pirúvica, al grupo experimental 1 se le administró la suspensión de brócoli liofilizado (1000 mg/kg/día) en solución acuosa como pre-tratamiento antes de la intoxicación con la suspensión de paracetamol durante siete días, y al grupo experimental 2 se le administró una suspensión de paracetamol (1000 mg/kg/día) durante el mismo periodo de tiempo. Observándose que para el grupo experimental 1 tuvo un decrecimiento en sus valores al igual que el grupo brócoli, obteniéndose un promedio de -25.84+/-6.74 y llegando a estar por debajo de la concentración del grupo agua; mientras que el grupo experimental 2 presentó un aumento en su concentración al igual que el grupo paracetamol, obteniéndose un promedio de 26.06+/-5.06 para esta enzima y llegando a sobrepasar la concentración del grupo agua (**Ver Figura N°26**).

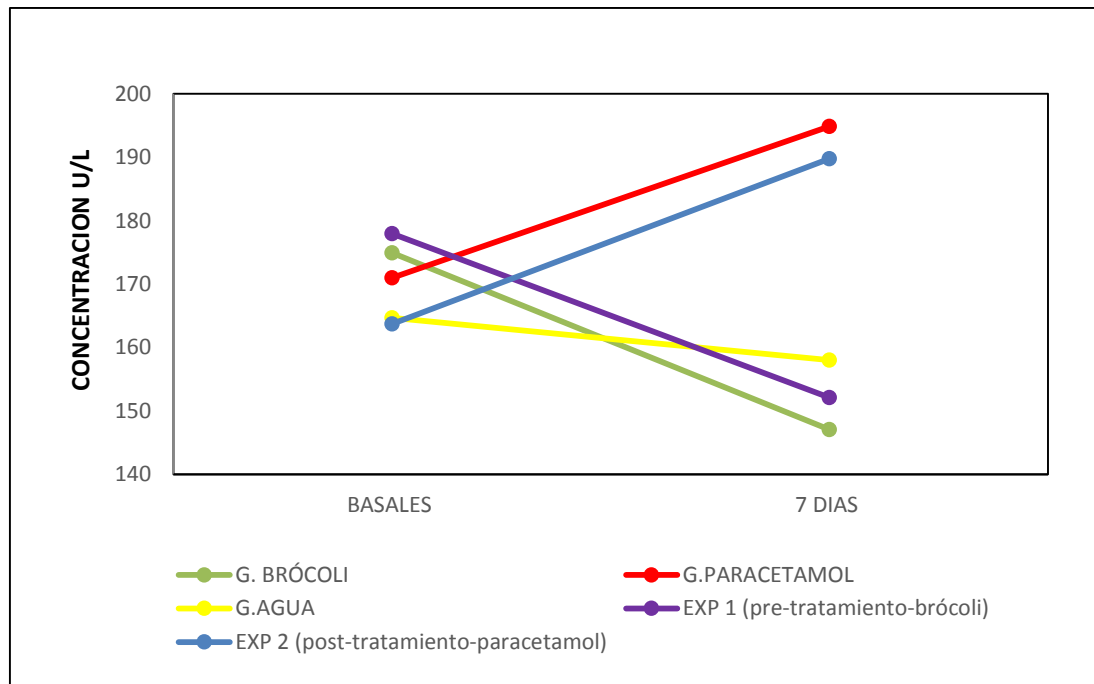


Figura N° 26: Valor promedio de la enzima TGP de las concentraciones basales y a los siete días de tratamiento.

A los catorce días el grupo experimental 1 (pre-tratamiento) recibe una dosis de paracetamol de 1000 mg/kg/día, mientras que el grupo experimental 2 (post-tratamiento) recibe una dosis de 1000 mg/kg/día de peso de brócoli liofilizado, observándose que los valores disminuyen con un promedio de -9.33 ± 7.68 (Ver Tabla N° 22) para el grupo experimental 2, mientras que el grupo experimental 1 tuvo un ascenso con un promedio de 4.44 ± 9.79 (Ver Tabla N° 21) en los valores de esta enzima.

Estos resultados nos indicarían que el grupo experimental 1 a pesar de que recibió la dosis de brócoli liofilizado antes de la intoxicación con paracetamol, los niveles de esta enzima aumentaron después de la administración con la suspensión de paracetamol por siete días, lo que nos demuestra que en los animales de experimentación al recibir la dosis de 1000 mg/kg de la suspensión de paracetamol, sufrieron una intoxicación hepática aguda, ya que a dosis terapéuticas, el paracetamol se metaboliza mediante reacciones de glucuronización y sulfatación que se producen principalmente en el

hígado, y los resultados son metabolitos solubles en agua que se excretan a través del riñón.

Pero como resultado de la intoxicación que fue durante siete días, la conversión metabólica del paracetamol por el sistema enzimático microsomal CYP-450, en el cual se forma un compuesto intermedio altamente reactivo, como es el N-acetil-p-benzoquinonemina o también denominado NAPQI (Mitchell et. al, 1973)⁷⁶, este NAPQI reacciona directamente con el glutatión (GSH) y en las sobredosis de paracetamol, el agotamiento de GSH fue inminente, lo que llevo a NAPQI a unirse a las proteínas celulares e iniciar la peroxidación lipídica, que conduce a lesión hepática (según Mitchell et al., 1973)⁷⁶, y como resultado se obtuvo la elevación en las concentraciones de esta enzima.

Según Larson et al., 2005 ⁷⁷ en investigaciones realizadas con paracetamol, a sobredosis puede causar insuficiencia hepática aguda en humanos, así como en animales de experimentación, y además que la intoxicación con paracetamol se ha convertido en la causa más común de insuficiencia hepática aguda.

Caso contrario sucedió con el grupo experimental 2, el valor de esta enzima luego de la administración de la suspensión de brócoli liofilizado tuvo un decrecimiento en los valores de esta enzima tras siete días de tratamiento (**Ver Figura N° 27**).

Esto puede deberse a que después de la administración de la suspensión de paracetamol se produjo una intoxicación pero tras la administración de sulforafano presente en el liofilizado del brócoli, éste sufrió metabolización hepática y dado que por su posible mecanismo de acción sobre la inducción de enzimas hepáticas de fase II, interrumpiría la interacción Nrf2- Keap 1 con el núcleo y por ende su translocación de éste al núcleo y la inducción de genes asociados como las enzimas antioxidantes glutatión S transferasa y quinona reductasa. Empezando así la metabolización del NAPQI por medio de dichas enzimas y su eliminación por la orina de los animales de experimentación. Lo cual explicaría el decrecimiento de las concentraciones de esta enzima en este grupo de experimentación.

En investigaciones recientes se han propuesto dos mecanismos principales para explicar la inducción de enzimas de fase II por sulforafano. Uno sería la interrupción de la interacción Nrf2 al núcleo y por ende su translocación de este al núcleo y la inducción de genes asociados mediante la unión del Nrf2 al elemento de respuesta antioxidante (ARE).

Según Gaona e Gaona L et al.⁷⁸ mostraron que el efecto hepatoprotector de sulforafano se asoció con la preservación de la mitocondria de función, enzimas antioxidantes y la prevención del estrés oxidativo mitocondrial contra el daño hepático inducido por cisplatino. Del mismo modo, también encontramos que Alp H et al.⁷⁹ mostró que el sulforafano proporciona beneficiosos efectos contra el estrés oxidativo causado por intoxicación aguda de Malathion en las ratas.

Estos resultados ponen en evidencia la efectividad que tiene el brócoli liofilizado sobre la reducción de la concentración de la enzima transaminasa glutámico pirúvica.

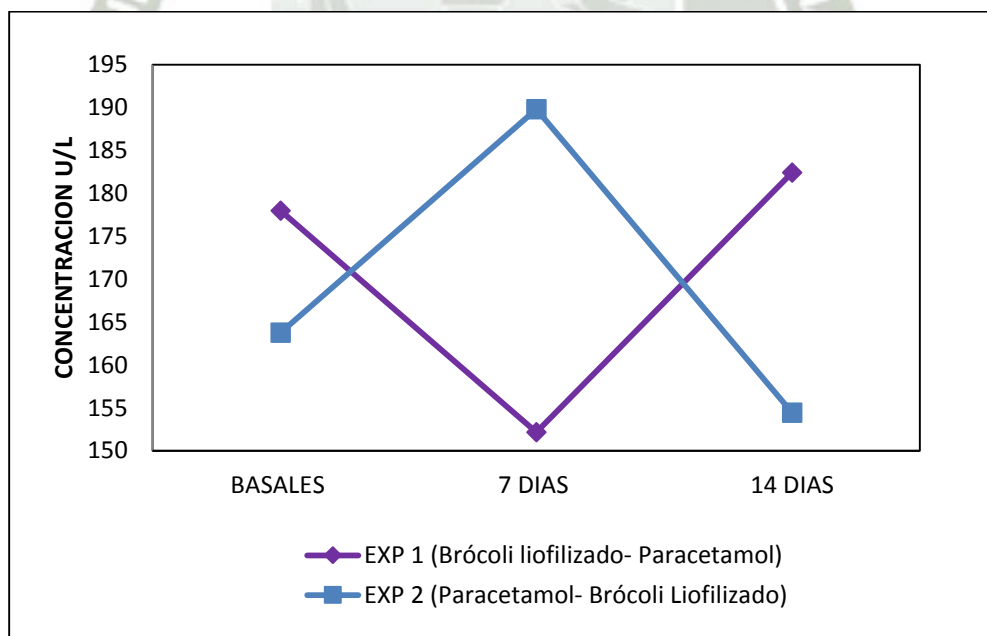


Figura N° 27: Valor promedio de la enzima TGP de las concentraciones basales, a los siete y catorce días de tratamiento para los grupos experimentales 1 y 2.

Tomando en cuenta los valores de la **Tabla N°18** y la **Figura N° 26**, numéricamente se puede determinar que la suspensión acuosa de brócoli liofilizado "*Brassica olerácea L*" administrada a los grupos experimentales 1 (pre-tratamiento), 2 (post-tratamiento) y al grupo brócoli, parece disminuir los niveles de la enzima transaminasa glutámico pirúvica (TGP) en relación al grupo paracetamol. Para corroborar dicha suposición se analizó estadísticamente los datos de esta enzima y se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA), con una ($p < 0.05$) para establecer si existe o no diferencia significativa entre las concentraciones promedio de esta enzima en todos los grupos de estudio.

Tabla N° 19: Análisis de varianza de las diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima TGP en los grupos de estudio.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	16814.6	4	4203.66	90.04	0.0000
Intra grupos	1353.84	29	46.6841		
Total (Corr.)	18168.5	33			

Fuente: Elaboración propia

Dónde:

H_0 ; si existe diferencia estadísticamente significativa.

H_1 ; no existe diferencia estadísticamente significativa.

En la **Tabla N° 19** y **Figura N° 28**, se puede determinar que se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en las concentraciones de esta enzima entre los cinco grupos de estudio, tras siete días de tratamiento. Encontrándose en el gráfico de cajas y bigotes una similitud en los grupos paracetamol y experimental 2, ya que recibieron la dosis de 1000 mg/kg de peso de la suspensión de paracetamol; mientras que las concentraciones de esta enzima en los grupos experimental 1 y grupo brócoli son semejantes; ya que recibieron el mismo tratamiento de la suspensión de brócoli liofilizado, inclusive fueron menores al grupo agua. También se puede observar en el **Figura N° 27**, un posible dato atípico por el cual se realizó la prueba de Grubbs', obteniéndose un p estadístico de

0.0001 ($p < 0.05$), comprobándose que éste correspondía a un dato aberrante, por lo tanto no se consideró en el análisis del estudio realizado.

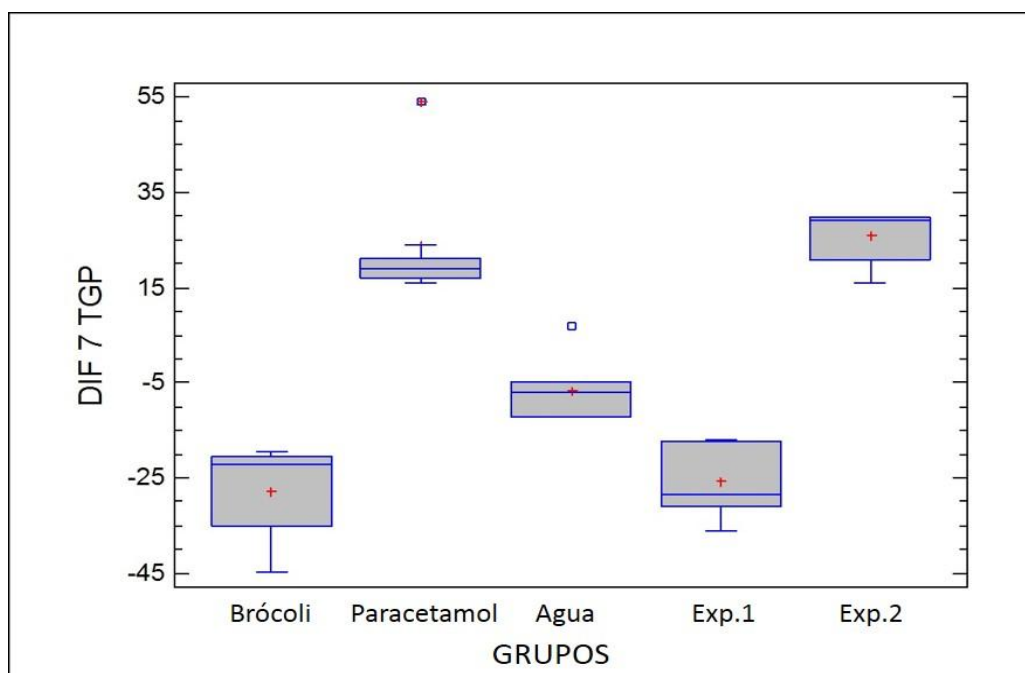


Figura N° 28: Diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima TGP en los grupos de estudio.

En la **Tabla N° 20**, se muestran los resultados de la prueba de Múltiples rangos mediante LSD para las diferencias producidas a los siete días. Estos datos muestran que los valores del grupo agua son estadísticamente significativos y diferentes al resto de los grupos ($p < 0.05$), esto es debido a que dicho grupo de estudio no fue sometido a ningún tratamiento ni cuadro de toxicidad aguda.

Mientras tanto los grupos experimental 1 y grupo brócoli no presentaron diferencia ya que recibieron la suspensión de brócoli liofilizado por lo que los valores de esta enzima disminuyeron. Mientras que el grupo experimental 2 y el grupo paracetamol no presentaron diferencia significativa en sus valores por lo que se establece que la administración por siete días de la suspensión de paracetamol aumentó considerablemente los niveles de la enzima transaminasa glutámico pirúvica.

Tabla N° 20: Prueba de Múltiples rangos mediante LSD para las diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima TGP en los grupos de estudio

Grupos	Casos	Δ 7 días
Grupo Brócoli	7	-27.84+/-8.94 ^a
Grupo Paracetamol	6	18.82+/-2.06 ^c
Grupo Agua	7	-6.71+/-6.27 ^b
Experimental. 1 (pre-tratamiento)	7	-25.84+/-6.74 ^a
Experimental.2 (post-tratamiento)	7	26.06+/-5.06 ^c

Posteriormente se evaluó esta enzima a los catorce días de tratamiento para los grupos experimentales 1 (pre-tratamiento) y 2 (post-tratamiento) y se les procedió a realizar el análisis estadístico t de student para establecer si existe o no diferencia significativa entre las concentraciones promedio de la enzima transaminasa glutámico pirúvica a los siete y catorce días de tratamiento como se observa en la **Tabla N° 21 y 22**.

Tabla N° 21: Comparaciones entre las diferencias reportadas a los siete días y a los 14 días para cada enzima hepática en el grupo experimental 1 (pre-tratamiento).

	TGP	
	<i>DIF. D7</i>	<i>DIF. D14</i>
Recuento	7	7
Promedio	-25.84+/-6.74	4.44+/-9.79
Mediana	-28.635	9.603
Varianza	53.1326	112.045
Desviación Estándar	7.2892	10.5851
Mínimo	-36.046	-12.92
Máximo	-16.936	15.905
Sesgo Estandarizado	0.0794336	-0.724009
Curtosis Estandarizada	-0.817223	-0.451111
T		-6.23284
Valor-P		0.00004

Tabla N° 22: Comparaciones entre las diferencias reportadas a los siete días y a los 14 días para cada enzima hepática en el grupo experimental 2 (post-tratamiento).

	TGP	
	<i>DIF. D7</i>	<i>DIF. D14</i>
Recuento	7	7
Promedio	26.06+/- 5.05	-9.3+/-7.68
Mediana	29.093	-10.096
Varianza	29.9151	68.987
Desviación Estándar	5.46947	8.30584
Mínimo	16.094	-20.335
Máximo	29.919	4.889
Sesgo Estandarizado	-1.49726	0.594329
Curtosis Estandarizada	0.279235	0.186521
T	9.4139	
Valor-P	0.0000	

En la **Tablas N° 21 y 22**, podemos observar el valor-P = 0.0000, donde se muestran que las comparaciones realizadas de esta enzima hepática a los dos grupos experimentales (pre y post-tratamiento) a los días 7 y 14 presentaron diferencia significativa, siendo el valor- p de 0.0000 ($p < 0.05$) con un nivel del 95% de confianza.

Aquí se puede mostrar el estrés oxidativo ocasionado por intermedios como el metabolito tóxico del paracetamol (NAPQI), ya que se vio reflejado en el grupo experimental 1 en el momento de los 7 días de administración de la suspensión de paracetamol a pesar que previamente se le administró el liofilizado de brócoli, puesto que los niveles de este marcador enzimático se elevaron; por otro lado en el caso del grupo experimental 2, el cual primero fue intoxicado y posteriormente administrado con el liofilizado del brócoli, la intervención oportuna del sulforafano como antioxidante exógeno aumentó el sistema de defensa celular, lo que previno los efectos nocivos sobre macromoléculas celulares, y esto se demostró por el descenso de los valores de esta enzima.

3.9.2. Transaminasa glutámico oxalacética (TGO)

En lo referente al efecto del brócoli liofilizado sobre los niveles de la enzima transaminasa glutámico oxalacética, se observa en la **Tabla N° 23**, los valores basales de los cinco grupos de estudio que no mostraron diferencia estadística, fluctuando sus promedios entre 93.52 +/- 6.50 a 102.47 +/- 6.52.

Tabla N° 23: Efecto de *Brassica oleracea* L. (Brócoli) sobre los niveles de TGO en ratas de experimentación basal y a los siete días.

	BASAL (U/L)	7 DIAS	Δ 7 días
Grupo Brócoli	99.59+/-5.29	79.6+/-5.00	-19.99+/-4.09
Grupo Paracetamol	95.25+/-6.96	132.55+/-9.04	37.3+/-9.48
Grupo Agua	99.25+/-6.32	99.23+/-11.21	-0.02+/-5.57
Exp.1 (pre-tratamiento)	102.47+/-6.52	77.78+/-10.5	-24.69+/-8.38
Exp.2 (post-tratamiento)	93.52+/-6.5	122.83+/-5.07	29.31+/-8.69

Fuente: Elaboración propia.

Una vez determinado las concentraciones basales para la enzima transaminasa glutámico oxalacética, al grupo experimental 1 se le administró la suspensión de brócoli liofilizado (1000 mg/kg/día) en solución acuosa como pre-tratamiento antes de la intoxicación con la suspensión de paracetamol durante siete días, y al grupo experimental 2 se le administró una suspensión de paracetamol (1000 mg/kg/día) durante el mismo periodo de tiempo.

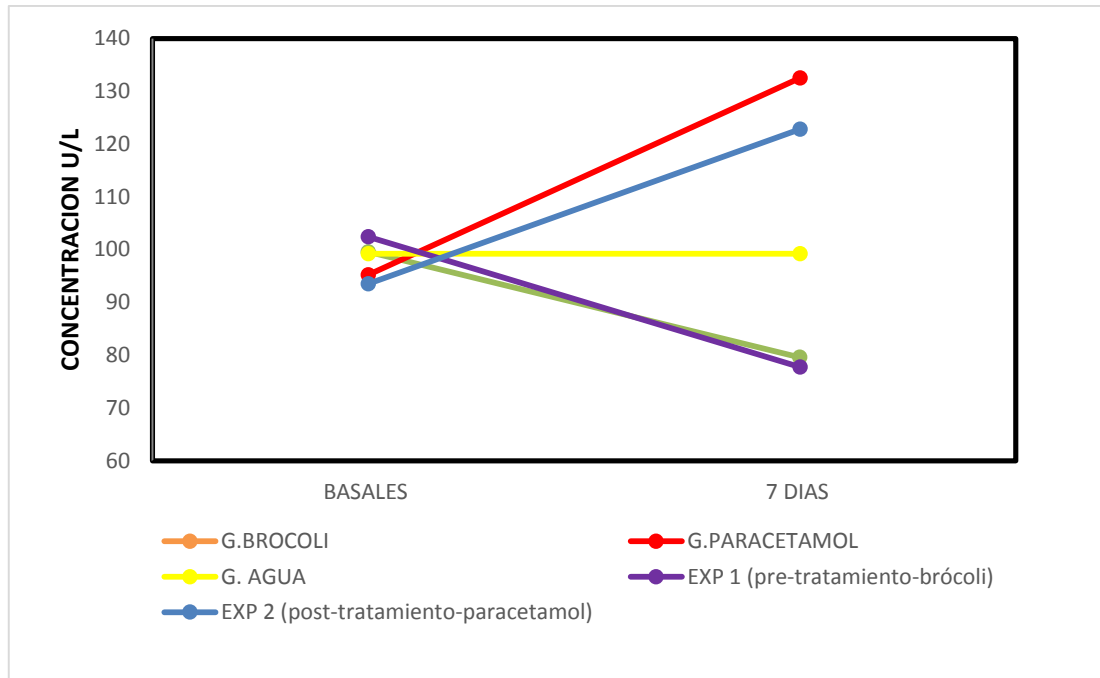


Figura N° 29: Valor promedio de la enzima TGO de las concentraciones basales y a los siete días de tratamiento.

Observándose que para el grupo experimental 1 tuvo un decrecimiento en sus valores, obteniéndose un promedio de 77.78 ± 10.5 , mientras que el grupo experimental 2 presentó un aumento en su concentración obteniéndose un promedio de 122.83 ± 5.07 para esta enzima (Ver Figura N° 29).

A los 14 días de tratamiento se muestra como resultado un aumento en la concentración de la enzima TGO para el caso del grupo experimental 1 con un promedio de 29.57 ± 6.10 (Ver Tabla N° 26) esto se explica debido a que se les administró la suspensión de paracetamol a dosis de 1000 mg/kg ocasionándole una intoxicación hepática aguda, caso contrario ocurrió con el grupo experimental 2 el cual tuvo un promedio de 19.81 ± 2.46 (Ver Tabla N° 27), dicho promedio fue gracias a que se les estuvo administrando brócoli liofilizado a dosis de 1000 mg/kg.

Sin embargo posterior a los catorce días de administración para el caso de los dos grupos experimentales 1 (pre-tratamiento) y 2 (post- tratamiento), sufrieron modificaciones importantes en la concentración de dicha enzima como se puede

observar en la **Figura N° 30**, se pueden interpretar de la siguiente forma: que para el grupo experimental 1 (pre-tratamiento) después de haber recibido la suspensión de paracetamol, esta enzima tuvo un aumento en su concentración, esto se puede deber como ya se mencionó anteriormente a los metabolitos tóxicos formados a partir de la metabolización del paracetamol, es decir cuando se estuvo administrando la suspensión de paracetamol ya no se encontraban cantidades apreciables de sulforafano en el metabolismo del animal para poder ser eliminado por su mecanismo de inducción de reacciones de enzimas de fase II en la eliminación de metabolitos tóxicos.

Para el caso del grupo experimental 2, a quien se le administró primero la suspensión de paracetamol y consiguientemente brócoli liofilizado, a los 14 días demostró haber decrecido, nótese que al ingresar a nuestro organismo un agente extraño (tóxico) se activan reacciones de metabolización que permiten a estos eliminarlos cuanto antes del cuerpo, por lo tanto cuando se le administró la dosis tóxica de paracetamol a este grupo experimental Como resultado de la conversión metabólica del paracetamol por el sistema enzimático microsomal CYP-450, se formó un intermediario altamente reactivo que es el N-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI), metabolito tóxico del paracetamol. NAPQI reacciona directamente con el glutatión para ser eliminado paulatinamente (Mitchell et al., 1973)⁷⁶. Sin embargo el agotamiento del glutatión celular se produjo pero con la administración del brócoli liofilizado, el efecto del sulforafano ha indicado que aumenta las enzimas antioxidantes de fase II y la expresión génica tanto del glutatión, como quinona oxidoreductasa y hemoxigenasa según el estudio de Riedl et al.⁷⁹ y por tanto la eliminación del metabolito tóxico fue mayor, esto explica el decrecimiento notable de la enzima TGO en este grupo experimental.

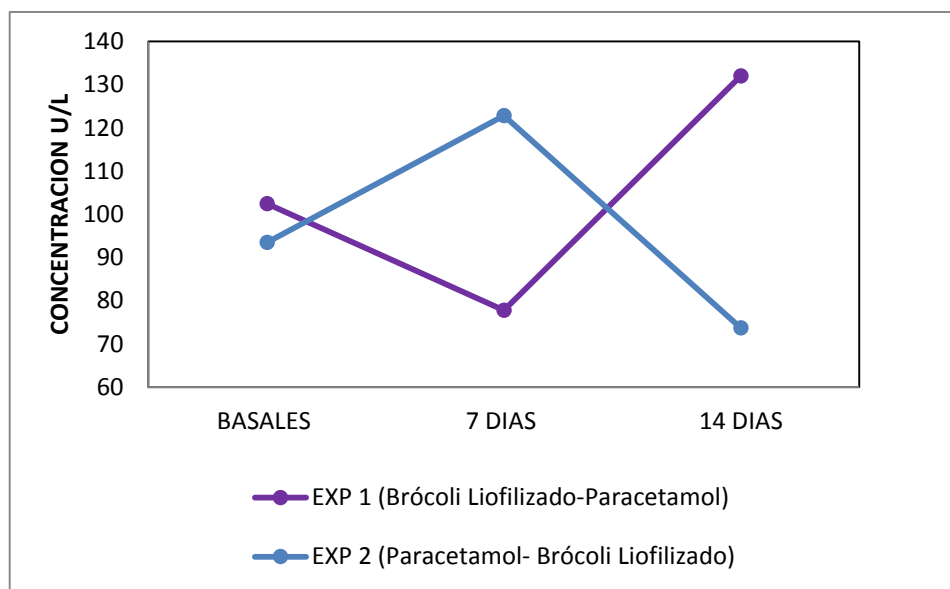


Figura N° 30: Valor promedio de la enzima TGO de las concentraciones basales, a los siete y catorce días de tratamiento para los grupos experimentales 1 y 2.

Los resultados mostrados tanto en la **Tabla N°23** como en el **Figura N° 29**, evidencian que la suspensión acuosa de brócoli liofilizado administrada a los grupos experimentales 1 (pre-tratamiento), y al grupo brócoli, parece disminuir los niveles de la enzima transaminasa oxalacética pirúvica (TGO) en relación al grupo paracetamol. Para corroborar dicha suposición se analizó estadísticamente los datos de esta enzima y se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA), con una ($p < 0.05$) para establecer si existe o no diferencia significativa entre las concentraciones promedio de esta enzima en todos los grupos de estudio.

Tabla N° 24: Análisis de varianza de las diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima TGO en los grupos de estudio.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	22141.3	4	5535.31	83.51	0.0000
Intra grupos	1988.39	30	66.2796		
Total (Corr.)	24129.6	34			

Dónde:

H_0 ; si existe diferencia estadísticamente significativa.

H_1 ; no existe diferencia estadísticamente significativa.

En la **Tabla N° 24** y **Figura N° 31**, se encontraron datos que nos llevan a afirmar que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en las concentraciones de esta enzima entre los cinco grupos de estudio, tras siete días de tratamiento. Observándose en el gráfico de cajas y bigotes de los grupos paracetamol y experimental 2 se asemejan en sus valores, esto ocurrió puesto que recibieron según el esquema de tratamiento por 7 días la dosis de 1000 mg/kg de peso de la suspensión de paracetamol; por otro lado sucedió algo semejante con las concentraciones de esta enzima en los grupos experimental 1 y grupo brócoli; ya que recibieron por 7 días tratamiento la suspensión de brócoli liofilizado.

Cabe notar que los valores de las concentraciones de los grupos experimental 1 y grupo brócoli decrecieron inclusive por debajo de los valores del grupo agua, la razón de este hecho reposa en que en individuos que no están expuestos a ningún tóxico que active las enzimas encargadas de la desintoxicación del hígado, el compuesto sulforafano actúa de la misma manera disminuyendo los niveles de esta enzima TGO.

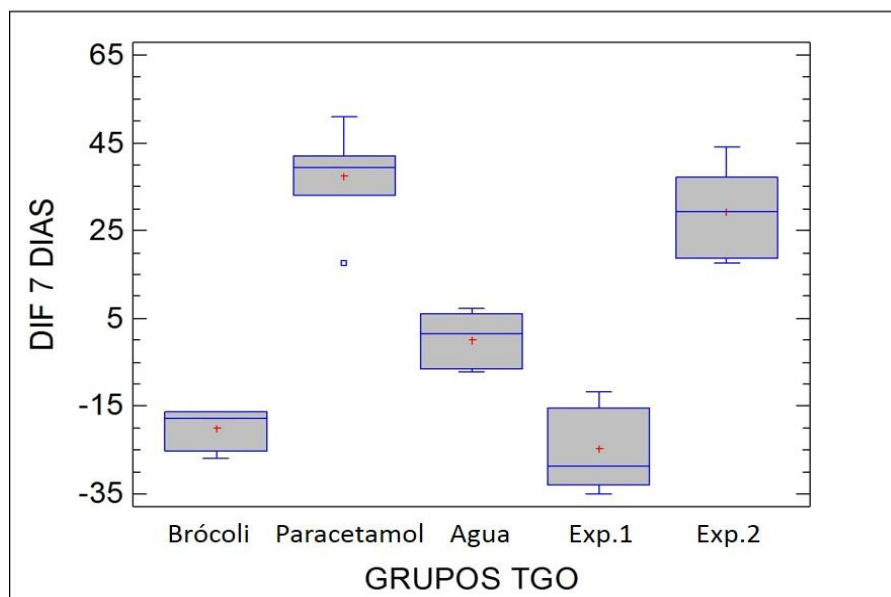


Figura N° 31: Diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima TGO en los grupos de estudio.

Se estableció que existen diferencias significativas en los cinco grupos de estudio, sin embargo es importante saber entre que grupos existen estas diferencias para ello se realizó la prueba de Múltiples rangos mediante LSD, los resultados se muestran en la **Tabla N° 25**.

Estos datos muestran que los valores del grupo control negativo son estadísticamente significativos y diferentes al resto de los demás grupos ($p < 0.05$), esto es debido a que dicho grupo de estudio no fue sometido a ningún tratamiento ni cuadro de toxicidad aguda.

Por otro lado, los grupos experimental 1 y grupo brócoli no presentaron diferencia significativa ya que recibieron la suspensión de brócoli liofilizado por lo que los valores de esta enzima disminuyeron. De la misma manera ocurrió con los grupos experimental 2 y grupo paracetamol puesto que no presentaron diferencia significativa en sus valores ya que se les administraron por siete días la suspensión de paracetamol lo que aumentó considerablemente los niveles de la enzima transaminasa glutámico oxalacética.

Tabla N° 25: Prueba de Múltiples rangos mediante LSD para las diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima TGO en los grupos de estudio.

Grupos	Casos	Δ 7 días
Grupo Brócoli	7	-19.99+/-4.09 ^a
Grupo Paracetamol	6	37.3+/-9.48 ^c
Grupo Agua	7	-0.02+/-5.57 ^b
Experimental. 1 (pre-tratamiento)	7	-24.69+/-8.38 ^a
Experimental.2 (post-tratamiento)	7	29.31+/-8.69 ^c

De la misma manera que se analizó para el caso de la enzima TGP, se evaluó esta enzima TGO a los catorce días de tratamiento para los grupos experimentales 1 (pre-tratamiento) y 2 (post-tratamiento) y se les procedió a realizar el análisis de t-student para establecer si existe o no diferencia significativa entre las concentraciones promedio de la enzima TGO a los catorce días de tratamiento como se observa en la **Tabla N° 26** y **27**.

Tabla N° 26: Comparaciones entre las diferencias reportadas a los siete días y a los 14 días para cada enzima hepática en el grupo experimental 1 (pre-tratamiento).

	<i>TGO</i>	
	<i>DIF. D7</i>	<i>DIF. D14</i>
Recuento	7	7
Promedio	-24.691+/-8.38	29.57+/-6.10
Mediana	-28.823	30.189
Varianza	82.1202	43.5499
Desviación Estándar	9.06202	6.59923
Mínimo	-34.889	20.285
Máximo	-11.698	38.508
Sesgo Estandarizado	0.444653	-0.456907
Curtosis Estandarizada	-0.942683	-0.439911
T	-12.8054	
Valor-P	0.0000	

De acuerdo a la **Tabla N° 26**, se obtiene un valor-P = 0.0000. Lo que nos sugiere que existe diferencia estadísticamente significativa al 95% de confianza entre las diferencias encontradas al día 7 y al día 14 para el grupo experimental 1 (pre-tratamiento), es decir que los valores encontrados al día 14 aumentaron significativamente respecto a los valores encontrados al día 7, esto se explica debido a que los 7 primeros días se les administró el liofilizado de brócoli por tanto sus valores de TGP, TGO y FA disminuyeron, los siguientes 7 días se les administró la suspensión de paracetamol, sin embargo a pesar de haber recibido previamente el brócoli liofilizado no impidió que los valores de estas enzimas se elevaran al administrar el paracetamol.

Cabe resaltar que el signo negativo del promedio de la diferencia a los 7 días es debido a que estos valores disminuyen y no afectan matemáticamente el estudio estadístico.

Tabla N° 27: Comparaciones entre las diferencias reportadas a los siete días y a los 14 días para cada enzima hepática en el grupo experimental 2 (post-tratamiento).

	<i>TGO</i>	
	<i>DIF. D7</i>	<i>DIF. D14</i>
Recuento	7	7
Promedio	29.31+/-8.68	-19.81+/-2.46
Mediana	29.381	-19.476
Varianza	88.272	7.08465
Desviación Estándar	9.39532	2.6617
Mínimo	17.682	-24.888
Máximo	43.999	-16.683
Sesgo Estandarizado	0.268158	-1.28461
Curtosis Estandarizada	-0.295838	0.982378
T	13.3072	
Valor-P	0.0000	

Consiguientemente se realizó también la comparación entre las diferencias de los días 7 y 14 para el caso del grupo experimental 2, los resultados estadísticos se muestran en la **Tabla N° 27**, donde el valor-P = 0.0000, demostrando así que existe diferencia estadísticamente significativa al 95% de confianza, esto es debido a que los 7 primeros días este grupo recibió la suspensión de paracetamol lo que les ocasionó una intoxicación aguda elevando así los niveles TGO, sin embargo al recibir los siguientes 7 días el brócoli liofilizado esta enzima decreció significativamente lo que nos indica que el grupo experimental 2 post-tratamiento con liofilizado de brócoli demuestra resultados más ventajosos respecto al tratamiento del grupo experimental 1, estos resultados sugieren además que el sulforafano, contenido en el liofilizado de brócoli, aumentó el arsenal de defensa antioxidante en las células del hígado que fue capaz de desintoxicar y reparar el daño resultante del metabolito altamente reactivo (NAPQI.) del paracetamol.

3.9.3. Fosfatasa Alcalina (FA)

Dentro del perfil hepático también se evaluó la enzima fosfatasa alcalina (FA) en los cinco grupos de estudio, se puede observar los resultados basales y a los siete en la **Tabla N° 28** y la **Figura N° 32**, los valores basales en todos los grupos de experimentación después de haber sido estandarizados con alimento *ad libitum* fluctuaron entre 45.67 ± 7.58 a 67.73 ± 8.03 . Posterior a siete días de administración de acuerdo al esquema de tratamiento todos los grupos de estudio sufrieron cambios en la concentración de esta enzima.

Por ejemplo la variación que surgió en el promedio para el grupo brócoli fue del 48.78 ± 5.67 , lo que indicó un decrecimiento en la concentración de esta enzima ya que se le estuvo administrando la suspensión de brócoli liofilizado; caso contrario ocurrió con el grupo paracetamol, pues este tuvo un aumento en la variación de su promedio del 90.98 ± 9.88 a quien se le administró 1000 mg/kg de peso de suspensión de paracetamol, mientras que para el grupo agua el cual no recibió ningún tratamiento presentó un valor promedio de 69.25 ± 6.89 ; por otro lado para el grupo experimental 1 (pre-tratamiento), al que primero se le administró la suspensión de brócoli liofilizado, presentó un decrecimiento de sus valores promedio de 47.35 ± 11 , lo que corresponde a que primero se le estuvo administrando la suspensión de brócoli liofilizado y sus valores se mostraron por debajo de los valores del control negativo y alcanzando los niveles del grupo brócoli; mientras que para el grupo experimental 2 (post-tratamiento), presentó un crecimiento en el valor promedio de 92.67 ± 9.26 , sobrepasando los niveles del grupo control negativo como llegando también a estar cerca de los niveles del grupo paracetamol, esto se debe a que se le estuvo administrando la suspensión de paracetamol en una dosis de 1000 mg/kg de peso.

Tabla N° 28: Efecto de *Brassica oleracea* L. (Brócoli) sobre los niveles de FA en ratas de experimentación basal y a los siete días.

	BASAL (U/L)	7 DIAS	Δ 7 días
Grupo Brócoli	66.13+/-7.6	48.78+/-5.67	-17.36+/-2.61
Grupo Paracetamol	49.44+/-13.92	90.98+/-9.88	41.54+/-14.45
Grupo Agua	67.73+/-8.03	69.25+/-6.89	1.52+/-2.31
Exp. 1 (pre-tratamiento)	63.05+/-11.3	47.35+/-11.94	-15.69+/-3.87
Exp.2 (post-tratamiento)	45.67+/-7.58	92.67+/-9.26	47+/-10.39

Fuente: Elaboración propia.

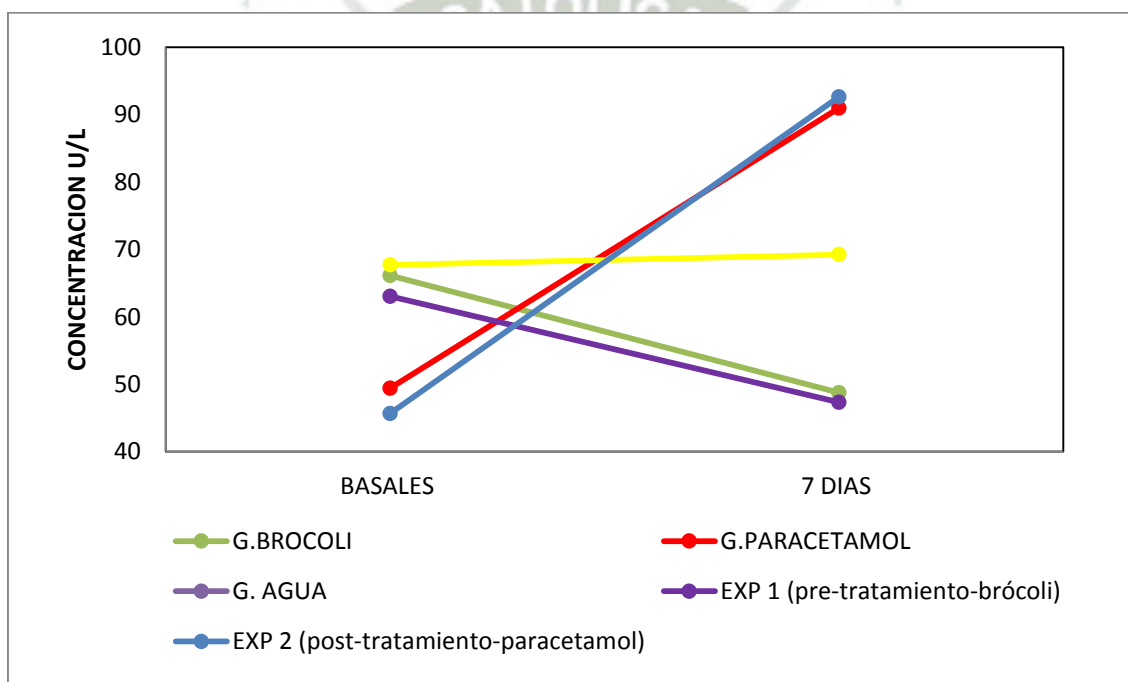


Figura N° 32: Valor promedio de la enzima FA de las concentraciones basales y a los siete de tratamiento

En la tercera evaluación, a los 14 días, se puede apreciar el efecto altamente significativo de los tratamientos en evaluación respecto al grupo agua. Para el grupo experimental 1 esta enzima tuvo un aumento del valor promedio de 29.74+/-4.99 (Ver **Tabla N° 31**), lo que significa que tras la administración de la suspensión de paracetamol, ésta sufrió metabolización y por consiguiente la acumulación del N-acetil-

p-benzoquinoneimina (NAPQI), producto tóxico como resultado de la conversión metabólica de paracetamol (Mitchell et. al, 1973)⁷⁶, a pesar de que primero se le administró la suspensión de brócoli liofilizado, esto se puede explicar cómo se mencionó anteriormente, que el sulforafano al principio sufrió normal metabolización y eliminación al no encontrar el NAPQI producto tóxico, sin embargo cuando se administró la suspensión de paracetamol hubo una inminente intoxicación hepática aguda; caso contrario sucedió con el grupo experimental 2 (post-tratamiento), ya que tuvo un decrecimiento y su valor promedio fue de 4.19+/-7.48 (**Ver Tabla N° 32**), ya que gracias al sulforafano presente en el liofilizado de brócoli que posee propiedades antioxidantes y además interfiere en la inducción del sistema enzimático de fase II como un importante evento ante la respuesta al estrés celular en la metabolización de sustancias tóxicas del metabolismo hepático (Jeong y Young)⁸⁰.

Siendo posible la eliminación de NAPQI, producto tóxico del paracetamol, ya que según Dinkova-Kostova et al.⁸¹ menciona en sus investigaciones que el sulforafano conduce a la disociación del complejo de proteínas de Keap 1 y Nrf 2 ubicadas en el citoplasma celular.

El Nrf 2 liberado migra al núcleo, uniéndose posteriormente al elemento de respuesta antioxidante (ARE) y consecuentemente a la expresión de genes de las enzimas de fase II, mostrando mejores resultados que el grupo experimental 1 (**Ver Figura N° 33**).

Esto nos recomienda la ventaja de usar la suspensión del vegetal liofilizado luego de que se produzca la intoxicación con paracetamol, es decir como post-tratamiento puesto que presenta resultados óptimos disminuyendo significativamente las tres enzimas hepáticas incluso por debajo de los valores basales tanto del grupo agua y el grupo Brócoli, mientras que como pre-tratamiento se elevaron los niveles de las tres enzimas hepáticas, y no llegan a descender significativamente, por tanto muestra no ser tan efectiva.

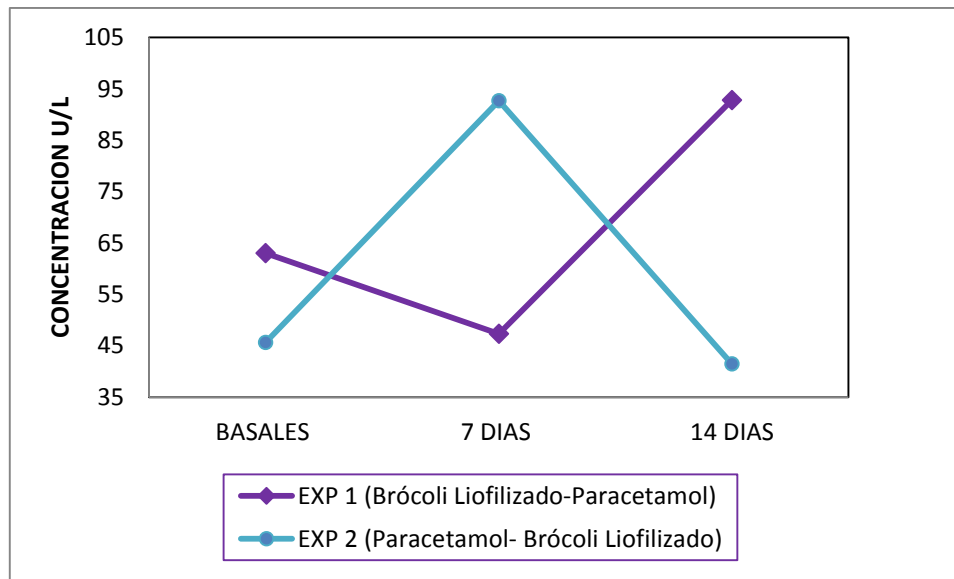


Figura N° 33: Valor promedio de la enzima FA de las concentraciones basales, a los siete y catorce días de tratamiento para los grupos experimentales 1 y 2.

Dados los resultados mostrados en la **Tabla N°28** y **Figura N° 32**, pretenden suponer que la suspensión acuosa de brócoli liofilizado administrada a los grupos experimentales 2 (post-tratamiento) y al grupo Brócoli disminuyen los niveles de la enzima fosfatasa alcalina (FA) en relación a los grupos experimental 1 (pre-tratamiento) y paracetamol. Para corroborar dicha suposición se analizó estadísticamente los datos de esta enzima y se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA), con una ($p < 0.05$) para establecer si existe o no diferencia significativa entre las concentraciones promedio de esta enzima en todos los grupos de estudio.

Tabla N° 29: Análisis de varianza de las diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima FA en los grupos experimentales

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	26840.1	4	6710.02	83.47	0.0000
Intra grupos	2411.51	30	80.3838		
Total (Corr.)	29251.6	34			

Dónde:

H_0 ; si existe diferencia estadísticamente significativa.

H_1 ; no existe diferencia estadísticamente significativa.

En la **Tabla N° 29** y **Figura N° 34**, se encontraron datos que nos llevan a afirmar que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en las concentraciones de esta enzima entre los cinco grupos de estudio, tras siete días de tratamiento. Observándose en el gráfico de cajas y bigotes que los grupos paracetamol y experimental 2 se asemejan en sus valores, esto ocurrió puesto que recibieron según el esquema de tratamiento por 7 días la dosis de 1000 mg/kg de peso de la suspensión de paracetamol; por otro lado sucedió algo semejante con las concentraciones de esta enzima en los grupos experimental 1 y grupo brócoli; ya que recibieron por 7 días tratamiento la suspensión de brócoli liofilizado.

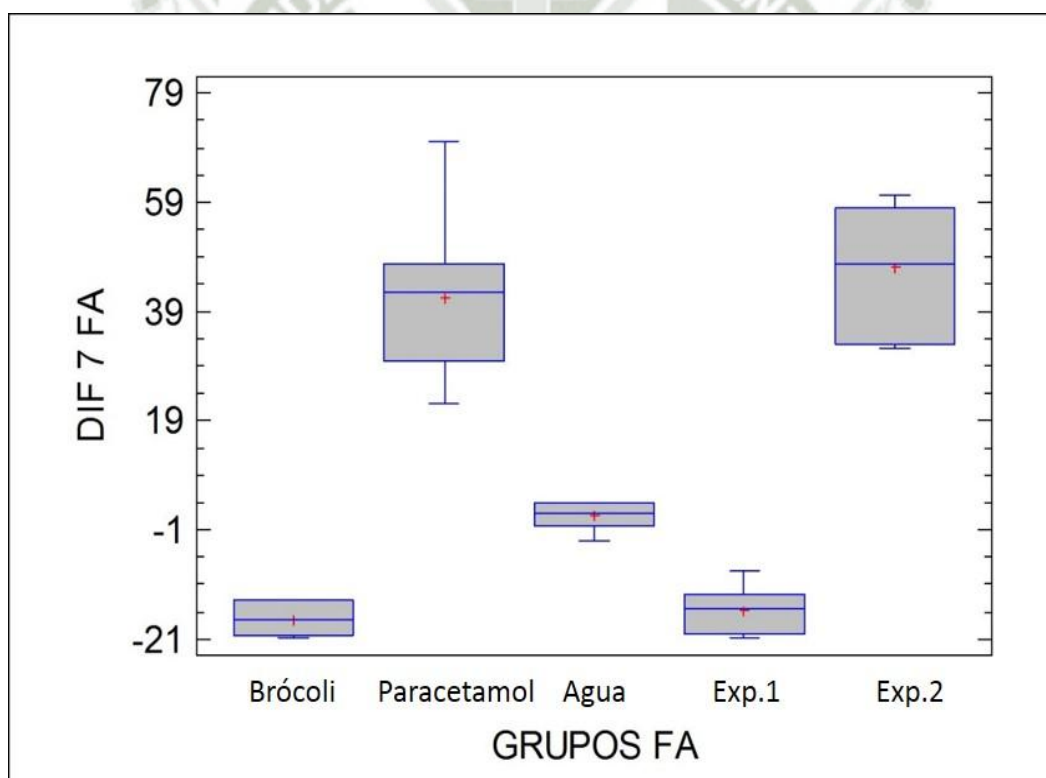


Figura N° 34: Diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima FA en los grupos de estudio.

Cabe notar que los valores de las concentraciones de los grupos experimental 1 y grupo brócoli decrecieron inclusive por debajo de los valores del grupo agua, la razón de este hecho reposa en que en individuos que no están expuestos a ningún tóxico que active las enzimas encargadas de la desintoxicación del hígado, el compuesto sulforafano actúa de la misma manera disminuyendo los niveles de esta enzima.

Se tuvo ya establecido que existen diferencias significativas en los cinco grupos de estudio, sin embargo es importante saber entre que grupos es que existen estas diferencias para ello se realizó la prueba de Múltiples rangos mediante LSD, los resultados se muestran en la **Tabla N° 30**. Estos datos muestran que los valores del grupo agua son estadísticamente significativos y diferentes al resto de los grupos ($p < 0.05$), esto es debido a que dicho grupo de estudio no fue sometido a ningún Tratamiento ni cuadro de toxicidad aguda. Por otro lado, los grupos experimental 1 y grupo brócoli no presentaron diferencia significativa ya que recibieron la suspensión de brócoli liofilizado por lo que los valores de esta enzima disminuyeron. De la misma manera ocurrió con los grupos experimental 2 y paracetamol puesto que no presentaron diferencia significativa en sus valores sucedió así ya que se les administraron por siete días la suspensión de paracetamol lo que aumentó considerablemente los niveles de la enzima fosfatasa alcalina.

Tabla N° 30: Prueba de Múltiples rangos mediante LSD para las diferencias producidas a los 7 días en los valores de la enzima FA en los grupos de estudio.

Grupos	Casos	Δ 7 días
Grupo Brócoli	7	-17.36+/-2.61 ^a
Grupo Paracetamol	6	41.54+/-14.45 ^c
Grupo Agua	7	1.52+/-2.31 ^b
Experimental. 1 (pre-tratamiento)	7	-15.69+/-3.87 ^a
Experimental.2 (post-tratamiento)	7	47+/-10.39 ^c

Por último se analizó la enzima FA a los catorce días de tratamiento para los grupos experimentales 1(pre-tratamiento) y 2 (post-tratamiento) y se les procedió a realizar el análisis t de student para establecer si existe o no diferencia significativa entre las

concentraciones promedios de la enzima fosfatasa alcalina a los catorce días de tratamiento como se observa en la **Tabla N ° 31. y 32.**

En la **Tabla N ° 31**, se puede observar que tras realizar el análisis t-student presentaron diferencia significativa a los siete y catorce días de tratamiento, siendo el valor- p de 0.0000 ($p < 0.05$). Donde nos indica que existe diferencia estadísticamente significativa al 95% de confianza entre las diferencias encontradas al día 7 y al día 14 para el grupo experimental 1.

Tabla N° 31: Comparaciones entre las diferencias reportadas a los siete días y a los 14 días para cada enzima hepática en el grupo experimental 1. (pre-tratamiento)

	<i>FA</i>	
	<i>DIF. D7</i>	<i>DIF. D14</i>
Recuento	7	7
Promedio	-15.70+/-3.87	29.7359+/-4.99
Mediana	-15.502	27.871
Varianza	17.5289	29.2272
Desviación Estándar	4.18676	5.40622
Mínimo	-20.723	23.794
Máximo	-8.507	37.173
Sesgo Estandarizado	0.633542	0.299311
Curtosis Estandarizada	0.12376	-1.0553
T	-17.5789	
Valor-P	0.0000	

En la **Tabla N ° 32**, también se puede ver que existe una diferencia significativa a los siete y catorce días de tratamiento para el grupo experimental 2 (post-tratamiento), esto se evidencio con el análisis estadístico empleado t de student, siendo el valor- p de 0.0000 ($p < 0.05$).

Tabla N° 32: Comparaciones entre las diferencias reportadas a los siete días y a los 14 días para cada enzima hepática en el grupo experimental 2 (post-tratamiento)

	<i>FA</i>	
	<i>DIF. D7</i>	<i>DIF. D14</i>
Recuento	7	7
Promedio	47.00+/-10.38	-4.19+/-7.48
Mediana	47.935	-5.032
Varianza	126.179	65.5182
Desviación Estándar	11.2329	8.09433
Mínimo	32.149	-14.456
Máximo	60.272	11.633
Sesgo Estandarizado	-0.392501	1.2868
Curtosis Estandarizada	-0.760033	1.47061
T		9.7811
Valor-P		0.0000

Las comparaciones realizadas de esta última enzima hepática a los dos grupos experimentales (pre y post-tratamiento) a los días 7 y 14 presentaron diferencia significativa, siendo el valor- p de 0.0000 ($p < 0.05$) con un nivel del 95% de confianza.

El estrés oxidativo ocasionado por intermedios como el metabolito tóxico del paracetamol (NAPQI), se vio reflejado en el grupo experimental 1 en el momento de los 7 días de administración de la suspensión de paracetamol a pesar que previamente se le administró el liofilizado de brócoli, puesto que los niveles de este marcador enzimático se elevaron; por otro lado en el caso del grupo experimental 2, el cual primero fue intoxicado y posteriormente administrado con el liofilizado del brócoli, la intervención oportuna del sulforafano como antioxidante exógeno aumentó el sistema de defensa celular, lo que previno los efectos nocivos del NAPQI, metabolito altamente reactivo del paracetamol.

Cabe resaltar que la hepatotoxicidad aguda inducida por paracetamol es la principal causa de la insuficiencia hepática aguda, incluso en países desarrollados, siendo el

antídoto actualmente existente la N-acetilcisteína que es eficaz cuando es tratada en una fase temprana (limitación de tiempo), ya que restaura el agotamiento de glutatión reducido (GSH), por lo tanto siendo este un marcador clave de la toxicidad con paracetamol.



CONCLUSIONES

Primera: La administración por vía orogástrica de la suspensión de brócoli liofilizado que contiene el metabolito responsable del efecto antioxidante y desintoxicante, sulforafano; demostró reducir los valores de las tres enzimas hepáticas (TGP, TGO y FA) en el tratamiento con intoxicación aguda con paracetamol.

Segunda: Se determinó la dosis adecuada de *Brassica olerácea L.* (brócoli) liofilizado que tuvo un decrecimiento en las tres enzimas hepáticas (TGP, TGO y FA) y fue la de 1000 mg/kg de peso.

Tercera: Se determinó que el grupo experimental 2 (post-tratamiento) tuvo un efecto significativo en la disminución de las tres enzimas hepáticas como tratamiento de la toxicidad hepática aguda inducida en animales de experimentación.

Cuarta: El contenido de sulforafano, metabolito secundario obtenido a partir de la glucorafanina presente en la *Brassica olerácea L.* (brócoli) liofilizado fue de 284.800 mg/Kg.

Quinta: Se logró conocer la dosis adecuada de sulforafano la cual fue de 0.074 mg contenidos en 1000 mg de la *Brassica olerácea L.* (brócoli) liofilizado administrada a los animales de experimentación, que se evidenció mediante la prueba de ANOVA que la dosis produjo un decrecimiento notable en sus valores en las enzimas hepáticas.

Sexta: Se obtuvo 250 g de *Brassica olerácea L.* (brócoli) liofilizado a partir de 1.5 Kg de pellas y tallos secundarios de brócoli, es decir 17% del rendimiento del producto liofilizado.

RECOMENDACIONES

- Primera:** Liofilizar las hojas y tronco principal para determinar la presencia y concentración de sulforafano, ya que esta puede ser fuente industrial de la obtención de sulforafano a un bajo precio.
- Segunda:** Diseñar una metodología para determinar la presencia y concentración de sulforafano en brócoli cocido por distintos métodos, a diferentes pH por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).
- Tercera:** Desarrollar determinaciones a diferentes dosis de la *Brassica oleracea* L. (brócoli) liofilizado en la intoxicación hepática experimental en animales de experimentación pre-ingestión a la administración de una suspensión de paracetamol.
- Cuarta:** Determinar la concentración de sulforafano *in vitro* en animales de experimentación.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Martín-Sanz P, Cascales M.** Metabolismo de fármacos en hígado y sus alteraciones. En: Cascales M y col. Hepatología. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 1990.
2. **Yu BP.** Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews.* 1994; 74(1):139-62.
3. **Cheeseman K, Slater T.** An introduction to free radicals in medicine. *Brit Med Bull.* 1993; 49:481-93.
4. **Padh H. Vitamin C:** Newer insights into its biochemical functions. *Nutr Rev.* 1991; 49(3):65-70.
5. **Van Eylen D, Bellostas N, Strobel BW, Oey I, Hendrickx M, Van Loey A, Sørensen H, Sørensen JC.** Influence of pressure/ temperature treatments on glucosinolate conversion in broccoli (*Brassica oleracea* L. cv*Italica*) heads. *Food Chem* 2009; 112(3): 646-653.
6. **Kapiszewska M (2006)** A vegetable to meat consumption ratio as a relevant factor determining cancer preventive diet. En: *Local Mediterranean Food Plants and Nutraceuticals.* Editores: Heinrich M, Müller WE, Galli C. Ed. Karger, vol 59:130-153.
7. **Nakagawa K, Umeda T, Higuchi O, Tsuzuki T, Miyazawa T. 2006.** Evaporative Light-Scattering analysis of Sulforaphane in broccoli samples: quality of broccoli products regarding Sulforaphane contents *J Agric Food Chem* 2006;2479-8053.

8. **Liang H, Li C, Yuan Q, Vriesekoop F**, Separation and Purification of Sulforaphane from broccoli seeds by solid phase extraction and preparative high-performance liquid chromatography. *J Food Compos Anal* 2006; 473-476
9. **Jaramillo, J.; M. Lobo. 1983.** Manual de Hortalizas. Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Bogotá. Manual de Asistencia Técnica No. 28. 555 p.
10. **Enciclopedia agropecuaria terranova.** 1995. Producción Agrícola. Terranova. Santa Fe de Bogotá, Colombia. ,306-307p.
11. **Wattenberg, L.W.; Hanley, AB; Barany, G., Sparnins, VL. Lam, L.K. y Fenwick, GR.** Inhibition of Carcinogenesis by Some Minor Dietary Constituents Princess Takamtsusymp 1985 16: 193-203.
12. **Mazza, G.** Alimentos Funcionales. Aspectos Bioquímicos Y De Procesado. Edición Acribia S.A. España, 1998. 800p (56-62p).
13. **Falka K. ; Vogela C.; Textora S.; Bartrama S.; Hickb A.; Pickettb J.; Gershenson J.; (2004).** Glucosinolate Biosynthesis: Demonstration and Characterizacion of the Condensing Enzyme of the Chain Elongation Cycle in *Eruca Sativa*. *Phytochemistry* 65: 1073-1084.
14. **Guerrero- Beltrán, C.; et al. (2012).** Protective Effect of Sulforaphane Against Oxidative Stress: Recent Advances. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64: 503-508.
15. **Lampe J.W.;** Spicing up a vegetarian Diet: Chemopreventive Effects of Phytochemicals. *Am J ClinNutr* 2003; 78 (3): pg. 579- 583.
16. **Faley, J.; Zhang, Y.; Talalay, P.; (1997);** Broccoli sprouts: An exceptionally rich Source of inducers of Enzymes that protect against Chemical Carcinogens. *Proceeding of theNationalAcademy of Sciences.* 97(19): 10367-10372.

17. **Sulforafan. Public Chemical Database (PubChem).**
18. **Jacobo D, (2012) Sulforafano en:** Tecnológico de Monterrey Departamento de Biotecnología e Ingeniería de Alimentos.
19. **Mercola, J. Brocoli Sprouts.** Johns Hopkins University. Disponible en <http://www.healthnutrition.com> (23 de junio 2002).
20. **Gamet-Payrastre, L., Li, P, Lumeau, S., Cassar, G., Dupont, Chevolleau, S., Gasc, N., Tulliez, J., Terce, F. y Inra. Sulforaphane, A Naturally Occurring Isothiocyanate, Induces Cell Cycle Arrest And Apoptosis In Ht29 Human Colon Cancer Cells** Laboratoire Des Xenobiotiques, Toulouse, France.
21. **Ranjendran, P.; et al. (2011).** Histone Deacetylase Turnover and Recovery in Sulforaphane-treated colon cancer cells: Competing Actions of 14-3-3 and Pin1 in HDAC3/SMRT Corepressor complex dissociation/ reassembly. 10(68): 1-18.
22. **Fimognari C, Herelia, P.Sulforaphane** as a Promising Molecule for Fighting Cancer. *Mutat res* 2007; 635(2-3): 90-104.
23. **Bismuth H.** Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. *World J. Surg.* 6: 5-9, 1982.
24. **Pocock G, Richards ChD.** *Fisiología Humana.* 2ª ed. Barcelona: Ed. Masson; 2005.
25. **Burkitt HG, Young B, Heath JW.** *Histología funcional* Wheater. 3ª ed. Madrid:Churchill Livingstone; 1993.
26. **Stevens A, Lowe J.** *Histologia Humana.* 3ªed. Madrid: Elsevier/Mosby; 2006.
27. **Thibodeau GA, Patton KT.** *Anatomía y Fisiología.* 6ª ed. Madrid: ElsevierEspaña, S.A; 2007.

28. **Ganong W.** manual de fisiología médica P. 544 y Agur MR, Dalley F. Grant. Atlas de Anatomía. 11ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2007.
29. **Fox SI.** Fisiología Humana. 10ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 2008. Colegio Oficial Enfermería de Barcelona.
30. **Blanc JF, Lepreux S, Balaboud C et al.** Histophysiologie Hépatique. Encycl Méd Chir. Elsevier, Paris, Hépatologie 7-005-A-10, 2002, 13pp.
31. **Mathie RT, Wheatley AM.** Liver blood flow: physiology, measurement and clinical relevance. In: Blumgart LH, Fong Y. Surgery of the Liver and Biliary Tract, 3rd ed., Saunders ed, London, 2000, vol 12, cap 4, pp 85-107.
32. **Bolognesi M, Sacerdoti D, Bombonato G et al.** Change in portal low after liver transplantation: effect on hepatic arterial resistance indices and role of spleen size. Hepatology, 35: 601-608, 2002.
33. **Schmucker DL.** Liver function and phase I drug metabolism in the elderly: a paradox. Drug & Aging, 18: 837-851, 2001.
34. **Blanc JF, Lepreux S, Balaboud C et al.** Histophysiologie Hépatique. Encycl Méd Chir. Elsevier, Paris, Hépatologie 7-005-A-10, 2002, 13pp.
35. **Farrel GC.** Hepatopatía causada por fármacos, anestésicos y toxinas. En: Sleisenger y Fordtran eds. Enfermedades gastrointestinales y hepáticas: Fisiopatología diagnóstico y tratamiento. 7ª ed. Buenos Aires: Ed. Panamericana; 2004. p. 1486-1537.
36. **Biour M, Poupon R, Grange JD, Chazouilleres O.** Drug induced hepatotoxicity. The 13th updated edition of the bibliographic database of drug-

- related liver injuries and responsible drugs. *GastroenterolClin Biol.* 2000; 24:1052-91.
- 37. Weisiger R, Gollan J, Ockner R.** Receptor for albumin on the liver cell surface may mediate uptake of fatty acids and other albumin-bound substances. *Science* 1961; 211:1046-51.
- 38. Barry M, Feeley J.** Enzyme induction and inhibition. *PharmacolTher* 1990; 46:71-94.
- 39. Dumas Ch, Loi Ch, Cusack B.** Hepatic metabolism and aging. *ClinPharmacokinet* 1990; 19:359-69.
- 40. McLean AJ, Morgan DJ.** Clinical pharmacokinetics in patients with liver disease. *ClinPharmacokinet* 1991; 21:42-69.
- 41. Brosen K.** Recent developments in hepatic drug oxidation. Implications for clinical pharmacokinetics. *ClinPharmacokinet* 1990; 16:220-39.
- 42. Juchau MR.** Substrate specificities and functions of the P450 cytochromes. *Life Sci* 1991; 47:2365-94.
- 43. Okey AB.** Enzyme induction in the cytochrome P450 system. *PharmacolTher* 1990; 45:241-96.
- 44. Del Arco C, Flórez J. 2003.** Metabolismo de los Fármacos. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A, ed. *Farmacología Humana*, 4ta edición. Masson. Barcelona. pp: 81-93.
- 45. Pharmacokinetics & Pharmacodynamics: Rational Dosing & the Time Course of drug Action.** En: Katzung BG, ed. *Basic & Clinical Pharmacology*. 8th edition. LANGE. New York, USA. pp: 35-50.

46. **T.E. Andreoli., j. c. Bennett., C.C. J. Carpenter and F. Plum** Compendio de Medicina Interna, 4ta edición. McGraw-Hill Interamericana. USA, 1999. pp: 322- 327.
47. **Sherlock S.** Enfermedades del hígado y vías biliares. El ateneo: Buenos Aires 1990. pp: 291-292.
48. **Riehle KJ, Dan YY, Campbell JS, Fausto N. (2011)** new concepts in liver regeneration. J Gastroenterol Hepatol 26 Suppl 1: 203-212.
49. **Sherlock S.** Enfermedades del hígado y vías biliares. El ateneo: Buenos Aires 1990. pp: 17-28.
50. **Ayoub SS, Collville-Nash PR, Willoughby DA, Botting RM. 2006.** The involvement of a cyclooxygenase 1 gene-derived protein in the antinociceptive action of paracetamol in mice. European Journal of Pharmacology. 538:57-65.
51. **Joel G. Hardman, Lee E. Limbird, Perry B. Molinoff, Raymond W. Ruddon, Alfred Goodman Gilman. 1996.** Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª edición. Mc Graw-Hill interamericana. México D.F. Vol. II. 677-679.
52. **KatzungBertram G. 2002.** Farmacología básica y clínica. 8ª edición. Editorial: Manual Moderno. México D.F. 691-692.
53. **AHFS Drug Information. USA:** American Society of Health-System Pharmacists. 2001:2044-2053.
54. **PLM. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. México:** Thomson Healthcare. 2001:1288-1289, 2070, 2197.

55. **Vademecumfarmacéutico.ipe** digital. 2000. 9ª. Edición. Rezza editores S.A. de C.V.
56. **Solís Sánchez J.A. 2006.** Compendio del Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. PLM. Edición 52. Thomson PLM S.A. de C.V. México.
57. **Bromer MQ, Black M. 2003.** Acetaminophen hepatotoxicity. Clin Liver Dis. 7:351-67.
58. **MNG Dukes. Meyler's side effects of drugs.** 12th Ed.1992. Elsevier Science Publications BV.
59. **Hinson, J.A; Forkert, P.G. (1995)** Phase II enzymes and bioactivation. Can J. Physiol. Pharmacol. 73: 1407-1413.
60. **kretschmar. M. (1996)** Regulation of Hepatic Glutathione Metabolism and its role in Hepatotoxicity. Exp. toxic. Pathol. 48: 439-446.
61. **Gustavo V. Barbosa, Humberto V. Mercado (2000)** Deshidratación de alimentos. Edit Acribia, S.A. Zaragoza (España). pág. 203-232.
62. **Peter Fellows. (2007)** Tecnología del procesado de los Alimentos. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza (España). pág. 545-557.
63. **Kar A.,** Pharmaceutical Drug Analysis, second Edition, New Age International Publishers, New Delhi, 2005.
64. **Meyer V.,** Practical High-Performance Liquid Chromatography, Fourth Edition, Wiley, Germany, 2007.
65. **Amersham Biosciences** Reversed Phase Chromatography, Edition AA, United Kingdom, 1999.

- 66. Quattrocchi, O; Abelaira de Andrizzi, S; Laba, R.** Introducción a la HPLC. aplicación y práctica, Buenos Aires. pág. 211-218.
- 67. Adamovics J.,** Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, second Edition, Marcel Dekker, USA, 1997.
- 68. Kromidas S.,** HPLC Made to Measure, A Practical Handbook for Optimization, Wiley-VCH, Germany, 2006
- 69. Bliesner,** Validating Chromatographic Methods- A Practical Guide, Wiley-Interscience, USA, 2006.
- 70. Bertelli D, Plessi M, Braghiroli D, Monzani A.** Separation by solid phase extraction and quantification by phase reverse HPLC of sulforaphane in broccoli. Food chem 1998; 63(3): 417- 421.
- 71. G. Sivakumaret all** HPLC screening of anti-cancer sulforaphane from important European Brassica species, Food Chemistry 104 (2007) 1761–1764.
- 72. David e BertelK et all** Separation by solid phase extraction and quantification by reverse phase HPLC of sulforaphane in broccoli Food Chemistry, Vol. 63, No. 3, pp. 417421, 1998.
- 73. Katsunori Sasaki et all** Quantitative profiling of glucosinolates by LC–MS analysis reveals several cultivars of cabbage and kale as promising sources of sulforaphane Journal of Chromatography B, 903 (2012) 171– 176.
- 74. Olga N. Campas-Baypoliet all.** Contenido de sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) en vegetales crucíferos ARCHIVOSLATINOAMERICANOS DE NUTRICION, Vol. 59 N° 1, 2009.

75. **H Liang, Q. P., Yuan, H. R. Dong, Y.M. Liu et all** Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high-performance liquid chromatography, *Journal of Food Composition and Analysis* 19 (2006) 473–476
76. **Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R., Brodie, B.B., 1973.** Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 187, 211.
77. **Larson, A.M., Polson, J., Fontana, R.J., Davern, T.J., Lalani, E., Hynan, L.S., Reisch, J.S., Schiedt, F.V., Ostapowicz, G., Shakil, A.O., 2005.** Acetaminophen induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology* 42, 1364–1372.
78. **Gaona-Gaona L¹, Molina-Jijón E, Tapia E, Zazueta C, Hernández-Pando R, Calderón-Oliver M, Zarco-Márquez G, Pinzón E, Pedraza-Chaverri J.** Protective effect of sulforaphane pretreatment against cisplatin-induced liver and mitochondrial oxidant damage in rats. *Toxicology*. 2011 Aug 15;286(1-3):20-7.
79. **H. ALP1, I. AYTEKIN2, N.K. HATIPOGLU3, A. ALP4, M. OGUN5.** Effects of sulforaphane and curcumin on oxidative stress created by acute malathion toxicity in rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2012; 16(Suppl 3): 144-148
80. **Riedl MA, Saxon A, Diaz-Sanchez D.,** Oral sulforaphane increases Phase II antioxidant enzymes in the human upper airway. *Clin Immunol* 2009;130(3): 244–51.
81. **Jeong-Sang Lee, Young-Joon Surh.,** Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention, *Cancer Letters* 224 (2005) 171–184
82. **B.S. Cornblatt, L. Ye, A.T. Dinkova-Kostova, M. Erb, J.W. Fahey, N.K. Singh, M.S. Chen, T. Stierer, E. Garrett-Mayer, P. Argani, N.E. Davidson,**

P. Talalay, T.W. Kensler, K. Visvanathan., Preclinical and clinical evaluation of sulforaphane for chemoprevention in the breast, *Carcinogenesis* 28 (2007) 1485–1490.



ANEXOS



Anexo No. 1 Fotografías de la investigación.



Fotografía N° 1: Material vegetal fresco



Fotografía N° 2: Brócoli liofilizado en bruto



Fotografía N° 3: Brócoli liofilizado licuado



Fotografía N° 4: Tamizado del brócoli liofilizado



Fotografía N° 5: Pera de decantación con fase orgánica y fase acuosa



Fotografía N° 6: equipo HPLC



Fotografía N° 7: Inyección de la muestra



Fotografía N° 8: Ubicación y ambientación del grupo experimental 1 y grupo agua



Fotografía N° 9: ubicación y ambientación del grupo experimental 2



Fotografía N° 10: extracto acuoso del brócoli



Fotografía N° 11: administración de la suspensión de paracetamol



Fotografía N° 12: Administración de la suspensión del brócoli



Fotografía N° 13: Toma de muestra de sangre



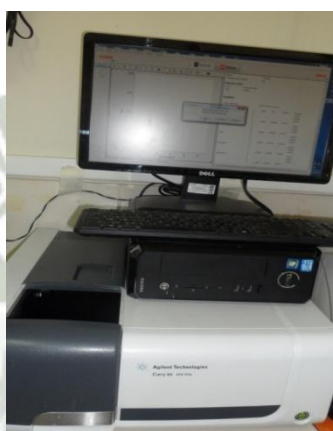
Fotografía N° 14: Muestras en la centrifugadora



Fotografía N° 15: Reactivos para prueba de transaminasas

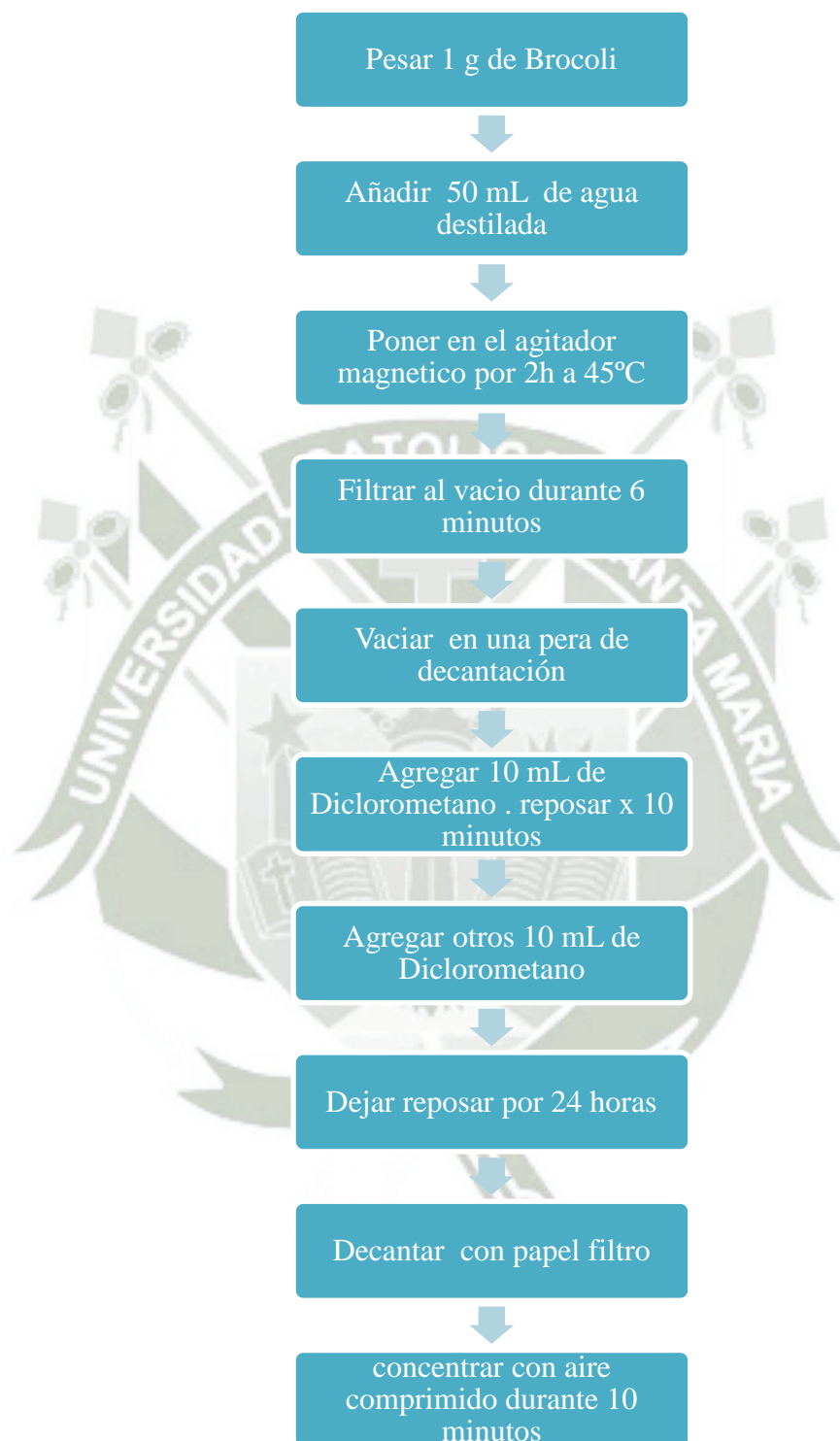


Fotografía N° 16: Reactivos para prueba de fosfatasa alcalina

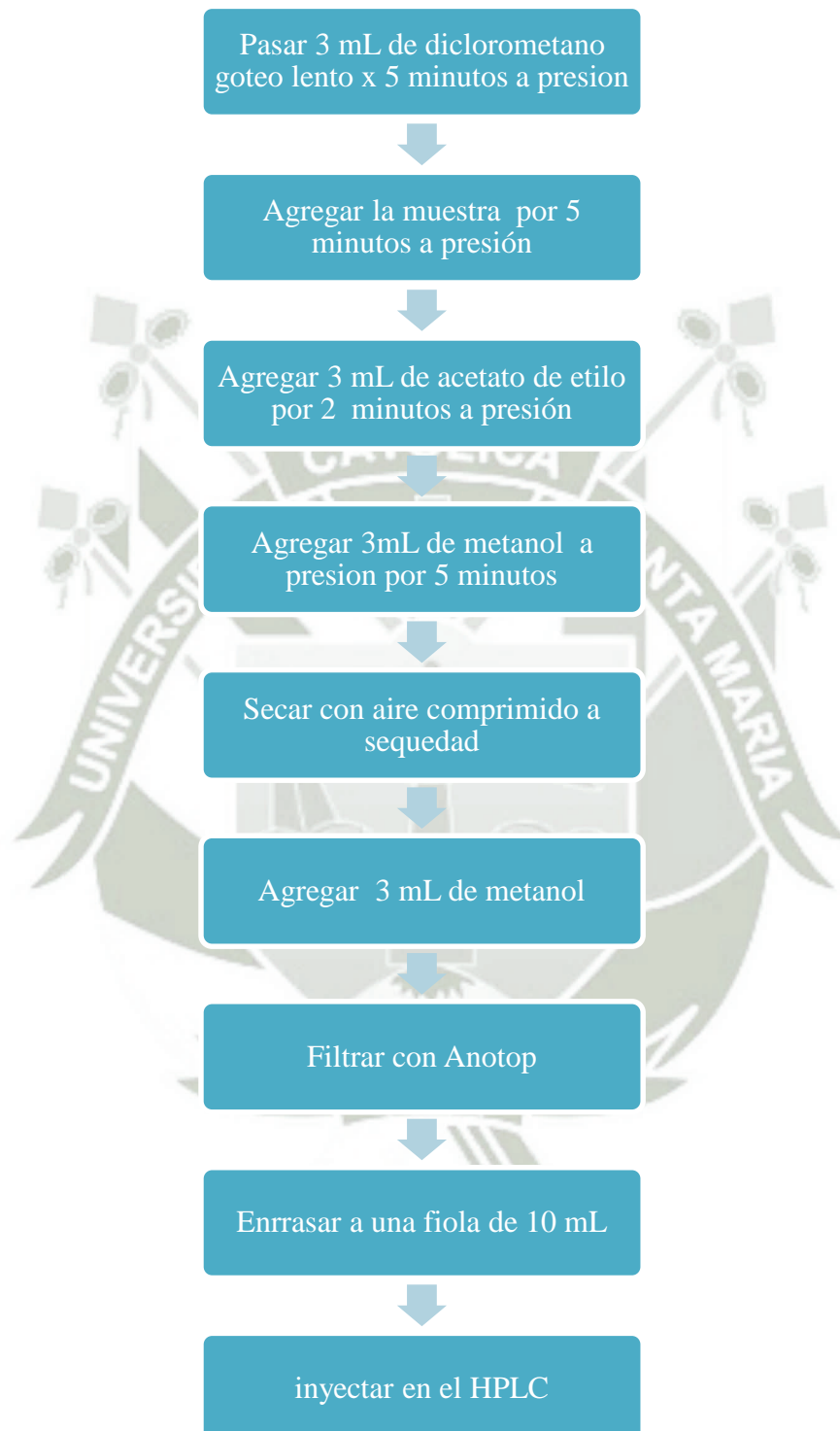


Fotografía N° 17: Procesado de muestras en el espectrofotómetro

Anexo No. 2. Diagrama de flujo general para la extracción de sulforafano en brócoli



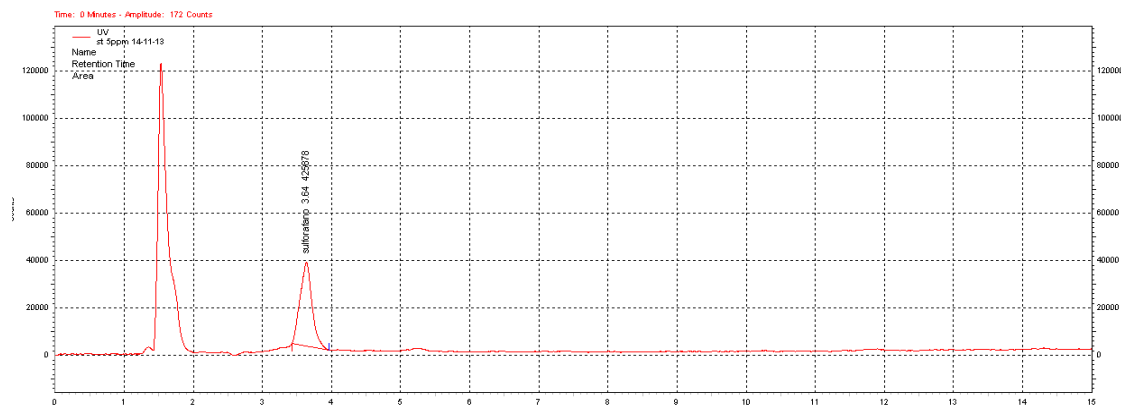
Anexo N°. 3. Diagrama de flujo general para la identificación y cuantificación de sulforafano en brócoli.



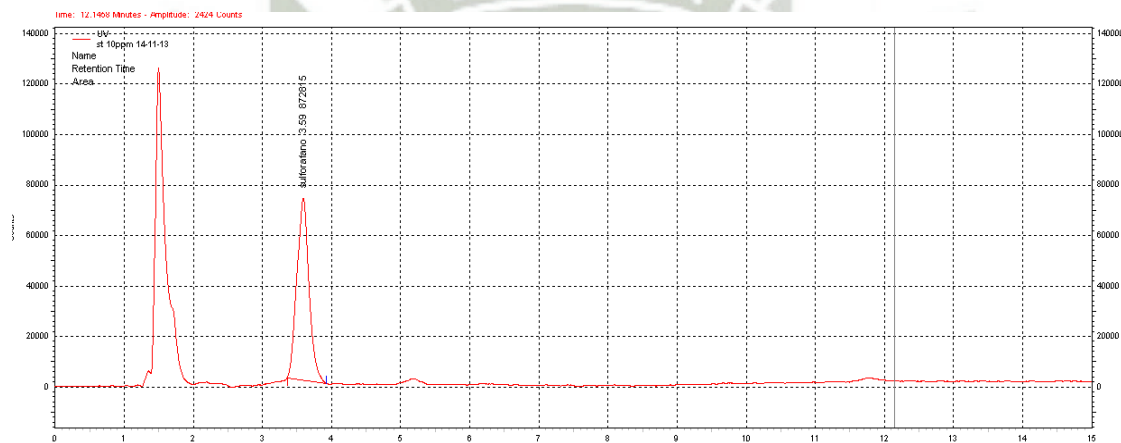
Anexo No. 4. Patrones cromatográficos del HPLC

Fase móvil: ACN/METOH/H2O: 15/15/70; flujo: 2ml/min

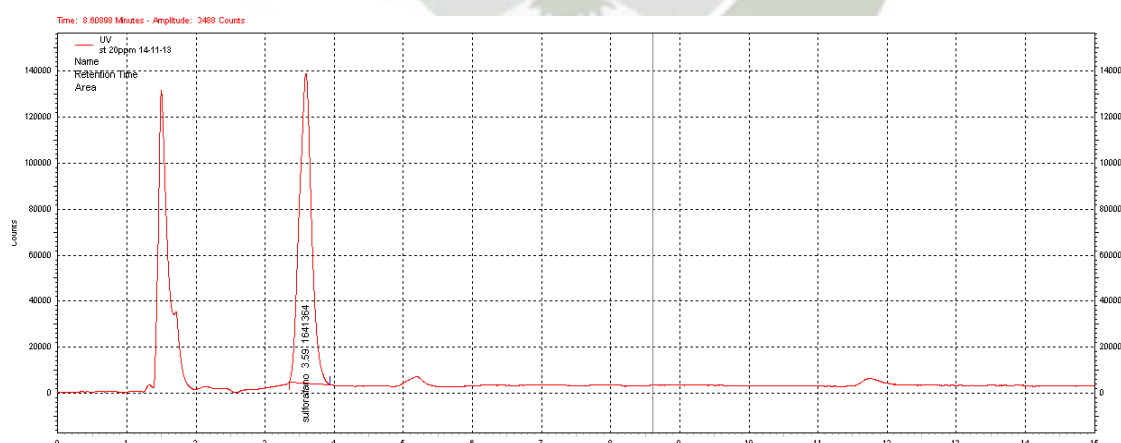
Estándar 5 ppm preparado con metanol



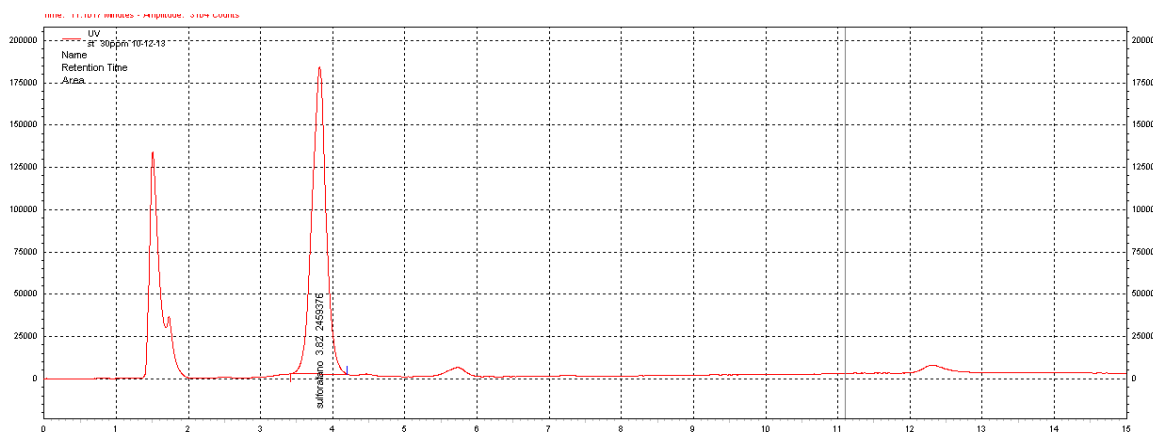
St 10 ppm preparado con metanol



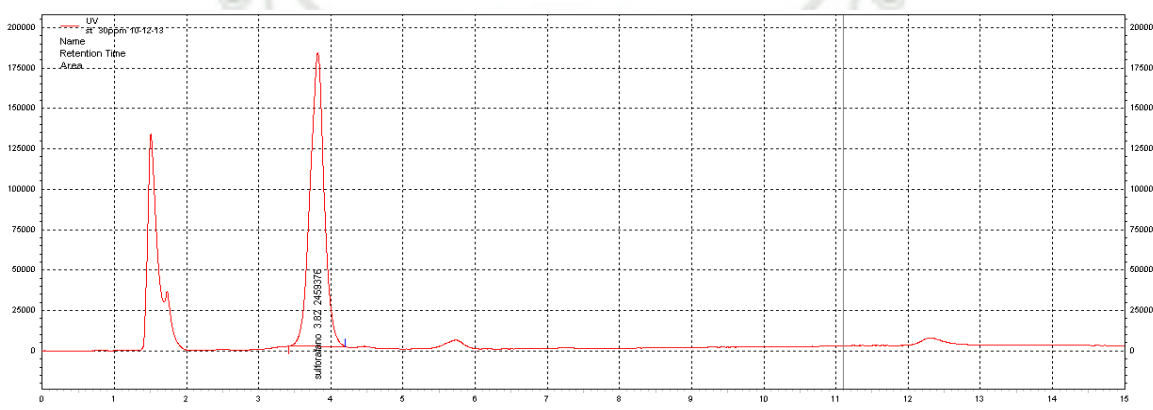
St 20 ppm preparado con metanol



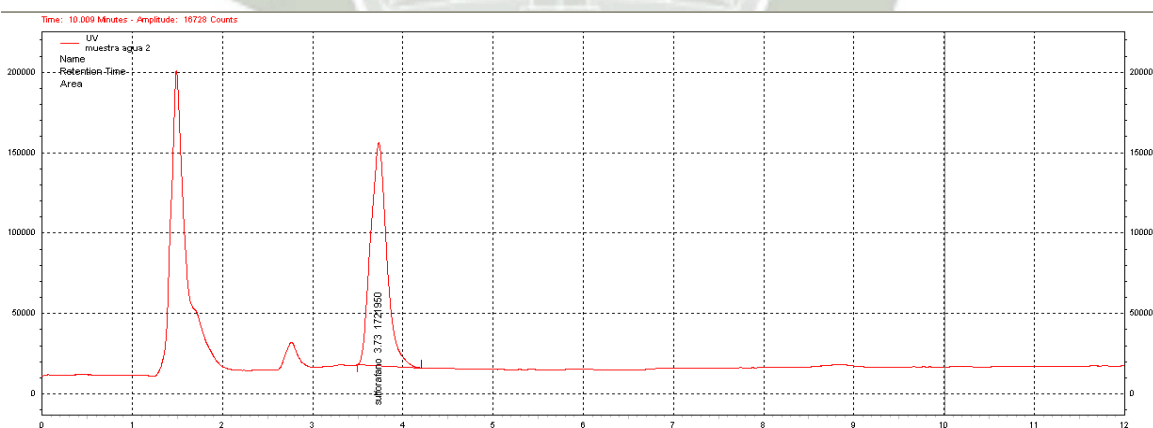
St 30 ppm preparado con metanol



St 50 ppm preparado con metanol



MUESTRA



Anexo No. 5. Prueba para la determinación de la dosis tóxica de paracetamol.

\bar{X} peso promedio= 250 g

1. GRUPO I: constituida por 2 ratas machos.

a) DOSIS 500 mg/Kg de peso

500 mg ----- 1 Kg
X ----- 0.25 Kg

X = 125 mg paracetamol / cada rata

2. GRUPO II: constituida por 2 ratas machos

b) DOSIS 1000 mg/Kg de peso

1000 mg ----- 1 Kg
X ----- 0.25 Kg

X = 250 mg paracetamol/cada rata

Anexo No.6. Cálculos para hallar la concentración de sulforafano administrada a cada animal de experimentación

a) Determinación de concentración de sulforafano administrado a los animales de experimentación

Dosis de brócoli: 1000 mg/Kg de peso

X peso de ratas = **250 g**

1000 mg ----- 1 Kg de peso

X ----- 0.25 Kg

X = 250 mg de brócoli/ 250 g de peso de rata

297.5 mg de sulforafano ----- 1000 g de brócoli

X ----- 0.25 g de brócoli

X = 0.074 mg de sulforafano/ 250 g de peso de rata

Anexo No. 7. Resultados de la prueba piloto con tratamiento de brócoli liofilizado a dosis de 500 mg/kg.

ANIMALES EXPERIMENTACION	DIAS	TGP (U/L)	TGO (U/L)	FA (U/L)
RATA 1	BASAL	167.390	89.060	43.257
	7 DIAS	165.050	88.920	43.221
RATA 2	BASAL	181.490	105.320	63.386
	7 DIAS	179.030	103.210	62.935
RATA 3	BASAL	185.900	100.400	72.441
	7 DIAS	183.980	99.540	71.098
RATA 4	BASAL	169.230	87.110	49.37
	7 DIAS	167.300	86.500	49.481
RATA 5	BASAL	175.270	97.998	41.732
	7 DIAS	170.280	95.281	41.574
PROMEDIO (BASAL)		175.856	95.978	54.037
PROMEDIO (7 DIAS)		173.128	94.690	53.662
DS (BASAL)		7.88	7.70	13.37
DS (7 DIAS)		8.06	7.01	12.87

Anexo No. 8. Resultados de la prueba piloto con tratamiento de brócoli liofilizado a dosis de 1000 mg/kg.

SUJETO	TRATAMIENTO	TGP	TGO	FA
		U/L	U/L	U/L
Cabeza	Basal	170.314	105.315	41.732
	Tratamiento	140.664	81.368	26.23
Dorso	Basal	185.949	91.84	62.598
	Tratamiento	154.013	62.395	39.623
Cola	Basal	189.616	102.648	75.276
	Tratamiento	160.981	83.077	50.197
Pata Anterior Derecha	Basal	183.155	111.091	64.567
	Tratamiento	152.125	82.268	38.639
Pata Posterior Derecha	Basal	178.267	109.998	72.362
	Tratamiento	149.077	75.109	45.639
PROMEDIO (BASAL)		181.460	104.178	63.307
PROMEDIO (7 DIAS)		151.372	76.843	40.066
DS (BASAL)		7.48	7.71	13.16
DS (7 DIAS)		7.41	8.67	9.05

Estudio del comportamiento de las enzimas hepáticas en ratas por intoxicación aguda con paracetamol y tratamiento con brócoli liofilizado

Anexo No. 11. Resultados de valores basales de la enzima TGP

TGP (U/L)	ANIMALES	GRUPOS DE ESTUDIO
169.537	CA	GRUPO BROCOLI
175.727	D	
176.695	CO	
182.632	PAD	
165.870	PPD	
191.711	PAI	
162.203	PPI	
159.967	CA	GRUPO PARACETAMOL
178.030	D	
168.062	CO	
171.330	PAD	
169.776	PPD	
173.000	PAI	
177.000	PPI	
175.000	CA	GRUPO AGUA-
169.000	D	
182.000	CO	
138.000	PAD	
161.000	PPD	
139.000	PAI	
189.000	PPI	
170.314	CA	GRUPO EXP 1
185.949	D	
189.616	CO	
183.155	PAD	
178.267	PPD	
174.076	PAI	
164.457	PPI	
180.967	CA	GRUPO EXP 2
158.030	D	
156.728	CO	
167.267	PAD	
162.062	PPD	
151.330	PAI	
169.776	PPI	

Anexo No. 12. Resultado de valores basales de la enzima TGO

TGO (U/L)	ANIMALES	GRUPOS DE ESTUDIO
95.855	CA	GRUPO BROCOLI
108.759	D	
96.030	CO	
94.284	PAD	
106.633	PPD	
98.649	PAI	
96.903	PPI	
102.792	CA	GRUPO PARACETAMOL
89.300	D	
97.998	CO	
107.125	PAD	
92.538	PPD	
88.000	PAI	
89.000	PPI	
95.012	CA	GRUPO AGUA-
96.324	D	
106.415	CO	
105.239	PAD	
101.856	PPD	
102.795	PAI	
87.114	PPI	
105.315	CA	GRUPO EXP 1
91.840	D	
102.648	CO	
111.091	PAD	
109.998	PPD	
96.030	PAI	
100.395	PPI	
102.792	CA	GRUPO EXP 2
87.300	D	
103.490	CO	
93.411	PAD	
87.998	PPD	
87.125	PAI	
92.538	PPI	

Anexo No. 13. Resultados de valores basales de la enzima FA

FA (U/L)	ANIMALES	GRUPOS DE ESTUDIO
72.913	CA	GRUPO BROCOLI
62.047	D	
74.016	CO	
61.102	PAD	
53.701	PPD	
75.748	PAI	
63.386	PPI	
34.646	CA	GRUPO PARACETAMOL
49.606	D	
72.441	CO	
42.520	PAD	
41.732	PPD	
37.000	PAI	
68.103	PPI	
72.324	CA	GRUPO AGUA-
74.327	D	
63.107	CO	
53.049	PAD	
71.025	PPD	
62.118	PAI	
78.127	PPI	
41.732	CA	GRUPO EXP 1
62.598	D	
75.276	CO	
64.567	PAD	
72.362	PPD	
72.441	PAI	
52.362	PPI	
44.646	CA	GRUPO EXP 2
49.606	D	
39.370	CO	
39.370	PAD	
62.441	PPD	
42.520	PAI	
41.732	PPI	

Anexo No. 14. Resultados de valores de TGP a los 7 días de tratamiento.

TGP (U/L)	ANIMALES	GRUPOS DE ESTUDIO
137.061	CA	GRUPO BROCOLI
131.108	D	
156.219	CO	
160.283	PAD	
146.489	PPD	
156.791	PAI	
141.553	PPI	
179.060	CA	GRUPO PARACETAMOL
197.188	D	
184.981	CO	
191.981	PAD	
185.870	PPD	
227.000	PAI	
198.000	PPI	
168.000	CA	GRUPO AGUA-
163.000	D	
170.000	CO	
126.000	PAD	
168.000	PPD	
127.000	PAI	
184.000	PPI	
148.664	CA	GRUPO EXP 1
169.013	D	
160.981	CO	
152.125	PAD	
149.077	PPD	
138.030	PAI	
147.092	PPI	
210.060	CA	GRUPO EXP 2
187.188	D	
186.647	CO	
194.854	PAD	
191.981	PPD	
171.981	PAI	
185.870	PPI	

Anexo No. 15. Resultados de valores de TGO a los 7 días de tratamiento.

TGO (U/L)	ANIMALES	GRUPOS DE ESTUDIO
79.618	CA	GRUPO BROCOLI
83.538	D	
78.522	CO	
78.046	PAD	
88.824	PPD	
71.538	PAI	
77.125	PPI	
120.474	CA	GRUPO PARACETAMOL
131.299	D	
137.379	CO	
148.077	PAD	
129.601	PPD	
139.000	PAI	
122.000	PPI	
90.314	CA	GRUPO AGUA-
89.219	D	
109.539	CO	
106.742	PAD	
109.115	PPD	
109.019	PAI	
80.634	PPI	
89.871	CA	GRUPO EXP 1
62.395	D	
83.077	CO	
82.268	PAD	
75.109	PPD	
63.062	PAI	
88.697	PPI	
120.474	CA	GRUPO EXP 2
131.299	D	
122.220	CO	
120.744	PAD	
117.379	PPD	
118.077	PAI	
129.601	PPI	

Anexo No. 16. Resultados de valores de la enzima FA a los 7 días de tratamiento.

FA (U/L)	ANIMALES	GRUPOS DE ESTUDIO
52.222	CA	GRUPO BROCOLI
45.714	D	
56.667	CO	
47.143	PAD	
39.841	PPD	
55.238	PAI	
44.603	PPI	
104.918	CA	GRUPO PARACETAMOL
97.541	D	
94.590	CO	
85.082	PAD	
74.590	PPD	
82.000	PAI	
98.104	PPI	
72.147	CA	GRUPO AGUA
78.117	D	
66.063	CO	
57.068	PAD	
73.128	PPD	
63.089	PAI	
75.131	PPI	
26.230	CA	GRUPO EXP 1
42.623	D	
58.197	CO	
51.639	PAD	
51.639	PPD	
63.934	PAI	
37.213	PPI	
104.918	CA	GRUPO EXP 2
97.541	D	
97.541	CO	
84.426	PAD	
94.590	PPD	
95.082	PAI	
74.590	PPI	

Anexo No. 17. Resultados de valores de la enzima TGP a los 14 días de tratamiento

TGP (U/L)	ANIMALES	GRUPOS EXPERIMENTALES
184	CA	GRUPO EXP 1
195.552	D	
199.314	CO	
170.235	PAD	
174.255	PPD	
173.203	PAI	
180.362	PPI	
160.632	CA	GRUPO EXP 2
145.49	D	
152.727	CO	
157.171	PAD	
154.997	PPD	
156.219	PAI	
153.648	PPI	

Anexo No. 18. Resultados de valores de la enzima TGO a los 14 días de tratamiento.

TGO (U/L)	ANIMALES	GRUPOS EXPERIMENTALES
126.726	CA	GRUPO EXP 1
122.029	D	
135.839	CO	
141.030	PAD	
130.283	PPD	
129.473	PAI	
138.903	PPI	
81.538	CA	GRUPO EXP 2
70.617	D	
85.205	CO	
73.935	PAD	
69.744	PPD	
62.237	PAI	
72.713	PPI	

Anexo No. 19. Resultados de valores de la enzima FA a los 14 días de tratamiento.

FA (U/L)	ANIMALES	GRUPOS EXPERIMENTALES
75.194	CA	GRUPO EXP 1
86,744	D	
99.070	CO	
91.318	PAD	
100.233	PPD	
107.395	PAI	
89.535	PPI	
56.279	CA	GRUPO EXP 2
44.574	D	
35.194	CO	
29.612	PAD	
47.985	PPD	
40.388	PAI	
36.357	PPI	

