

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
HEPATOPROTECTORA DEL EXTRACTO ETANÓLICO  
DE *Allophylus edulis***

**ANTONIA KARINA GALEANO RUIZ DIAZ**

Tesis presentada a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas mención Farmacología Molecular.

**SAN LORENZO – PARAGUAY**

**ENERO – 2021**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
HEPATOPROTECTORA DEL EXTRACTO ETANÓLICO  
DE *Allophylus edulis***

**ANTONIA KARINA GALEANO RUIZ DIAZ**

Tutor: Prof. Dra. María Luisa Kennedy Rolón  
Co-tutor: Prof. Dr. Miguel Ángel Campuzano Publitz

Tesis presentada a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas mención Farmacología Molecular.

**SAN LORENZO – PARAGUAY**

**ENERO – 2021**

**Galeano Ruiz Diaz, Antonia Karina.**

**Determinación de la actividad hepatoprotectora del extracto etanólico de *Allophylus edulis*. / Antonia Karina Galeano Ruiz Diaz. - - San Lorenzo: La Autora, 2021.**

**VI, 47 p.: fig.; 30 cm.**

**Tesis presentada a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas mención Farmacología Molecular**

**1. BOTÁNICA MÉDICA. 2. KOKU - ALLOPHYLUS EDULIS.  
3. ANTIOXIDANTE. 4. COMPUESTOS FENÓLICOS. I. Título.**

**CDD: 615.321  
G151d**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
HEPATOPROTECTORA DEL EXTRACTO ETANÓLICO  
DE *Allophylus edulis***

**ANTONIA KARINA GALEANO RUIZ DIAZ**

Aprobado en fecha 26 de Enero de 2021.

Tribunal Examinador:

Prof. Dra. Laura Graciela MerelesCeuppens	FCQ/UNA
Prof. Dra. María del Carmen Hellión de Ibarrola	FCQ/UNA
Prof. Dr. Javier Enrique Barúa Chamorro	FCQ/UNA
Bioq. (MSc.) Patricia María Funes Torres	IICS/UNA

---

Prof. Dra. María Luisa Kennedy Rolón  
Tutor

---

Prof. Dr. Miguel Ángel Campuzano Bublitz  
Co-tutor

---

Prof. Lic. Laura Joy Ramírez  
Directora de Postgrado

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios y la Virgen María porque siempre me he sentido protegida por ellos en todo momento.

A mis padres y hermanos, que fueron los primeros en apoyarme cuando me entere de la convocatoria de maestría y no dudaron en alentarme a cumplir mis sueños, a pesar de que eso me llevaría a renunciaciones laborales y otras cuestiones.

A todos y cada uno de los miembros de la Familia Farmacología, que siempre me han guiado en este camino maravilloso de la ciencia, sin olvidar los afectos humanos como el cariño, el buen trato, solidaridad, compañerismo y mucho más. Sé que recién estoy comenzando en esto, pero sin la ayuda de cada uno de ellos no lo hubiera logrado.

A mi tutora la profesora Dra. María Luisa Kennedy y mi co-tutor el profesor Dr. Miguel Campuzano por guiarme con mucha paciencia, comprensión, y cariño en este proceso.

A Ana Velázquez Chávez y Elena Diarte, ambas me apoyaron y alentaron a presentarme al concurso de auxiliar de cátedra de Farmacología, y a la maestría, me ayudaron con mucha paciencia y confianza.

A compañeros de trabajo en el Dpto. de Farmacología, Soledad Soverina, Juan Centurión, Wilfrido Arrúa, Pomposa Meza, Jessica Chang, José María porque siempre hemos trabajado en equipo en cada uno de los proyectos, así también la colaboración de Gabriela, Perla, Sandra y Bárbara para los trabajos en el bioterio.

A los miembros de los Dpto. de Bioquímica Nutricional, Fitoquímica y Botánica, que me ayudaron con confianza y paciencia en mis trabajos experimentales.

A los compañeros de maestría y amigos, con ellos fue más fácil sobrellevar este proceso.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) y docentes, por brindarnos la oportunidad y acompañarnos arduamente en este proceso de formación científica.

## INDICE

### Tabla de contenido

RESUMEN .....	V
ABSTRACT.....	VI
INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVO GENERAL.....	2
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
El hígado .....	3
Hepatitis y la epidemiología .....	3
Medicina Tradicional.....	4
Modelo de hepatotoxicidad.....	6
Silimarina .....	7
Marcadores serológicos.....	8
Antioxidantes .....	10
MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
Reactivos .....	12
Materiales y equipos.....	12
Obtención del material vegetal.....	13
Análisis fitoquímico preliminar.....	14
Procedimiento de extracción para la determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante total .	16
Determinación de compuestos fenólicos totales (TPC).....	16
Determinación de la capacidad antioxidante total (TAC).....	17
Animales de experimentación .....	19
Ensayo de toxicidad oral aguda.....	19
Evaluación de comportamiento general (test de Irwin).....	20
Hepatotoxicidad inducida por paracetamol .....	21
Determinación de los niveles de transaminasas séricos.....	22
Análisis estadísticos .....	22
Asuntos éticos .....	23
RESULTADOS .....	24
Análisis Fitoquímico Preliminar.....	24
Determinación de fenoles totales.....	25
Capacidad antioxidante total.....	26
Evaluación de comportamiento general.....	27

Determinación del efecto hepatoprotector de <i>A. edulis</i> .....	27
DISCUSIÓN .....	31
CONCLUSIÓN .....	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35
ANEXO.....	44

## DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Allophylusedulis*

Autor: Antonia Karina Galeano Ruíz Díaz

Tutor: Prof. Dra. María Luisa Kennedy Rolón

Co-tutor: Prof. Dr. Miguel Ángel Campuzano Bublitz

### RESUMEN

*Allophylus edulis* Radlk., "kokū" (*Sapindaceae*) es utilizada en la medicina popular principalmente para las afecciones del hígado como la hepatitis, cáncer de hígado y cirrosis hepática. Existen reportes de actividad anti-hepatotóxica *in vitro* de la planta, por lo tanto, el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto hepatoprotector del extracto etanólico de *A. edulis* en ratones. Esto fue realizado mediante la determinación de la seguridad del extracto en primer lugar, evaluación sobre el comportamiento general de ratones y posteriormente se verificó el efecto sobre la hepatitis tóxica inducida por paracetamol en ratones macho. Adicionalmente, se realizó el perfil fitoquímico y se cuantificó el contenido de fenoles totales y su capacidad antioxidante total a través del método del catión radical ácido 2,2,azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfónico (ABTS). Los resultados indicaron que el extracto de *A. edulis* es seguro hasta una dosis de 2000mg/kg vía oral. Los principales grupos de metabolitos secundarios hallados fueron flavonoides, triterpenoides y taninos, así también un elevado contenido de compuestos fenólicos se relaciona con su elevada capacidad antioxidante. En cuanto a los resultados de los ensayos biológicos, el extracto de *A. edulis* no afecta el comportamiento general de los ratones, y todas las dosis ensayadas disminuyeron la actividad de las principales enzimas hepáticas marcadores (GPT, GOT) de daño hepatocelular.

Según el modelo empleado y los resultados obtenidos *A. edulis* posee una actividad hepatoprotectora, que podría deberse a su actividad antioxidante.

**Palabras claves:** *A. edulis*, "kokū", hepatotoxicidad, ratones, GOT, GPT, capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, comportamiento general.



## DETERMINATION OF THE HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY OF THE ETANOL EXTRACT OF *Allophylus edulis*

Author: Antonia Karina Galeano Ruíz Díaz

Advisor: Prof. Dra. María Luisa Kennedy Rolón

Co-advisor: Prof. Dr. Miguel Ángel Campuzano Bublitz

### ABSTRACT

*Allophylus edulis* Radlk., "kokū" (*Sapindaceae*) is used in folk medicine mainly for liver conditions such as hepatitis, liver cancer and liver cirrhosis. There are reports of *in vitro* anti-hepatotoxic activity of the plant, therefore, the objective of the work was to evaluate the hepatoprotective effect of the ethanolic extract of *A. edulis* in mice. This was done by first determining the safety of the extract, evaluating the general behavior of mice and subsequently verifying the effect on paracetamol-induced toxic hepatitis in male mice. Additionally, the phytochemical profile was performed, and the content of total phenols and its total antioxidant capacity were quantified through the 2,2, azinobis- (3-ethylbenzothiazoline) -6 sulfonic acid radical cation (ABTS) method. The results indicated that the extract of *A. edulis* is safe up to a dose at 2000mg / kg v.o. The main groups of secondary metabolites found were flavonoids, triterpenoids and tannins, as well as a high content of Total phenolic compounds (TPC) is related to their high antioxidant capacity. Regarding the results of the biological tests, the *A. edulis* extract did not affect the general behavior of the mice, and all the doses tested decreased the activity of the main liver enzymes markers (GPT, GOT) of hepatocellular damage.

According to the model used and the results obtained, *A. edulis* has a hepatoprotective activity, which could be due to its antioxidant activity.

**Key words:** *A. edulis*, kokū, hepatotoxicity, mice, GOT, GPT, antioxidant capacity, phenolic compounds, general behavior.

## INTRODUCCIÓN

El hígado, ubicado entre la superficie de absorción del tracto gastrointestinal y el blanco farmacológico del cuerpo, es imprescindible para el metabolismo de prácticamente todas las sustancias extrañas (Wolff, 2010). Por lo tanto, la aparición de un proceso patológico como la hepatitis resulta en un problema de salud pública, debido a que generalmente cursa de manera asintomática, es decir, los síntomas aparecen en un estado avanzado de la enfermedad, y de acuerdo al informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) gran parte de los afectados no cuentan con recursos suficientes para solventar los gastos del diagnóstico y tratamiento, propiciando el avance de esta enfermedad silenciosa, lo cual explica su alta tasa de morbilidad y mortalidad en los afectados (OMS, 2014; OMS, 2017; OPS-Paraguay, 2016).

El *Allhopylus edulis*, popularmente conocido como "kokū", es una planta originaria de Paraguay utilizado según el uso popular para tratar afecciones hepáticas, pero hasta la fecha existe sólo un reporte de la actividad anti-hepatotóxica *in vitro* de esta planta (Díaz, 2008; Hoffmann-Bohm et al., 1992). Por lo tanto, es necesario complementar esta información empleando ensayos *in vivo*, los cuales son primordiales para proveer mayor información científica que contribuya a la validación del uso popular del "kokū".

**OBJETIVO GENERAL**

- ✓ Evaluar la actividad hepatoprotectora de *Allophylus edulis* en ratones.

**OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- ✓ Determinar la toxicidad aguda vía oral del extracto de *Allophylus edulis*.
- ✓ Identificar los principales metabolitos secundarios presentes en el extracto.
- ✓ Cuantificar actividad antioxidante total del extracto de *Allophylus edulis*.
- ✓ Analizar el comportamiento general y actividad general de los ratones tratados con el extracto como parte de la verificación de efectos generales que presenta.
- ✓ Determinar la actividad de enzimas séricas marcadoras de lesión hepática causada por paracetamol según diferentes concentraciones utilizadas del extracto en estudio.

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

### **El hígado**

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo humano, pesa entre 1200-1500 gramos lo cual representa aproximadamente el 2,5% del peso corporal, funciona como reservorio de sangre ya que posee la capacidad de expandirse, pudiendo almacenar hasta un litro de sangre extra. Este órgano cumple numerosas y complejas funciones, que pueden clasificarse en metabólicas, de almacenamiento, de detoxificación e inmunológicas. Con relación a las funciones metabólicas, el hígado sintetiza proteínas plasmáticas, ácidos grasos y se encarga del metabolismo de los hidratos de carbono, también almacena vitaminas liposolubles (A, D y E), metales como el hierro y el cobre y la vitamina K, detoxifica fármacos y otro tipo de producto químico que no sean hidrosolubles, a través de las enzimas hepáticas que se encargan de oxidar, reducir, hidrolizar o desmetilar a los mismos y por último las células de Kupffer se encargan de las funciones inmunológicas del hígado (Segarra,2006).

### **Hepatitis y la epidemiología**

La hepatitis es una inflamación del parénquima hepático acompañada o no de necrosis hepatocelular, pudiendo deberse a diversas causas tales como los agentes infecciosos donde

se encuentran los virus de la hepatitis A, B, C, D y E quienes representan la principal causa; así también puede deberse a sustancias tóxicas (alcohol, fármacos u otras drogas), trastornos autoinmunitarios o metabólicos (Segarra, 2006).

El virus de la hepatitis C puede ocasionar un daño hepático grave, debido a que cursa de manera asintomática, pudiendo los síntomas aparecen luego de varios años de haberse infectado con el virus. Esto incluye; ictericia (coloración amarillenta de piel y ojos), orina oscura, fatiga intensa, náuseas, vómitos, dolor abdominal (OMS, 2014). Es por eso que las hepatitis virales pueden ocasionar hepatitis aguda y crónica, y se estima que las infecciones del hígado por el virus de la hepatitis B o C conllevan en un 57% a una cirrosis hepática y en un 78% a un cáncer hepático y matan a cerca de 1,4 millones de personas al año en todo el mundo, lo cual representa una alta tasa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, razón por la cual es considerado como una epidemia silenciosa (OMS,2017).

Según un comunicado de la OMS, en el 2017 cerca de 325 millones de personas padecía Hepatitis B o C a nivel mundial, siendo esta cifra 10 veces mayor al de los infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), también ha informado que gran parte de los afectados carecen de recursos para realizarse las pruebas de detección y solventar los tratamientos necesarios para salvarles la vida. Lo cual implica que estas personas poseen alta probabilidad de que las infecciones que padecen evolucionen hacia una insuficiencia hepática crónica, cáncer y muerte. En el 2015, las hepatitis víricas han ocasionado más de 1,34 millones de muertes en el mundo, 125,000 de esas muertes se dieron en América. Por lo tanto, la hepatitis es un problema de salud pública (OMS, 2017; OPS-Paraguay,2016).

### **Medicina Tradicional**

Según la OMS, la medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (OMS, 2002). La tradición del uso de plantas medicinales remonta a la época pre-histórica hasta la actualidad, esto se debe principalmente a que es una opción rentable en salud pública, para gran parte de población de países en desarrollo como el Paraguay, esto se evidencia ya que el 80% de la población lo utiliza, debido al bajo costo, y las debilidades

de los sistemas de atención primaria de salud. Además, la venta de las plantas "frescas o refrescantes" es muy tradicional en nuestro país, debido a que son incorporadas en la bebida típica refrescante "tereré" la cual es consumida de manera masiva. En relación con lo anterior, el "kokū" presenta una elevada demanda de consumo a nivel local (DGPE-MAG, 2008; OMS,2004).

La gran mayoría de las plantas medicinales son recolectadas de su hábitat natural para luego comercializarlo, pero esta práctica delimita la calidad, eficacia y seguridad de los mismos, ya que existe un gran número de factores relacionados a la época de recolección, procedimientos post-cosecha (ejemplo el lavado, preparado en mazos para la comercialización, entre otros), la sobreexplotación y falta de supervisión por parte de personas idóneas. No obstante, muchas personas recurren a diversos tipos de plantas medicinales porque lo consideran inocuo (DGPE-MAG, 2008).

En contrapartida, a medida que ha aumentado el uso de las medicinas tradicionales, también ha aumentado el número de informes sobre reacciones adversas. En China, los productos tradicionales se utilizan ampliamente en paralelo con la medicina convencional, en 2002 se tuvo conocimiento de 9,854 casos de reacciones adversas a los medicamentos tradicionales (OMS, 2004). Por eso, la OMS ha emitido un comunicado enfatizando la necesidad de disponer información e instrumentos a los consumidores de todo el mundo que les permitan acceder a tratamientos adecuados, seguros y eficaces (OMS, 2004).

### ***Allophylus edulis* (kokū)**

*Allophylus edulis* Radlk. (StHil. Juss et Camb.) o *Allophylus guaraniticus* (StHil.Juss et Camb.) conocida popularmente como "kokū" o "cocú", "pykasú- rembí'u" o "fruta de paloma", "baya de murciélago", "chal-chal" es una planta perteneciente a la familia *Sapindaceae* originaria de Paraguay, pero también se encuentra en Argentina, Brasil, Guayanas, Bolivia y Uruguay. Es un arbusto, con tallos ramificados, hojas puntiagudas alargadas de color verde esmeralda, bordes dentados, flores amarillas, los frutos maduros son dulces y comestibles, además, la madera es de buena calidad, útil en carpintería (Díaz, 2008; González, 1996; Azevedo et al., 2005; López et al.,2010).

Entre los compuestos aislados de la especie, se incluyen la presencia de cianolípidos en semillas (Aichholz et al., 1997), L-quebrachitol en las ramas (Díaz, 2008), compuestos fenólicos en ramas y hojas, flavonoides y dihidroisocumarina en el extracto bruto de la planta (Mitchell, 1988), C- glicosilflavonas en hojas (Hoffmann-Bohm et al., 1992) y

sesquiterpenos (Amengual, 1974). Así también, en un análisis fitoquímico de las especies de Argentina fue reportado la presencia de esteroides, triterpenoides, quininas, alcaloides, leucoantocianidinas y aceite esencial (Bandoni et al., 1972).

Las propiedades medicinales son atribuidas a las hojas, la infusión se emplea para las afecciones del hígado como la hepatitis, cáncer de hígado y cirrosis hepática, además como estimulante de las vías biliares, inflamaciones de la garganta, problemas intestinales, anti-diabético, colagogo, en tanto que las hojas en cocción se utilizan para lavar heridas y contra la presión alta (López et al., 1987). En cuanto a las actividades reportadas se encuentra, la actividad anti-hepatotóxica *in vitro* de las hojas de *Allophylus edulis* variedad *gracilis* colectadas en Asunción y ensayado en cultivo primario de hepatocitos con daño inducido por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) y galactosamina, con lo cual se constató que la C-glicosiflavona presente en las hojas posee un rol importante en la actividad antihepatotóxica de la planta (Hoffmann-Bohm et al., 1992), así también fueron reportados; acción inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (Mitchell, 1988), antiulcerogénica (Dharmani, 2005), genotóxica (Yayía et al., 1999), actividad repelente contra insectos como el áfido *Myzus persicae* y el coleóptero *Epilachna paenulata* (Castillo et al., 2009), actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y baja toxicidad (Signor et al., 2015).

### **Modelo de hepatotoxicidad**

El modelo experimental empleado es la lesión hepática aguda en ratones, en el cual se induce el daño hepático empleando paracetamol o APAP (del inglés, *N-acetyl-p-aminophenol*), puesto que a diferencia de otros modelos animales, la sobredosis de APAP en ratones conduce a una lesión hepática aguda como en humano (Mossanen & Tacke, 2015; Davidson & Eastham, 1966; Mitchell, 1988).

El paracetamol es un fármaco analgésico y antipirético de venta libre muy utilizado, seguro en dosis terapéutica (Dahlin et al., 1984). Luego de una dosis baja de paracetamol, el 85-90% se metaboliza en el hígado vía Fase II donde es conjugado con sulfatos y glucurónidos, para luego ser excretado en orina y bilis (Dahlin et al., 1984). Un 2% se excreta en orina sin cambios, en tanto que el 10% restante es oxidado en la Fase I por el citocromo P450 (CYP450) a través de las isoformas CYP1A2, CYP3A11 y CYP2E1 (principal) en N-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI) un electrófilo tóxico muy reactivo,

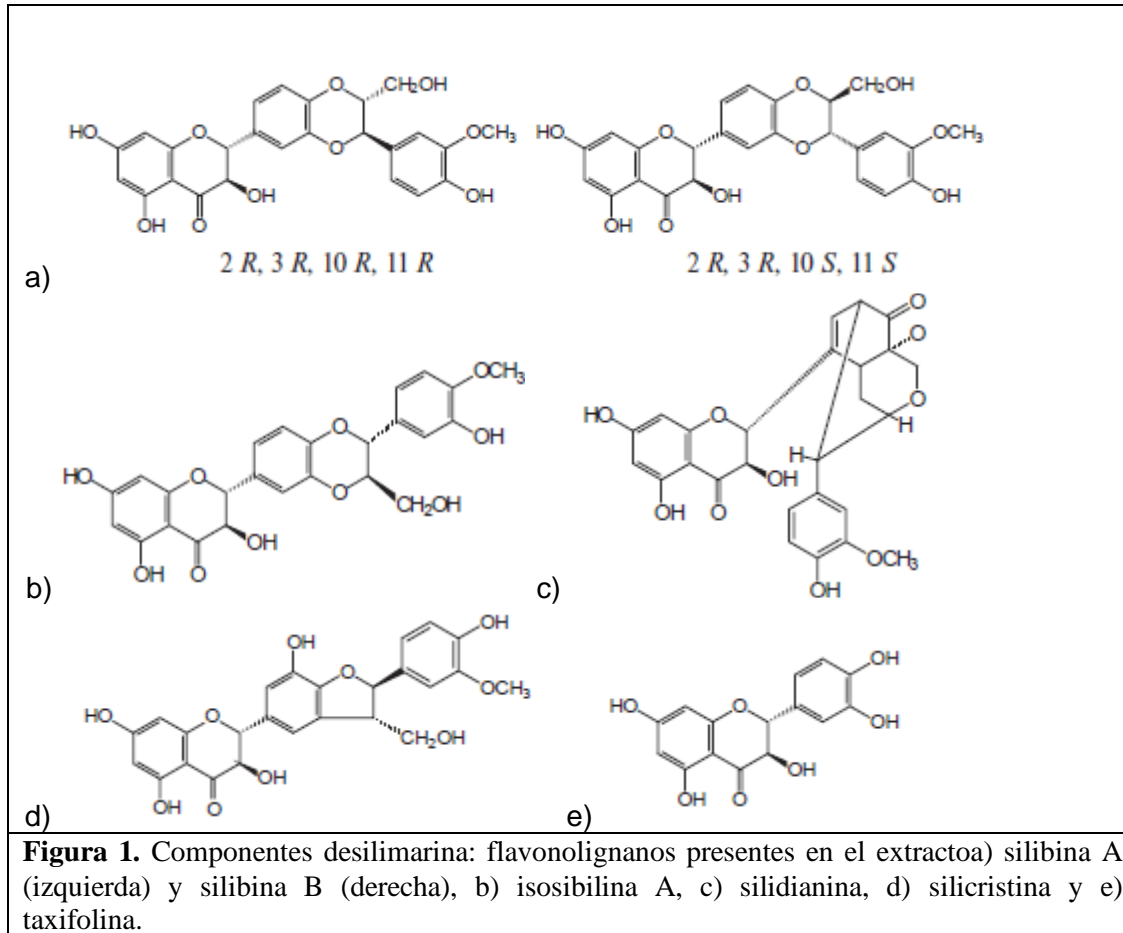
que es inactivado a través del glutatión hepático (GSH) en 3-S- Glutathionilacetaminofeno (APAP-GSH) que posteriormente es excretado en orina, en tanto que una pequeña cantidad de NAPQI es oxidado por mieloperoxidasa y ciclo oxigenasa-1 (COX-1), pero ésta vía aún no está aclarada. Sin embargo, en dosis tóxicas de paracetamol, la sulfatación y glucuronidación se encuentran saturados, por lo que la metabolización ocurre principalmente en la Fase I, entonces hay una mayor producción de NAPQI que conduce al agotamiento de GSH, cuando éste se agota en un 70-80%, el NAPQI se une de manera covalente a los grupos de cisteína (Cys) de moléculas de hepatocitos formando aductos de proteína APAP, éste paso es irreversible y conduce a lesiones oxidativas y necrosis hepatocelular (Arnaiz et al., 1995). Además, se ha informado que el paracetamol puede inducir un aumento significativo estadísticamente de las enzimas hepáticas, en ratones tratados vía ip. con paracetamol en dosis tóxicas (Dai et al., 2006; Hinson et al., 1998).

### **Silimarina**

La silimarina es un complejo polifenólico obtenido a partir de la semilla de la planta *Silybum marianum* perteneciente a la familia *Asteraceae* conocido como Cardo mariano. El extracto de silimarina contiene aproximadamente 70 a 80% de flavonolignanos (complejo de silimarina) y el 20 a 30% es una fracción químicamente indefinida, que contiene principalmente compuestos polifenólicos poliméricos y oxidados. Los flavonolignanos o complejo de silimarina contienen; silibina o silibinina (mezcla de silibina A: silibina B en proporción 1:1), isosibilina, deshidrosibilina, silicristina, silidianina, y un flavonoide taxifolina (Kren & Walterova, 2005, Fig. 1)

La silimarina ha sido utilizado desde la antigüedad hasta la fecha (aproximadamente 2000 años) para el tratamiento de enfermedades del tracto gastrointestinal (TGI) y hepáticas como la cirrosis, hepatitis crónica, enfermedades hepáticas asociadas al consumo de alcohol, exposición a toxinas ambientales que se debe a su efecto hepatoprotector y antioxidante, para lo cual además fue demostrado que mejora las pruebas de la función hepática (Blumenthal, 2015), así también posee otras actividades que han sido descubiertas en los últimos años como anticáncer y cancero-protector lo cual se ha comprobado en diversos órganos o sistemas tales como el próstata, pulmón, riñón, páncreas, piel y otros (Jacobs et al., 2002). Por lo demás, su utilización ha sido considerado muy seguro, ya que hasta la fecha han sido reportados muy pocos efectos adversos (Kenneth et al., 1998).



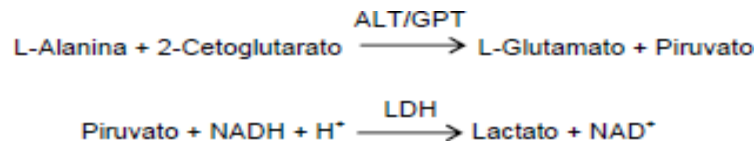


### Marcadores serológicos

Las funciones hepáticas se pueden evaluar mediante una serie de determinaciones bioquímicas, de las cuales aquellas que permiten analizar una posible lesión hepática son las actividades enzimáticas de las transaminasas o aminotransferasas séricas, unas enzimas del metabolismo hepático encargadas de catalizar reacciones de transaminación, es decir, transferencia de grupos amino o alanina (García & Amado, 2015).

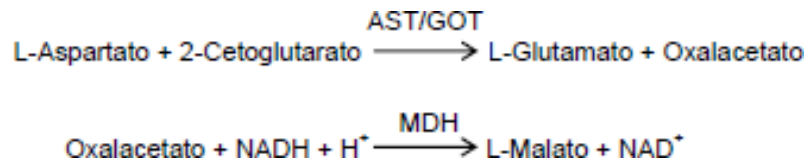
La alaninaamino transferasa (ALT) o transaminasa glutámico pirúvica (GPT) es una enzima que se encuentra principalmente en el citosol de los hepatocitos, y se eleva sus niveles en sangre cuando existe una destrucción o cambio de permeabilidad de las membrana celular hepática. El método empleado para su determinación es la UV optimizado (IFCC) basada en la transferencia del grupo amina de la L-alanina al  $\alpha$ -cetoglutarato con la formación de L-glutamato y piruvato catalizado por GPT respectivamente y luego el piruvato es reducido a L-lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH) en presencia de nicotinamido-adenin-dinucleótido reducido (NADH), como se

muestra en el siguiente esquema (Schumann et al., 2002; Young, 1997);



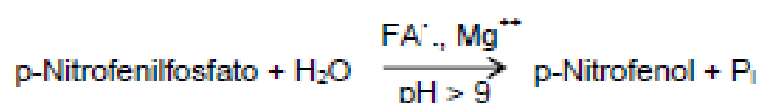
La disminución cinética de la absorbancia debido a la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup> se controla a 340nm. La velocidad de disminución de la absorbancia de la mezcla de reacción es directamente proporcional a la actividad de la enzima GPT en la muestra (Young, 1997).

La aspartatoamino transferasa (AST) o transaminasa glutámico oxalacética (GOT) es una enzima ampliamente distribuida en el organismo. Se localiza en el citoplasma y mitocondria de células de diferentes órganos y tejidos como el hígado, riñón, músculo esquelético y cardíaco, páncreas y cerebro. El método utilizado para su determinación es la UV optimizado (IFCC) basada en que la GOT cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al 2-oxoglutarato, con la formación de oxalacetato y glutamato, posteriormente el oxalacetato es reducido a malato con la ayuda de malato deshidrogenasa (MDH) en presencia de NADH, como se muestra a continuación (Schumann et al., 2002; Young, 1997);



La disminución de la absorbancia debido a la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup> ocurre de manera cinética y es controlada a 340nm, siendo este cambio proporcional a la actividad de GOT en la muestra (Young, 1997).

La fosfatasa alcalina (FA) es una enzima localizada en el hígado, hueso, placenta, sistema retículo endotelial y vascular. El método cinético optimizado empleado para su medición está basado en la reacción en el cual la FA hidroliza al p-nitrofenilfosfato (p-NFF) produciendo fosfato inorgánico y p-nitrofenol a pH 9,8, como se muestra a continuación (CBN, 1972; Young, 1997);



Donde la velocidad de aparición de p-nitrofenol es controlado midiendo la absorbancia a 405nm, siendo este cambio proporcional a la actividad enzimática de la FA en la muestra (Young, 1997).

### **Antioxidantes**

Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar los radicales libres de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen specie*) que incluyen al radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el oxígeno singlete ( $^1\text{O}^*$ ) además de especies reactivas de nitrógeno (RNS, del inglés *reactive nitrogenspecie*) convirtiéndolos en especies no radicales, logrando así disminuir o evitar los daños por oxidación (Ciappini et al., 2013; S. Martínez-Flórez et al., 2002; Blasa et al., 2007). El organismo cuenta con sistemas de defensa antioxidante que se clasifican en; antioxidantes endógenos enzimáticos: que incluyen a superóxidodismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión reductasa (GR) (Vázquez, 2012), en tanto que los sistemas antioxidantes no enzimáticos comprenden; albúmina, ceruloplasmina, transferrina, glutatión, bilirrubina, ácido úrico, ubiquinona o melatonina (Sandoval et al., 2013; Sies, 1991).

Pero debido a que un evento patológico conlleva a una pérdida del equilibrio entre la producción de radicales libres y el sistema de defensa antioxidante del organismo, es recomendable proveer al organismo antioxidantes de origen exógeno que abarcan a; vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E ( $\alpha$ - tocoferol),  $\beta$ -caroteno, y polifenoles provenientes de plantas (Sandoval et al., 2013).

Cabe mencionar, que entre los compuestos sintetizados a partir del metabolismo secundario de las plantas con actividad antioxidante se encuentran: los taninos, compuestos fenólicos, flavonas, flavonoles, lignanos, estilbenos, cumarinas, quinonas, xantonas, catequinas, antocianinas y proantocianinas que pueden actuar por diferentes mecanismos tales como; donadores de hidrógeno, agentes reductores, eliminadores de ROS, o quelantes de iones metálicos, y de esa manera interferir o evitar las reacciones de propagación de radicales libres (Ciappini et al., 2013; Martínez-Flórez et al., 2002; Marwah et al., 2007).

Así mismo, los compuestos fenólicos poseen en su estructura uno o más anillos aromáticos con un sustituyente hidroxilo como mínimo, siendo esa estructura favorable para secuestrar

radicales libres y en consecuencia su consumo se ha relacionado beneficioso para el tratamiento de cáncer, enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, inflamación y daño oxidativo como en caso de las enfermedades hepáticas, puesto que el estrés oxidativo posee un papel fundamental en la aparición y progresión de las enfermedades hepáticas, por lo tanto, en la actualidad la propiedad antioxidante proveniente de plantas medicinales para la prevención o tratamiento de patologías hepáticas son de interés (Saha et al., 2019; Sandoval et al., 2013).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

Fueron utilizados, solución de NaCl al 0,9% y los siguientes reactivos de calidad analítica: paracetamol y silimarina de *Sigma Chemical Company Mo.*, pentobarbital sódico de Nembutal, agua destilada, alcohol etílico absoluto 99,5% de CICARELLI Laboratorios, persulfato de amonio, etanol y propilenglicol obtenidos de localmente de Italquímica, Trolox de *AldrichChemistry* y ácido gálico monohidratado 98+% A.C.S. de *Sigma-Aldrich* utilizados como antioxidante de referencia, ABTS de *AppliChen*, extracto etanólico de *Allophylus edulis* ("kokū"), kits para la determinación de FA, GOT, GPT y sueros de control multiparámetros HumaTrol N/P de margen normal y anormal respectivamente, obtenidos de *Human Diagnostic World wide reagent*.

### Materiales y equipos

Se citan a continuación los materiales utilizados: jeringas de 1mL para administración intraperitoneal y punción cardíaca, cánula para administración vía oral, vaso de precipitado, embudo de *büchner*, pipetas automáticas, pipetas volumétricas de 1mL, 2mL, 3mL, 5mL y 10mL, pro- pipeta, punteras amarillas y azules, tubos de ensayo, espátula, tubo de microcentrífuga, gradilla, matraz, embudo, papel de filtro, erlenmeyer, papel de aluminio y tubo falcon.

Los equipos utilizados: balanza para animales (Shimadzu), balanza analítica (METTLER AE 100), balanza granataria (KERNPFB), vórtex (AutomaticmixerS-100), estufa (Advantec-JICA), baño María (Jalubo SW23 y BÜCHI 461 WaterBath), sonicador (QUIMIS), motor de vacío (KIF NeubergerInc), rotavapor (Cole-Parner) con enfriador (Polystat), centrífuga (HERMLE Z216M), centrífuga refrigerada (HealForce), espectrofotómetro UV-800 y equipo de análisis químico semiautomático (BioSystems BTS-350).

### **Obtención del material vegetal**

Las hojas de *Allophylus edulis* ("kokū") fueron recolectadas del barrio Mbokajaty de la ciudad de Julián Augusto Saldívar (25°26'50,4"S y 57° 27'07,1W), y fueron identificadas por investigadores del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Químicas. Un ejemplar de herbario fue archivado en el herbario de la FCQ (G Delmás 284). Las hojas fueron secadas a temperatura ambiente y en estufa a 40°C, para posteriormente reducir las a polvo con la ayuda de un molino de cuchillas obteniéndose un total de 414,24g de polvo de las hojas de "kokū". Para la obtención del extracto se emplearon 200g del polvo y el resto del polvo fue reservado bajo refrigeración.

El polvo de las hojas de "kokū" fue macerado con alcohol etílico al 96% a temperatura ambiente, luego se procedió a sonicar (dos veces) a 30°C durante 30 minutos con un reposo de 15 minutos entre cada operación, esto se repitió tres veces en el día y posteriormente se volvió a agregar alcohol etílico al 96% hasta cubrir todo el material mezclando suavemente y se dejó reposar durante toda la noche cubierto con papel de aluminio. Al día siguiente se procedió a realizar el filtrado al vacío del material, donde el filtrado fue colectado, en tanto que el residuo de extracción del "kokū" se volvió a macerar en alcohol etílico al 96% y se repitió los pasos del día anterior, esto se realizó durante tres días.

Seguidamente, el marco de la extracción se agregó a un balón de 3000mL con aproximadamente 1000mL de alcohol etílico al 96%, y fue llevado a reflujo durante 15 minutos. Se dejó reposar durante toda la noche para que pueda enfriarse, al día siguiente se filtró al vacío, el extracto fue separado y el residuo nuevamente fue llevado a reflujo en las mismas condiciones descritas, este procedimiento se repitió tres veces.

Finalmente se procedió a concentrar el filtrado recolectado anteriormente con la ayuda de

un rotavapor a una temperatura aproximada de 40°C hasta la eliminación total del disolvente, obteniéndose un extracto de consistencia pastosa, que fue almacenado en un desecador.

### **Análisis fitoquímico preliminar**

Se realizó la investigación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en el extracto según la metodología descrita (Sanabria-Galindo, 1983; Sanabria-Galindo et al., 1997). Brevemente con algunas modificaciones,

- a) Taninos. Se empleó la reacción de cloruro férrico o alumbre férrico, a 0,02 g del extracto de *A. edulis* disuelto en agua destilada se añadió 5-6 gotas de cloruro férrico, una coloración verde o azul indica la presencia de taninos. En la reacción con acetato de plomo, a 0,02 g del extracto de *A. edulis* disuelto en agua destilada se añadió 5-6 gotas de acetato de plomo 5%, la aparición de un precipitado pardo, indica la presencia de taninos.
- b) Azúcar reductor. Se empleó la reacción de Fehling, brevemente a 0,02 g del extracto de *A. edulis* disuelto en agua destilada, se añadió 10 gotas de Fehling A y 10 gotas de Fehling B, luego se hirvió durante 3 a 4 minutos, y la formación de un precipitado rojo ladrillo, es indicativo de la presencia de azúcares reductores.
- c) Azúcar no reductor. Se agregó 5 gotas de HCl a 0,02 g del extracto de *A. edulis* disuelto en agua destilada y fue colocado en baño María hirviendo durante 2 minutos, después se neutralizó con NaOH al 10%. Posteriormente se empleó la reacción de Fehling tal como fue descrito anteriormente.
- d) Gomas. Se empleó 0,02 g del extracto de *A. edulis* disuelto en agua destilada más 10mL de alcohol de 95°, donde la formación de un precipitado blanco o un blanco turbio indica una reacción positiva para gomas.
- e) Saponinas. Se utilizó el método de la espuma, 0,02 g del extracto de *A. edulis* disuelto en agua destilada, fue colocado en un tubo de ensayo y se procedió a agitar vigorosamente durante 2 minutos, y la aparición de espuma persistente por más de 5 minutos se considera positivo.
- f) Antraquinonas y heterósidos de antraquinona. Se utilizó la reacción de Bornträger, brevemente a 0,02 g del extracto de *A. edulis* disuelto en cloroformo fue agregado 2mL de NH<sub>4</sub>OH y la aparición de una coloración rosa/violácea en la capa amoniacal

es indicativo de la presencia de antraquinonas. Además, se hirvió durante 5 minutos 0,02 g del extracto de *A. edulis* con 10mL de KOH y 1mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 6%, posteriormente se dejó reposar hasta que se enfríe y se filtró, al filtrado obtenido se agregó 10 gotas de ácido acético para luego extraerlo con 10mL de cloroformo, a la capa clorofórmica formada se añadió igual volumen de NH<sub>4</sub>OH, y seguidamente fue agitado. La aparición de una coloración roja más intensa al ser comparada con el resultado anterior, en la capa orgánica, indica reacción positiva para heterósido de antraquinonas.

- g) Flavonoides. Se empleó la reacción de NaOH, a 0,02 g del extracto de *A. edulis* disuelto en agua destilada, fueron agregados 3mL de NaOH diluido y la aparición de una coloración amarillo/anaranjado es indicativo de la presencia de compuestos con núcleo de la  $\gamma$ -benzopirona (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, isoflavonoides y xantonas).
- h) Carotenoides. Fue empleado 0,02 g del extracto de *A. edulis* en 10mL de cloroformo, filtrado y luego evaporado a sequedad en una cápsula de porcelana, a continuación, se re-disolvió con 0,5mL de cloroformo y luego se añadió 0,5mL de ácido sulfúrico concentrado, la aparición de una coloración azul índigo indica reacción positiva.
- i) Triterpenoides. La reacción de Liebermann-Burchard, se disuelven 0,02 g extracto de *A. edulis* en 10mL de cloroformo y luego se añaden unas gotas de anhídrido acético y se deje reposar por unos instantes, luego se agrega 2 gotas de ácido sulfúrico, y la aparición de una coloración rosa, verde, rojo, púrpura o azul indica una reacción positiva para triterpenoides.
- j) Alcaloides. A 0,02g del extracto de *A. edulis* se añadió 20mL de ácido sulfúrico al 1% manteniendo una agitación intermitente, seguidamente fue filtrado, y posteriormente se añadieron los siguientes reactivos como sigue;
- 0,1mL del filtrado + 1 gota de reactivo Mayer (sales de ioduro de potasio y mercurio), la formación de un precipitado blanco es indicativo de la presencia dealcaloides.
  - 0,1mL del filtrado + 1 gota de reactivo Dragendorff (sal de ioduro de potasio), la formación de un precipitado rojo anaranjado es indicativo de la presencia dealcaloides.



## **Extracción para la determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante total**

Para la determinación de los compuestos fenoles totales y la capacidad antioxidante total del extracto etanólico de "kokū" se procedió primeramente a la extracción de fenoles presentes en el extracto (Mereles, 2015), como se muestra a continuación:

- 1°. Se pesó exactamente aproximadamente 1 gramo, medido en balanza analítica de extracto de *A. edulis* en tubo 1 Falcon.
- 2°. Se añadió 15 mL de la mezcla metanol:agua (1:1).
- 3°. Tres veces se agitó en vortex durante 5 minutos, cada 10 minutos.
- 4°. Fue sonicado durante 15 minutos a 30°C.
- 5°. Se procedió a separar el sobrenadante obtenido en un tubo 2 Falcon.
- 6°. Se añadió 10mL de la mezcla acetona: agua (70:30) al residuo restante del tubo 1 Falcon.
- 7°. Fueron repetidos los pasos 3°, 4° y 5°.
- 8°. Luego, se combinaron los sobrenadantes del tubo 1 y 2.
- 9°. Se filtró con papel *Whatman* cuantitativo en un matraz de 50mL y fue llevado a volumen con agua destilada.
- 10°. Se obtuvo un extracto de concentración 20mg/mL.
- 11°. Las diluciones fueron realizadas por triplicado en tubos de ensayo.
- 12°. Estos se emplearon en la determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante total.

El procedimiento se realizó por triplicado.

### **Determinación de compuestos fenólicos totales (TPC)**

El análisis de los TPC en el extracto etanólico de *A. edulis* se realizó en base al método descrito por (Singleton et al., 1999) utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu que es una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico que oxida los compuestos fenólicos a fenolatos a pH alcalino debido que se trata de un agente reductor (Peñarrieta et al., 2009) en una solución saturada de carbonato sódico que da como resultado un complejo azul de óxido de wolframio ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ) que se cuantifica por

espectrofotometría a 765nm en base a la curva de calibración de ácido gálico (Kuskoski et al., 2005; Ciappini et al., 2013).

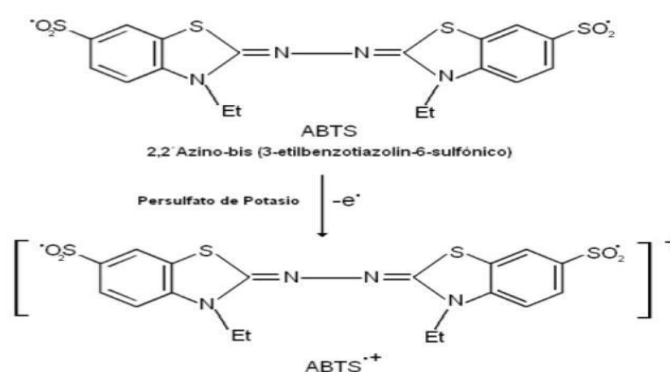
A continuación, se describe brevemente con algunas modificaciones primeramente se agregó 2,5mL de reactivo Folin-Ciocalteu previamente diluido diez veces con agua destilada y 2mL de carbonato de sodio saturado al 20%, se agitó vigorosamente y luego se agregó 500µL del extracto 20 mg/mL y 4mg/mL, se mezcló durante unos segundos y se incubó protegido de la luz durante 30 min a 40°C. La absorbancia fue leída a 765nm después de enfriar a temperatura ambiente, luego se comparó la absorbancia de cada muestra con la curva de calibración de ácido gálico (5- 150 µg/mL), cabe mencionar que fue utilizado agua destilada como blanco (Peñarrieta et al., 2009; Ciappini et al., 2013; Casillasa& Alvarado, 2016). Las muestras fueron analizadas por triplicado y la concentración del TPC fue expresado como mg Equivalente de ácido gálico (GAE) por cada 100 g de extracto (Re et al., 1999; Kuskoski et al., 2005; Povolo et al.,2019).

Para la preparación de la curva de calibración (ácido gálico), se empleó una solución madre de ácido gálico 250µg/mL (25mg/mL), y se preparó 6 (seis) diluciones diluidas de concentración creciente de 5 a 150 µg/mL lo cual se llevó a un volumen final de 25mL con agua destilada (Anexo, Tabla1).

Posteriormente, fue leída la absorbancia a 765nm para obtener la curva de calibración de ácido gálico (Anexo, tabla 2) (Mereles, 2015).

### **Determinación de la capacidad antioxidante total (TAC)**

La determinación de la capacidad antioxidante total se realizó según el método de (Re et al., 1999) con algunas modificaciones descritas por (Contreras-Calderón et al., 2010), que consiste en un método de decoloración del catión radical ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>). Brevemente, el radical ABTS<sup>•+</sup>se obtuvo tras la reacción de 10mL de ABTS 7mM con 10mL de persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 2,45mM (fig. 2) que fue incubado durante 20 horas a temperatura ambiente protegidos de la luz con papel aluminio, luego en el día de la evaluación se procedió a diluir el ABTS<sup>•+</sup>con etanol absoluto hasta ajustar el valor de la absorbancia a 0,7±0,2 a 730nm.



**Figura 2.** Formación del ABTS $^{\bullet+}$  a partir del persulfato de potasio.

Antes de realizar el ensayo de ABTS para la determinación de la TAC, se añadió 200 $\mu$ L de HCl 3M para disolver taninos presentes en el extracto y su posterior filtrado para eliminarlo por completo. Después se adicionó 2,5mL de la solución ABTS $^{\bullet+}$  a 200 $\mu$ L de extracto diluidos a partir de una concentración 160 $\mu$ g/mL (16-104 $\mu$ g/mL), se homogenizó y luego se incubó a 35°C durante 30 minutos y se procedió a leer la absorbancia a 730nm. No obstante debido a que la absorbancia de la primera dilución del extracto con concentración de 16 $\mu$ g/mL fue casi el 50% de la absorbancia del blanco, se preparó una segunda dilución del extracto (6,4-48,0 $\mu$ g/mL) y se repitió el procedimiento mencionado anteriormente. La cuantificación de la capacidad antioxidante total en el extracto se realizó por el método de regresión lineal, para lo cual se utilizó la curva estándar del antioxidante sintético de referencia trolox (0-320  $\mu$ M) empleando agua destilada como disolvente (Vit et al., 2008; Peñarrieta et al., 2009) y expresado la capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (TEAC) o  $\mu$ MTEAC/gramo de extracto que se logró tras corregir el resultado por los factores de dilución y el peso de la muestra, además se determinó la concentración inhibitoria efectiva 50 (IC50) que es la concentración del extracto ( $\mu$ g/mL) necesario para reducir en un 50% la actividad del radical ABTS y que posteriormente fue expresado como % de inhibición (%I) de la muestra que se calculó mediante la siguiente ecuación;

$$\%I = \frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} \times 100$$

$A_{control}$ : la absorbancia del disolvente.

$A_{muestra}$ : la absorbancia del extracto en estudio.

Por lo demás cabe destacar que la evaluación de la muestra se realizó por triplicado.

### **Animales de experimentación**

Se emplearon ratones albinos suizos (25-33 g) de 10-12 semanas de edad provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción (UNA), mantenidos bajo condiciones estándares (ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, temperatura  $22 \pm 5^\circ\text{C}$  y humedad  $50 \pm 5\%$ ), recibieron 7 g de alimento balanceado comercial por cada animal por día, y agua *ad libitum* (Zuñiga et al., 2008).

Partiendo de la cantidad aproximada de animales a ser utilizados en los ensayos *in vivo*, animales jóvenes de 10 a 12 semanas fueron puestos en reproducción en sistema harén (un macho y tres hembras) cuyo tiempo de gestación es de 21 días, una vez que nacieron las crías se permitió que fueran amantados por las madres nuevamente por 21 días para luego destetarlos y separar los ratones machos de las hembras en cajas diferentes y mantenidas hasta cumplir 10 a 12 semanas de edad (adulto joven) para su posterior utilización en los experimentos, cabe mencionar que durante todo ese tiempo los animales fueron mantenidos de manera controlada, en cuanto a la alimentación, higiene y bienestar animal (Zuñiga et al., 2008).

### **Ensayo de toxicidad oral aguda**

Este ensayo se realizó siguiendo las directrices del Test N° 420 de la Organización de Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) "Toxicidad Oral Aguda-Procedimiento de Dosis Fija", esta metodología se fundamenta en la utilización de dosis moderadamente tóxicas y evitar la administración de dosis que se espera que sean letales, así también aquellas dosis que se sabe que causa dolor y angustia severo (OECD/OCDE, 2002).

Brevemente, se emplearon dos grupos de cinco ratones hembra debido a que generalmente son un poco más sensibles en relación con los machos, con edad de 10 a 12 semanas, de

uso común, nulíparas, no embarazadas, con una variación de peso corporal no mayor al 20%. Uno de los grupos fueron tratados con las dosis fijas de 5, 50, 300 y 2000 mg/kg, vía oral y el otro grupo recibió el vehículo del extracto (etanol 5%: propilenglicol 40%: agua 55%), teniendo en cuenta un intervalo de tres días entre cada nivel de dosificación para lograr observar toxicidad retrasada en caso que hubiere, previamente fueron retenidos los alimentos balanceados de los animales no así el agua de bebida durante 1-2 horas antes del ensayo, para asegurar esto se realizaron cambios de camas (virutas) de las cajas. Los animales fueron observados cuidadosamente después de la administración durante los primeros 60 minutos, y periódicamente durante las primeras 4, 8, 12 y 24 horas respectivamente y a partir de allí durante 14 días para evidenciar signos de toxicidad subaguda o retardada, también fue registrado el peso corporal individual de los animales y el día 14 se realizó necropsia de los principales órganos para una evaluación macroscópica como son: pulmón, corazón, riñón, hígado y bazo (OECD/OCDE, 2002).

Durante la observación debía tenerse en cuenta algunos cambios indicativos de algún signo de toxicidad, entre ellos se encuentra, cambios en; la piel, pelaje, ojos, membrana mucosa, frecuencia respiratoria, sistema circulatorio, sistema nervioso central, actividad somatomotora, patrón de comportamiento, temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño, coma y muerte (OECD/OCDE, 2002).

#### **Evaluación de comportamiento general (test de Irwin)**

Para este ensayo se siguió el test de Irwin que consiste en un procedimiento de observación para evaluar efectos primarios de un fármaco o candidato a fármaco sobre el comportamiento y las funciones fisiológicas del Sistema Nervioso Central (SNC) (Roux et al., 2004; Zavala-Flores et al., 2013) para lo cual fueron utilizados ratones machos, divididos aleatoriamente en grupos de ocho animales. El grupo uno fue tratado con el vehículo del extracto vía oral, en tanto que los grupos 2, 3, 4 y 5 recibieron el extracto etanólico *A. edulis* en dosis de 50, 100, 200 y 400mg/kg respectivamente vía oral. Transcurridos 60 minutos y así también 24 horas de la administración correspondiente, fueron evaluados individualmente las manifestaciones neurológicas detalladas en la tabla 3, donde cada parámetro analizado fue interpretado como ausencia o presencia (Pellow et al., 1985; Lapa, 2003).

**Tabla 3.** Parámetros observados en el estudio de comportamiento general (*Gross behavior*, test de Irwin)

<b>Parámetro observado</b>	
Excitación	
Cola de Straub	
Saltos	
Hipersensibilidad a estímulos externos	
Esterotipias	
Comportamientos agresivo	
Sedación	
Marcha rodante	
Pérdida de equilibrio	
Pérdida de tracción	
Falta de coordinación motora	Indicado con cruces, de 1 a 4,
Hiposensibilidad a estímulos externos	según intensidad
Disminución del tono muscular	
Acinesia	
Catalepsia	
Hipotermia	
Respiración	
Dilatación de la pupila	
Variación de temperatura corporal	
Salivación	
Defecación	
Letalidad	

### **Hepatotoxicidad inducida por paracetamol**

Para realizar este ensayo fueron divididos aleatoriamente ratones machos en grupos de 8 animales cada uno. En la tabla 4 se detalla la distribución de estos. Antes del experimento los animales estuvieron sometidos a 6 horas de ayuno, pero con acceso libre al agua.

La duración del protocolo fue de cuatro días, durante los primeros tres días los animales sólo recibieron el tratamiento (tabla 4), en tanto que el cuarto día del ensayo recibieron el tratamiento y luego de 2 horas la dosis hepatotóxica de paracetamol (300 mg/kg, vía intraperitoneal), cabe mencionar que luego de la administración del paracetamol los animales tuvieron acceso a los alimentos balanceados durante 3 horas, y transcurrido ese tiempo se procedió a anestésarlos con pentobarbital sódico 40mg/kg para lograr obtener muestras de sangre por punción cardíaca, posterior e inmediatamente después de la extracción se procedió a sacrificarlos por dislocación cervical (Mossanen&Tacke, 2015).

**Tabla 4.** Distribución de grupos experimentales

<b>Grupos</b>	<b>Tratamiento, v.o.</b>	<b>Paracetamol</b>
Blanco	Vehículo Etanol:propilenglicol:agua (2.5:40:57.5)	No
Patológico	Vehículo	Sí
Control Positivo	**Silimarina 100 mg/Kg	Sí
Ae 50	**Extracto de <i>A. edulis</i> , 50 mg/Kg.	Sí
Ae 100	** Extracto de <i>A. edulis</i> , 100 mg/Kg	Sí
Ae 200	** Extracto de <i>A. edulis</i> , 200 mg/Kg	Sí
Ae 400	** Extracto de <i>A. edulis</i> , 400 mg/Kg	Sí

\*Inducción daño hepático; paracetamol 300 mg/kg, ip.

\*\*El extracto y la silimarina se disolverán en el vehículo mencionado

Por otro lado, cabe destacar que la lesión hepática aguda inducida en los animales puede asociarse a signos de fatiga y moverse más lentamente dentro de las primeras 12 horas después de la inyección de APAP. Las medidas que se tuvieron en cuenta fueron, que si los ratones hubieran presentado una temperatura corporal baja (hipotermia  $<35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), cambios en la respiración y no sean fáciles de despertar, debían ser sacrificados (Mossanen&Tacke,2015).

### **Determinación de los niveles de transaminasas séricos**

Una vez obtenida la muestra de sangre, estos fueron llevados a baño María a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos para facilitar el exudado del suero, posteriormente para lograr separar el suero a ser utilizado se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Las actividades de GPT, GOT y FA se determinaron a través del método UV optimizado (IFCC). La absorbancia fue medida a 340nm en un espectrofotómetro, y los resultados expresados en U/L (Dufour et al., 2000; Strömme&Eldjam,1974).

### **Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos en los diferentes grupos en estudio fueron expresados como promedios  $\pm$  desviación estándar. Los datos del ensayo de hepatoprotección se analizaron mediante el

programa *GraphPad Prism* versión 7.0, mediante análisis de varianza (ANOVA de una vía), seguida de test de comparación múltiple de Dunnett o Tukey, un nivel de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

### **Asuntos éticos**

Al tratarse de un estudio experimental con animales de laboratorio, los mismos fueron tratados como reactivos biológicos y en todo momento se trabajó de acuerdo con las normas establecidas en la comisión de ética de la comunidad Europea. El manejo de los animales se realizó a través de procedimientos estandarizados y la regla básica seguida es que todo animal tratado debe ser sacrificado, por dislocación cervical. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Facultad De Ciencias Químicas, UNA cuyo código del dictamen es CEI 469/19. Fueron empleados para los ensayos el número mínimo necesario, el menor tiempo de duración de la observación requerida para obtener datos consistentes. Cada animal fue empleado una sola vez (Real Decreto 1201/2005, 2005).



## RESULTADOS

### Análisis Fitoquímico Preliminar

Los resultados colorimétricos obtenidos indican la presencia (+) o ausencia (-) de los metabolitos secundarios en cuestión; taninos, azúcar reductor, azúcar no reductor, gomas, saponinas, antraquinonas, heterósidos de antraquinonas, flavonoides, carotenoides, triterpenoides y alcaloides respectivamente analizados de manera cualitativa y reportados en la tabla 5.

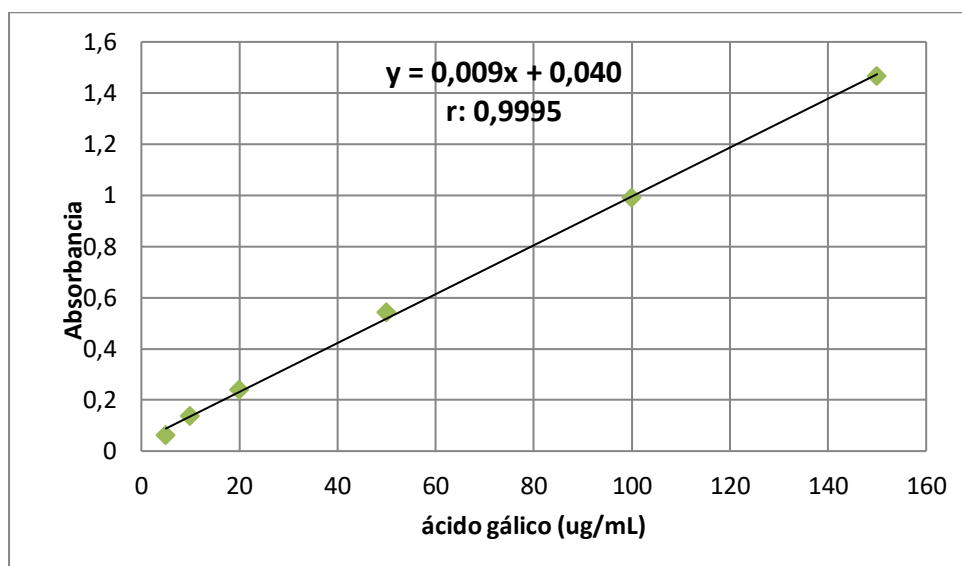
**Tabla 5.** Resultados del análisis fitoquímico cualitativo del extracto etanólico de hojas de *A. edulis*

Metabolito secundario*	Hojas de <i>A. edulis</i>
Taninos	Positivo
Azúcar reductor	Negativo
Azúcar no reductor	Negativo
Gomas	Negativo
Saponinas	Negativo
Antraquinonas	Positivo
Heterósidos de antraquinonas	Positivo
Flavonoides	Positivo
Carotenoides	Negativo
Triterpenoides	Positivo
Alcaloides	Negativo

\*Cada ensayo se realizó por duplicado.

### Determinación de fenoles totales

Para determinar el contenido de compuestos fenólicos totales se empleó la curva de calibración de ácido gálico como referencia que se muestra en la figura 3.



**Figura 3.** Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de los compuestos fenólicos totales del extracto etanólico de *A. edulis*.

Para la determinación de la concentración de compuestos fenólicos totales presentes en el extracto etanólico de *A. edulis* el ensayo fue realizado por triplicado, y el valor promedio obtenido en este estudio fue  $36,954 \pm 0,379$  mg GAE/100g de extracto como se muestra en la tabla 6.

**Tabla 6.** Compuestos fenólicos totales en el extracto de *A. edulis*

Extracto	Abs.	X (ug/ml)	Peso de muestra (g)	Factor dilución	mg GAE/100 g extracto	Promedio	SD
M <sub>1</sub>	0,184	14,96	1,0011	25	37,359		
M <sub>2</sub>	0,179	14,44	0,9861	25	36,609	36,954	0,379
M <sub>3</sub>	0,164	12,88	0,8728	25	36,893		

\*M: muestra, Abs.: absorbancia, X: concentración, SD: desviación estándar.

### Capacidad antioxidante total

En el ensayo de ABTS para el extracto de *A. edulis*, el valor de la capacidad antioxidante encontrado fue de  $50,214 \pm 0,896$   $\mu$ MTEAC/gramo de extracto, en tanto que el valor de la capacidad antioxidante expresado en IC50 fue  $17,255 \pm 0,346$   $\mu$ g/mL. En este ensayo el estándar de referencia utilizado fue el Trolox cuyo valor de IC50 obtenido fue  $33,722$   $\mu$ g/mL. Todos los gráficos y tablas se encuentran en el apartado de anexo (tablas 7 y 8; gráficos 1 y 2).

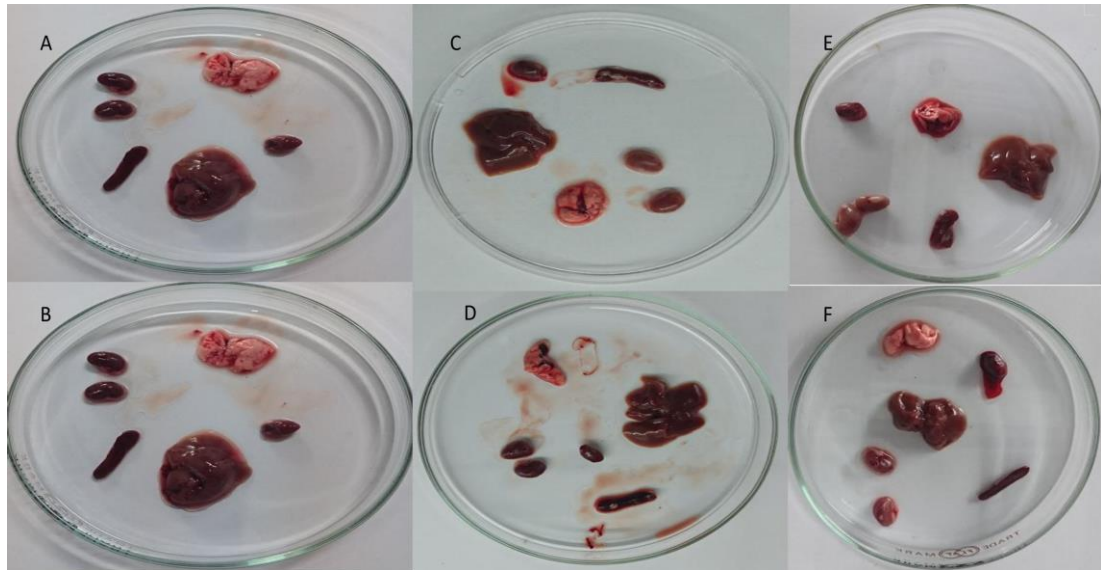
### Toxicidad aguda de *A. edulis*

Los animales tratados según el protocolo de dosis fija con 5, 50, 300 y 2000mg/kg del extracto etanólico de *A. edulis* respectivamente no presentaron signos de toxicidad mencionado en la tabla 2, incluyendo la mortalidad de los mismos. Cabe mencionar que durante los 14 días de observación los pesos registrados de cada animal tratado no presentaron variación significativa (tabla 9).

**Tabla 9.** Valor de peso inicial y final de los animales durante 14 días de observación durante la evaluación de toxicidad aguda.

Grupos	Nº	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Vehículo	1	30,74	30,78
	2	25,85	26,79
	3	25,61	26,04
	4	27,32	27,12
	5	26,72	26,29
Extracto <i>A. edulis</i>	1	28,10	28,38
	2	24,47	26,22
	3	28,68	29,21
	4	27,89	29,15
	5	25,45	26,76

En cuanto a la evaluación macroscópica de los órganos, fue constatado mediante análisis visual que no hubo ninguna variación entre los grupos (figura 4).



**Figura 4.** Evaluación morfológica de los principales órganos de ratones tras 14 días de observación en el ensayo de toxicidad oral aguda del extracto de *A. edulis*. **A, B.** Órganos de ratones del grupo blanco. No se observa hipertrofia ni opacidad de los órganos. **C, D, E, F.** Órganos de ratones del grupo tratado con el extracto de *A. edulis*.

Por lo tanto, según el test N° 420 de la ODCE la administración vía oral del extracto etanólico de *A. edulis* es segura hasta la dosis 2000mg/kg, debido a que no fueron observados ni signos de toxicidad ni muerte de ningún animal estudiado.

#### **Evaluación de comportamiento general**

No fueron observados cambios en el comportamiento general de los ratones tratados vía oral con el extracto de *A. edulis* a diferentes dosis (50, 100, 200 y 400 mg/Kg) con respecto al grupo blanco tratado con la mezcla etanol:propilenglicol:agua, durante los primeros 60 minutos del tratamiento y luego de las 24 horas respectivamente.

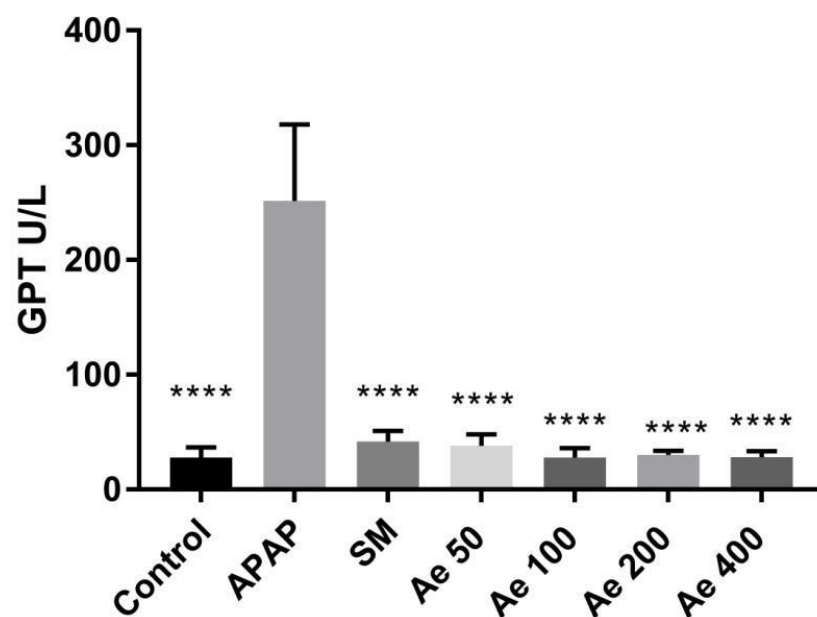
#### **Determinación del efecto hepatoprotector de *A. edulis***

En el modelo de hepatotoxicidad empleado, el cuarto día del tratamiento con el vehículo o el extracto, se indujo daño hepático agudo a los animales, excepto a los del grupo control el que recibió el disolvente empleado para disolver el extracto a ser administrado a los demás grupos en estudio. Las mediciones se realizaron en el suero de los animales obtenidos al final del experimento tras anestesia.

Primeramente, se verificó la actividad sérica de GPT (U/L) de los diferentes animales, al comparar los valores obtenidos en los grupos control y patológico (APAP), se pudo

verificar una diferencia estadísticamente significativa entre ellos, lo cual valida el método empleado para evaluar la actividad protectora del extracto.

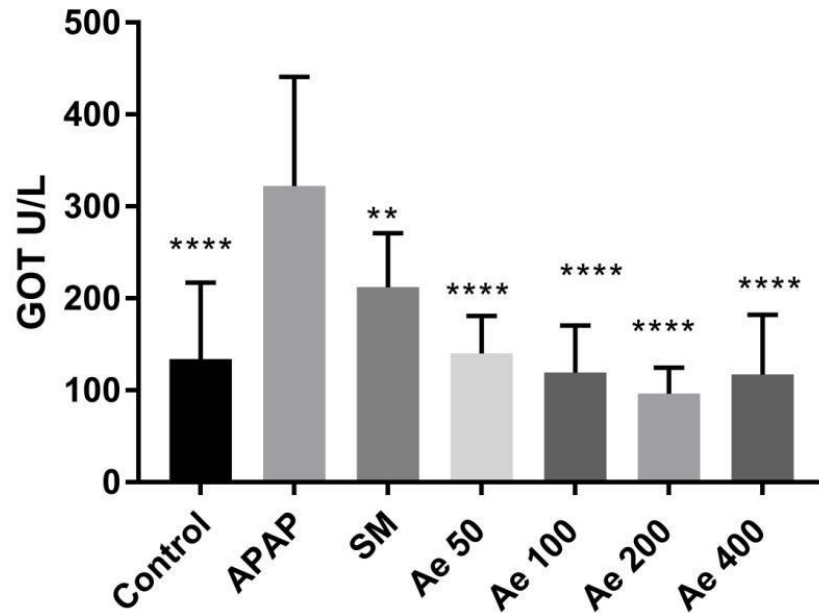
Por otro lado se verificó también una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo APAP y los grupos SM tratado con el hepatoprotector de referencia, silimarina, y los grupos Ae50, Ae100, Ae 200 y Ae400, que fueron tratados con diferentes dosis del extracto etanólico de *A. edulis* (50, 100, 200 y 400 mg/kg respectivamente) y no se observó diferencia entre ellos y el grupo control y tampoco entre los grupos tratados con el extracto y el grupo tratado con silimarina (Figura5).



**Figura 5.** Efecto de la administración oral de *A. edulis* sobre la actividad sérica de GPT. Cada barra corresponde al promedio  $\pm$  SD, n=8. ANOVA, post test de Tukey. \*\*\*\*p<0,0001.

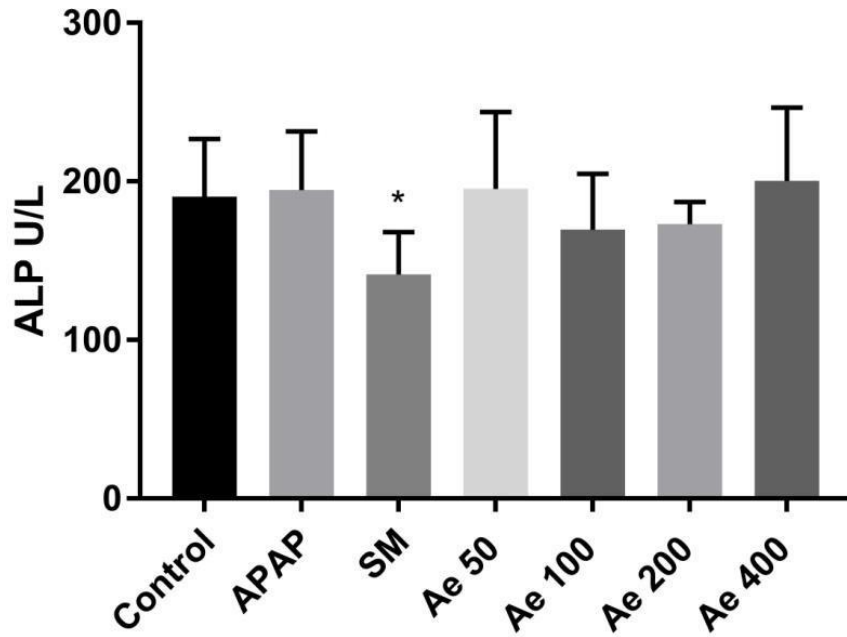
También se midió la actividad sérica de GOT (U/L) de los diferentes grupos. Los resultados mostraron que al comparar los valores obtenidos en los grupos control y patológico (APAP), se pudo verificar una diferencia estadísticamente significativa entre ellos ( $p<0,0001$ ), indicando nuevamente la validez del método empleado para evaluar la actividad hepatoprotectora del extracto. Adicionalmente, al comparar los datos de niveles séricos de GOT entre los animales del grupo APAP y los grupos SM tratado con el hepatoprotector de referencia, silimarina ( $p<0,01$ ), y los grupos Ae50, Ae100, Ae200 y Ae400, que fueron tratados con diferentes dosis del extracto etanólico de *A. edulis* (50, 100, 200 y 400 mg/kg respectivamente) se constató entre ellos una diferencia estadísticamente significativa ( $p<0,0001$ ). Más aún, no se observó diferencia entre ellos y el grupo control y

tampoco entre los grupos tratados con el extracto y el grupo tratado con silimarina (Figura 6).



**Figura 6.** Efecto de la administración oral de *A. edulis* sobre la actividad sérica de GOT. Cada barra corresponde al promedio  $\pm$  SD, n=8. ANOVA, post test de Tukey. \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,0001.

La actividad sérica de fosfatasa alcalina (FA) del grupo control positivo (silimarina) presenta una diferencia estadísticamente significativa con el grupo de animales con hepatitis tóxica (\*p<0,05), los demás grupos tratados no presentan diferencia significativa respecto al grupo patológico, observándose un comportamiento similar entre los mismos (Figura7).



**Figura 7.** Efecto de la administración oral de *A. edulis* sobre la actividad sérica de fosfatasa alcalina. Cada barra corresponde al promedio  $\pm$  SD, n=8. ANOVA, post test de Tukey. \*p<0,05.

## DISCUSIÓN

En primer lugar con respecto a la evaluación de la toxicidad del extracto etanólico *A. edulis* en ratones se encontró que hasta la dosis de 2000 mg/Kg no causó alteraciones morfoanatómicas de los principales órganos estudiados ni muerte del animal por lo tanto según la OECD su uso vía oral es seguro, dicho hallazgo se correlaciona con un estudio en el cual emplearon un extracto acuoso de *A. edulis* para estudiar toxicidad en ratas Wistar, así mismo no observaron alteraciones en órganos, ni ningún otro parámetro de toxicidad, aunque empleando una dosis de 5000 mg/kg constataron una alteración del peso del hígado de los animales lo cual sugiere hepatotoxicidad (Signor et al., 2015), pero dicha dosis no fue evaluada en este estudio, debido a que la OECD no recomienda emplearla, a menos que su evaluación se encuentre justificada, es decir, los resultados de dicha evaluación posea una relevancia directa en la protección de la salud humana, animal y/o del medio ambiente(OECD/OCDE, 2002). También ha sido reportada su baja toxicidad empleando modelos *in vitro* que utilizan quistes de *Artemia salina* (Arruda et al., 2019). Continuando, los resultados de DL50 se afianzan con los resultados obtenidos al evaluar el efecto del extracto etanólico de *A. edulis* sobre el comportamiento general de ratones.

Estudios previos referente a *A. edulis* han informado que uno de los principales metabolitos secundarios encontrados en la planta son los flavonoides lo cual coincide con lo reportado en este estudio, además no detectaron saponinas en el extracto acuoso y etanólico de *A. edulis*



empleado, dicho metabolito tampoco fue detectado en este trabajo empleando solo extracto etanólico de *A. edulis* (Arruda et al., 2019). También fue reportado que *A. edulis* presenta flavonoides, compuestos fenólicos, triterpenoides, antraquinonas, lo cual apoya los resultados encontrados, además, se ha reportado la presencia de alcaloides que no fue detectado en el extracto ensayado, por otro lado, también informaron la presencia de otros grupos como antranas, esteroides, naftoquinonas, leucoantocianidinas y cianósidos de glucósidos (Yayía et al., 1999; BHARAT & Galkwad, 2016).

Con respecto a los compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico de *A. edulis* en este estudio, el resultado obtenido fue de  $36,954 \pm 0,379$  mg GAE/100g de extracto, en tanto que lo reportado en otro estudio empleando extracto etanólico *A. edulis* fue de  $17,6 \pm 0,6$  mg GAE/100g de extracto y para el extracto acuoso *A. edulis* fue de  $9,0 \pm 0,2$  mg GAE/100g de extracto, esta diferencia podría deberse al sistema de dilución empleado ya que trabajaron con una concentración de  $200 \mu\text{g/mL}$  a diferencia de una concentración de 20 y 4 mg/mL del extracto o debido al tiempo transcurrido tras la reacción para su posterior lectura puesto que midieron la absorbancia luego de 2 horas, en cambio en este trabajo se realizó luego de media hora (Signor et al., 2015).

En el ensayo de ABTS para el extracto de *A. edulis*, el resultado de la actividad antioxidante expresado en IC<sub>50</sub> ( $17,255 \pm 0,346 \mu\text{g/mL}$ ) es menor respecto al de la sustancia de referencia trolox ( $33,722 \mu\text{g/mL}$ ), lo cual indica una mayor capacidad antioxidante del extracto en comparación a la sustancia de referencia, en tanto, se ha reportado una actividad antioxidante moderada del extracto de aceite de *A. edulis* (EOAE) y del viridiflorol un constituyente principal de dicho extracto, siendo mayor la del EOAE, que atribuyeron a la mayor solubilidad en medio orgánico (Trevizan, 2016), dicha capacidad del *A. edulis* se asocia a los compuestos fenólicos presentes en el extracto (Signor et al., 2015), además, ha sido reportado otra especie *A. rubifolius* con actividad antioxidante expresado como IC<sub>50</sub>  $7,1 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ , en el ensayo DDPH (Marwah et al., 2007).

En relación al modelo de hepatotoxicidad inducida por APAP empleado en ratones, el grupo patológico exhibió un incremento de la actividad de GPT y GOT respecto al grupo control ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo a la referencia (Mossanen & Tacke, 2015) puesto que el metabolismo de APAP y la necrosis hepática son los principales eventos durante las primeras horas luego de la administración de APAP (Mossanen & Tacke, 2015).

Así mismo, se encontró una reducción significativa ( $p < 0,0001$ ) de las enzimas hepáticas GPT, GOT de los grupos tratados con las diferentes dosis del extracto de *A. edulis* comparado al grupo control, siendo dicho comportamiento similar a lo observado en el grupo tratado con silimarina respecto al grupo control (GPT  $p < 0,0001$  y GOT  $p < 0,01$ ), cabe mencionar que dicho comportamiento de la silimarina era lo esperado según lo reportado (Papackova et al., 2018).

En cuanto a la actividad de FAL, se encontró que sólo el grupo tratado con silimarina presentó diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ), el grupo patológico ni los grupos tratados con las diferentes dosis del extracto presentaron diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control, lo cual podría deberse a que esta enzima no es un marcador específico del hígado y por lo tanto la presencia de alteración no siempre es indicativo de daño hepatocelular (Cortés & Montoro, 2012), pero cuando existe una obstrucción hepática del flujo biliar sí puede verse afectado dicho parámetro (Schumann et al., 2002), cabe mencionar, que el tiempo transcurrido para la toma de muestra tras la administración de APAP en el modelo de hepatotoxicidad empleado, no es suficiente para provocar dicho daño en los animales empleados.

En general observamos que el comportamiento de los grupos tratados con las diferentes dosis del extracto de *A. edulis* sobre los principales marcadores de daño hepatocelular GPT y GOT fueron similares al grupo tratado con la silimarina un hepatoprotector conocido, esto podría deberse a la propiedad antioxidante del *A. edulis* que se asocia con la presencia de compuestos fenólicos y según lo encontrado a nivel *in vitro* (Hoffmann-Bohm et al., 1992) puesto que el daño hepático provocado en el modelo de hepatotoxicidad empleado involucra un estrés oxidativo (Papackova et al., 2018), en este punto cabe mencionar que ha sido reportado el rol de los compuestos fenólicos de origen natural en la hepatoprotección (Saha et al., 2019) ya que estos compuestos poseen la capacidad de estabilizar los radicales libres generados y también mediante la inhibición de la formación y expresión de citocinas inflamatorias, interleucinas, factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Rani et al., 2016), también ha sido reportado la regulación de la expresión de varios genes según modelo de hepatotoxicidad estudiado (Saha et al., 2019).

## CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en el test N°420 de la OECD, la administración vía oral del extracto de *A. edulis* es segura hasta la dosis de 2000 mg/Kg. Además, no afecta el comportamiento general y actividad general de ratones machos tratados.

Los principales metabolitos secundarios detectados cualitativamente en el extracto de *A. edulis* fueron flavonoides, triterpenoides y taninos, que se contrasta con lo reportado en la bibliografía hasta la fecha.

El extracto de *A. edulis* posee una mayor capacidad antioxidante que la sustancia de referencia trolox, evaluado en el ensayo ABTS. Dicho resultado se asocia al contenido de compuestos fenólicos detectados en el extracto.

Por último, según los resultados obtenidos en el modelo de hepatotoxicidad empleado, el extracto de *A. edulis* posee una actividad hepatoprotectora, que podría asociarse a su actividad antioxidante. Por lo tanto, se logró validar científicamente la propiedad hepatoprotectora del extracto de *A. edulis*.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azevedo de Abreu, D., Kuniyoshi, Y., Nogueira, A., & de Souza Medeiros, A. (2005). Caracterização morfológica de frutos, sementes e germinação de *Allophylus edulis* (St.-Hil.) Radlk. (Sapindaceae). *Revista Brasileira de Sementes*, 27(2), 59-66. <https://doi.org/10.1590/s0101-31222005000200009>
- Ahmed, M., (2014). Silymarin: Insights into Properties and Therapeutic indications. *World Journal of Nutrition and Health*, 2(3), 33-34. <https://doi:10.12691/jnh-2-3-1>
- Aichholz, R., Spitzer, V., & Lorbeer, E. (1997). Analysis of cyanolipids and triacylglycerols from sapindaceae seed oils with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 787(1-2), 181-194. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(97\)00650-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(97)00650-x)
- Arnaiz, S., Llesuy, S., Cutrín, J. C., & Boveris, A. (1995). Oxidative stress by acute acetaminophen administration in mouse liver. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(3), 303-310. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00023-q](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00023-q)
- Amengual, M. (1974). *CATÁLOGO BIBLIOGRÁFICO FITOQUÍMICO ARGENTINO III* (1.<sup>a</sup> ed.). Instituto de Botánica.

Arruda, G., et al. (2019). Phytochemical Prospecting, Antimicrobial Activity, and Acute Toxicity of Aqueous Plant Extract of Two Plant Species *Allophylus edulis* (A. St. Hilaire, Cambessedes & A. Jussieu) RADLK ex WARM and *Matayba laeagnoides* RADLK. *International Journal of New Technology and Research*, 5(2), 10-13. <https://doi.org/10.31871/ijntr.5.2.7>

Arisawa, M., et al., (1988). Chemical and Pharmaceutica Studies on Medicinal Plants in Paraguay i) Constituents of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Fraction from "Cocu," *Allophylus edulis* RADLK. *The Japanese Society of Pharmacognosy*, 43(1), 78-80. <http://dl.ndl.go.jp/info:ndljp/pid/10757818>

Bandoni, A., Mendiondo, M. E., Rondina, R., & Coussio, J. (1976). Survey of argentine medicinal plants — Folklore and phytochemical — Screening. II. *Economic Botany*, 30(2), 161-185. <https://doi.org/10.1007/bf02862962>

Blumenthal, M. (2015). *Quality and Efficacy of Herbal Medicines/ Entrevistado por Craig Gustafson*. *Integrative Medicine*, 14(4).

BLASA, M., CANDIRACCI, M., ACCORSI, A., PIACENTINI, M., & PIATTI, E. (2007). Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. *Food Chemistry*, 104(4), 1635-1640. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.014>

BHARAT, R., & Gaikwad, D. (2016). THE ETHNOBOTANY, PHYTOCHEMISTRY AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF ALLOPHYLUS SPECIES USED IN TRADITIONAL MEDICINE: A REVIEW. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (11), 664-682.

Ciappini, C., Stoppani, F., Martinet, R., & Alvarez, M. (2012). Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. *Rev. Cienc. Tecnol.*, 19, 45-51. [https://www.researchgate.net/publication/317538682\\_Actividad\\_antioxidante\\_y\\_contenido\\_de\\_compuestos\\_fenolicos\\_y\\_flavonoides\\_en\\_mieles\\_de\\_treboles\\_eucalipto\\_y\\_alfalfa](https://www.researchgate.net/publication/317538682_Actividad_antioxidante_y_contenido_de_compuestos_fenolicos_y_flavonoides_en_mieles_de_treboles_eucalipto_y_alfalfa)

Castillo, L., González-Coloma, A., González, A., Díaz, M., Santos, E., Alonso-Paz, E., Bassagoda, M. J., & Rossini, C. (2009). Screening of Uruguayan plants for deterrent activity against insects. *Industrial Crops and Products*, 29(1), 235-240. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.05.004>

Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). (1976). Chapter 4 of Enzyme Nomenclature/Amendments/Collected Rules. En *Nim of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry* (1.<sup>a</sup> ed., Vol. 1, pp. 1-3). Elsevier Scientific Publishing Company.

Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44(7), 2047-2053. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.003>

Callisaya, J., & Alvarado, J. (2016). Total phenol contents and antioxidant capacity of bertholletiaexcelsa, amazonian almonds from Bolivia. *Rev Boliv Quím.*, 33(2), 34-42.

Cortés, L., & Montoro, M. (Eds.). (2012). Sección 6. Hígado. Datos de laboratorio: pruebas hepáticas alteradas. En *Libro de Gastroenterología y Hepatología. Problemas comunes en la práctica clínica* (2.<sup>a</sup> ed., pp. 699-722). JarpyoEditores, S.A.

Dharmani, P., Mishra, P., Maurya, R., Singh Chauhan, V., & Palit, G. (2005). *Allophylus serratus*: A plant with potential anti-ulcerogenic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 361-366. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.011>

Díaz, M., González, A., Castro-Gamboa, I., Gonzalez, D., & Rossini, C. (2008). First record of l-quebrachitol in *Allophylus edulis* (Sapindaceae). *Carbohydrate Research*, 343(15), 2699-2700. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.07.014>

Dufour, D., et al. (2000). Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. I. Performance Characteristics of Laboratory Tests. *Clin Chem*, 46(12), 2027-2049.

Dahlin, D., Miwa, G., Lu, A., & Nelson, S. (1984). N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(5), 1327-1331. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.5.1327>

Dai, G., He, L., Chou, N., & Wan, Y.-J. Y. (2006). Acetaminophen Metabolism Does Not Contribute to Gender Difference in Its Hepatotoxicity in Mouse. *Toxicological Sciences*, 92(1), 33-41. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj192>

Davidson, D., & Eastham, W. (1966). Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. *BMJ*, 2(5512), 497-499. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5512.497>

Díaz, M., et al. (2014). Differential Deterrent Activity of Natural Products Isolated from *Allophylus edulis* (Sapindaceae). *Advances in Biological Chemistry*, 04(02), 168-179. <https://doi.org/10.4236/abc.2014.42021>

Dirección General de Planificación Estratégica – Ministerio de Agricultura y Ganadería, República del Paraguay. (2008, noviembre). *ESTUDIO DE LA SITUACIÓN DE LA RECOLECCIÓN, PRODUCCIÓN y COMERCIALIZACIÓN DE PLANTAS MEDICINALES y AROMÁTICAS DE PARAGUAY* INDICE I (Nº 1). Fundación José Cardijn. <https://studylib.es/doc/7422298/informe-final-plamsur---fundacion-j-kardijn>

García Martín, M., & Amado, Z. M. (2010). Transaminasas: Valoración y significación clínica. En *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de gastroenterología, hepatología y nutrición pediátrica SEGHP-AEP* (2.ª ed., pp. 267-275). Ergón S.A.

Gonzalez, D. (1996). *Catálogo de plantas medicinales (y alimenticias y útiles) usadas en Paraguay* (1.ª ed.). Litocolor S.R.L.

Hinson, J. A., Pike, S. L., Pumford, N. R., & Mayeux, P. R. (1998). Nitrotyrosine-Protein Adducts in Hepatic Centrilobular Areas following Toxic Doses of Acetaminophen in Mice. *Chemical Research in Toxicology*, 11(6), 604-607. <https://doi.org/10.1021/tx9800349>

Hoffmann-Bohm, K., Lotter, H., Seligmann, O., & Wagner, H. (1992). Antihepatotoxic C-Glycosylflavones from the Leaves of *Allophylus edulis* var. *edulis* and *gracilis*. *Planta Medica*, 58(06), 544-548. <https://doi.org/10.1055/s-2006-961546>

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

Jacobs, B., Dennehy, C., Ramirez, G., Sapp, J., & Lawrence, V. (2002). Milk thistle for the treatment of liver disease. *The American Journal of Medicine*, 113(6), 506-515. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(02\)01244-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(02)01244-5)

Kren, V., & Walterova, D. (2005). Silybin and silymarin - new effects and applications. *Biomedical Papers*, 149(1), 29-41. <https://doi.org/10.5507/bp.2005.002>

Kenneth, F., Hahn, M., Rosen, H., & Benner, K. (1998). Milk Thistle (*Silybum marianum*) for the Therapy of Liver Disease. *American Journal of Gastroenterology*, 93(2), 139-143. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1998.00139.x>

Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726-732. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612005000400016>

Lopez, J. A., Alberto, J., Ritz, G. F., Rombold, J. S., & Hahn, W. J. (1987). *Árboles comunes del Paraguay: Ñande yvyra mata kuera* (2.<sup>a</sup> ed.). FCA.

Lapa, A. J. (2003). *Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais* (1.<sup>a</sup> ed.). Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais.

Povolo, Ch., et al. (2019). Aqueous extracts of Paraguayan Moringa (*Moringa oleifera* Lam.), as a source of direct and indirect antioxidants for nutraceutical applications. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 4(4), 170-176.

Signor, C. A., et al. (2015). Evaluation of the antioxidant activity, antimicrobial effect and acute toxicity from leaves of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. Cambess.) Hieron. ex Niederl. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9(11), 353-362. <https://doi.org/10.5897/ajpp2015.4270>



- Marwah, R., Fatope, M., Mahrooqi, R., Varma, G., Abadi, H., & Al-Burtamani, S. (2007). Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food Chemistry*, 101(2), 465-470. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.001>
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Revisión. *Nutr. Hosp.*, 17(6) 271-278.
- Mereles, L. (2015). Valor nutritivo y características del aceite de nuez de *Macadamia integrifolia* (Maiden & Betche), cosechadas en el Departamento de Cordillera. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.
- Mitchell, J. (1988). Acetaminophen Toxicity. *New England Journal of Medicine*, 319(24), 1601-1602. <https://doi.org/10.1056/nejm198812153192409>
- Mossanen, J., & Tacke, F. (2015). Acetaminophen-induced acute liver injury in mice. *Laboratory Animals*, 49(1\_suppl), 30-36. <https://doi.org/10.1177/0023677215570992>
- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos. (2002). Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*, 1-14. <https://doi.org/10.1787/9789264070943-en>
- Organización Mundial de la Salud. (2014, 24 junio). *Qué es la hepatitis* [Comunicado de prensa]. <https://www.who.int/features/qa/76/es/>
- Organización Mundial de la Salud. (2017, 21 abril). *Los datos más recientes ponen de relieve la necesidad de actuar urgentemente a nivel mundial contra las hepatitis* [Comunicado de prensa]. <https://www.who.int/es/news/item/21-04-2017-new-hepatitis-data-highlight-need-for-urgent-global-response>
- Organización Mundial de la Salud. (2002, 2 mayo). *Medicina Tradicional –Necesidades Crecientes y Potencial* [Comunicado de prensa]. <http://archives.who.int/tbs/trm/s2295s.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (2004, 22 junio). *Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales* [Comunicado de prensa]. <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>

Organización Panamericana de la Salud-Paraguay. (2016, 28 julio). *Es hora de actuar contra la hepatitis en Paraguay* [Comunicado de prensa]. [https://www.paho.org/par/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1662:es-hora-de-actuar-contrala-hepatitis-en-paraguay&Itemid=213](https://www.paho.org/par/index.php?option=com_content&view=article&id=1662:es-hora-de-actuar-contrala-hepatitis-en-paraguay&Itemid=213)

Papackova, Z., et al. (2018). Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *PLOS ONE*, *13*(1), e0191353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191353>

Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *14*(3), 149-167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)

Peñarrieta, M., Alvarado, J., Bergenståhl, B., & Åkesson, B. (2009). Total Antioxidant Capacity and Content of Phenolic Compounds in Wild Strawberries (*Fragaria vesca*) Collected in Bolivia. *International Journal of Fruit Science*, *9*(4), 344-359. <https://doi.org/10.1080/15538360903378526>

Real Decreto 1201/2005. Protección de los animales utilizados para experimentación de los animales utilizados para experimentación y otros factores científicos. Madrid, España, 10 de octubre del 2005

Rani, V., Deep, G., Singh, R., Palle, K., & Yadav, U. (2016). Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sciences*, *148*, 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.002>

Roux, S., Sablé, E., & Porsolt, R. (2004). Primary Observation (Irwin) Test in Rodents for Assessing Acute Toxicity of a Test Agent and its Effects on Behavior and Physiological Function. *Current Protocols in Pharmacology*, *27*(1), 10.10.1-10.10.23. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1010s27>

Sandoval, M., Lazarte, K., & Arnao, I. (2013). Hepatoprotección antioxidante de la cáscara y semilla de *Vitis vinifera* L. (uva). *Anales de la Facultad de Medicina*, *69*(4), 250-259. <https://doi.org/10.15381/anales.v69i4.1125>

Saha, P., Talukdar, A., Nath, R., Sarker, S., Nahar, L., Sahu, J., & Choudhury, M. (2019). Role of Natural Phenolics in Hepatoprotection: A Mechanistic Review and Analysis of Regulatory Network of Associated Genes. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 1-59. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00509>

Sanabria-Galindo, A., López, S., & Gualdrón, R. (1997). ESTUDIO FITOQUIMICO PRELIMINAR Y LETALIDAD SOBRE ARTEMIA SALINA DE PLANTAS COLOMBIANAS. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, *26*(1), 15-19.

Sanabria-Galindo, A. (1983). Análisis Fitoquímico Preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. *Universidad Nacional de Colombia (Bogotá), Departamento de Farmacia*.

Strömme, J., & Eldjam, L. (1974). Scandinavian Standardizations of Enzyme Determination. *Scand J Clin Lab Invest*, *33*, 287-289.

Segarra Espinoza, E. (2006). *Fisiologías de los aparatos y sistemas* (1.<sup>a</sup> ed.). Universidad de Cuenca.

Schumann, G., et al. (2002). IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37°C. Part 5. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of Aspartate Aminotransferase. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *40*(7), 725-733. <https://doi.org/10.1515/cclm.2002.125>

Sies, H. (1991). Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, *91*(3), 31S-38S. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90281-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90281-2)

Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants Part A*, 152-178. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(99)99017-1)

Trevizan, L. (2016). *Composição química e avaliação sequestradora de radical livre do óleo essencial de *Allophylus edulis* Raldk.* (Tesis doctoral). Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Brasil. <http://repositorio.ufgd.edu.br/jspui/handle/prefix/4112>

Vázquez, E. (2012). Capacidad antioxidante de los extractos acuosos, etanólicos y elaboración de una bebida funcional del tallo de cashahuasca (*Serjania cf. rubicaulis*Benth). (*Tesis*). Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo Maria, Perú.

Vit, P., Gutiérrez, T., Bednar, M., & Rodríguez-Malaver, (2008). A Czech honey categorized according to their antioxidant activity. *Acta BioquímClínLatinoam*, 42(2), 237-244.

Wolff, O. (s. f.). *El hígado - órgano de la fuerza vital* (1.<sup>a</sup> ed.). “BIBLIOTECA UPASIKA” “Colección Antroposofía”.

Yajía, M., et al. (1999). GENOTOXICITY EVALUATION OF ALLOPHYLUS EDULIS (CAMB.) RADLK. (SAPINDACEAE) AQUEOUS EXTRACT. *Acta Horticulturae*, 501, 31-36. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1999.501.2>

Young, D. (1997). Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, 34(6), 579-581. <https://doi.org/10.1177/000456329703400601>

Zavala-Flores, E., et al. (2013). Dosis-respuesta sobre la motilidad intestinal y el sistema nervioso de la interacción entre *Jatropha curcas* L. y metoclopramida. *Acta Med Per*, 30(3), 120-127.

Zúñiga, J., Orellana, J., & Mari, J. (2008). *Ciencia y tecnología del animal de laboratorio / Science and technology of laboratory animal: Formación avanzada de postgrado / Advanced Postgraduate Training: 1;2* (Slp ed.).

## ANEXO

**Tabla 1.** Preparación de la curva de calibración de ácido gálico a partir de una solución concentrada de 250  $\mu\text{g/mL}$

Concentración de ácido gálico ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen de ácido gálico (mL)
5	0,5
10	1
20	2
50	5
100	10
150	15

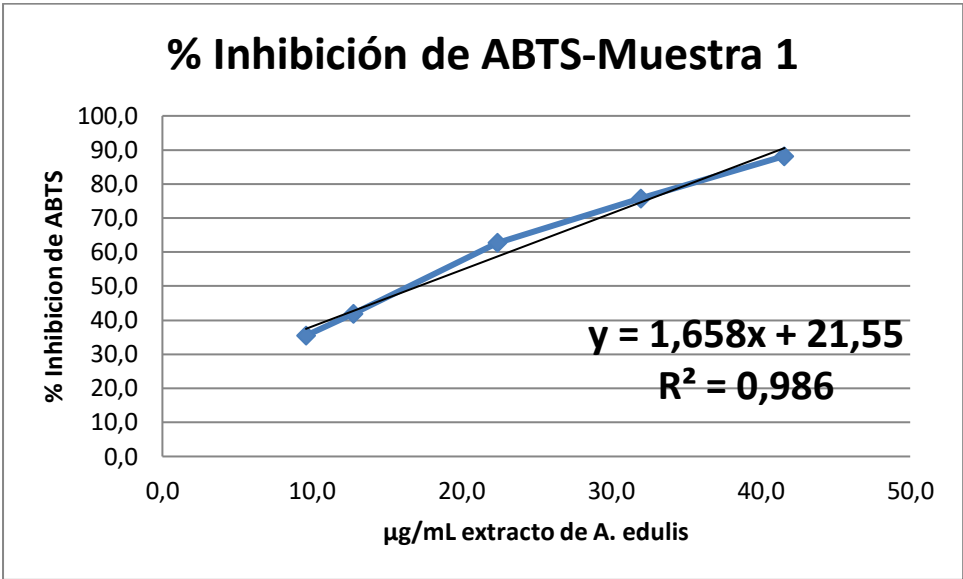
**Tabla 2.** Curva de calibración de ácido gálico

Concentración $\mu\text{g/mL}$ (Eje X)	Absorbancia (Eje Y)
5	0,062
10	0,138
20	0,240
50	0,544
100	0,992
150	1,467

**Tabla 3.** Muestra 1 del extracto etanólico de "kokû", curva de dilución de la muestra 1 del extracto y su % de inhibición.

Concentración final del extracto ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Inhibición de ABTS
9,600	35,5
12,800	41,9
22,400	62,7
32,000	75,8
41,600	88,2
17,500	IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )

Obs.: se eliminan los puntos para mejorar linealidad, además estos puntos tenían coloración rosada

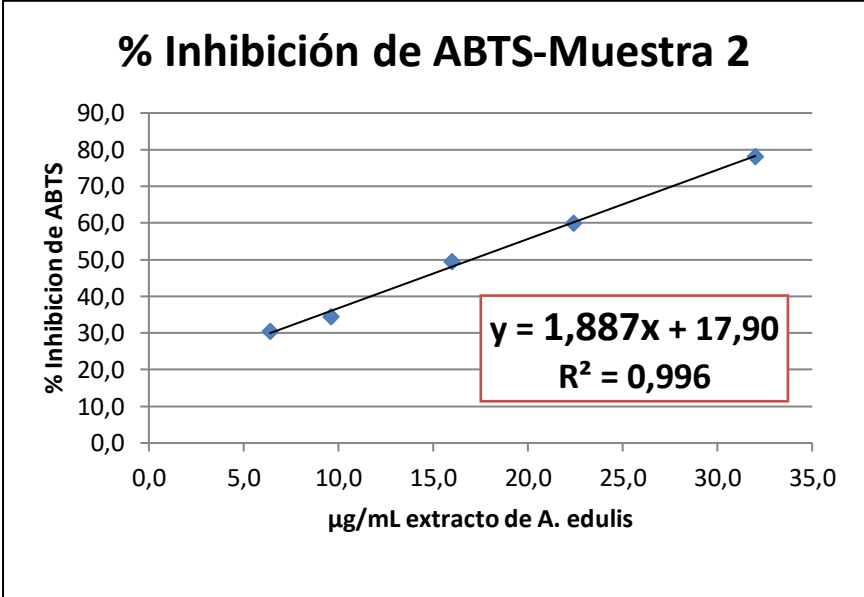


**Gráfico 1.** Curva de %IC50 vs concentración en µg/mL de la muestra 1 del extracto etanólico de *Allophylus edulis*

**Tabla 4.** Muestra 2 del extracto etanólico de "kokû", curva de dilución de la muestra 2 del extracto y su % de inhibición.

Concentración final del extracto (µg/mL)	% Inhibición de ABTS
6,4	30,484
9,6	34,516
16	49,516
22,4	60,000
32	78,065
17,010	IC50 (µg/mL)

Obs.: se eliminan los puntos para mejorar linealidad, además estos puntos tenían coloración rosada.



**Gráfico 2.** Curva de %IC50 de ABTS vs concentración µg de la muestra 2 del extracto etanólico de *Allophylus edulis*