

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS



TESIS DE MAESTRIA

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DE LOS
EXTRACTOS ACUOSOS DE *Lupinus mutabilis* Sweet y
***Amaranthus caudatus* Y LA INFLUENCIA SOBRE**
PARAMETROS BIOQUÍMICOS Y HEMATOLOGICOS
EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Tesis de grado presentado para obtención del grado de Magister Scientiarum

POR: LIC. DARIO AYCA MAMANI

TUTORES: EDUARDO GONZALES DAVALOS Ph. D.
JUAN LUIS ARIAS MIRANDA Ph. D.

LA PAZ – BOLIVIA
Octubre, 2019

DEDICATORIA.

A mis Padres

El esfuerzo y las metas alcanzadas, refleja la dedicación, el amor que invierten sus padres en sus hijos. Gracias a mis padres Damian Ayca Mamani y Alejandrina Mamani Anti, mi mayor inspiración, gracias a ellos he concluido este trabajo.

A mis hijos

Daliz y Mateo que son el motor que me obliga a funcionar y ser cada día mejor

A mi esposa

Nélida Rodríguez, por la paciencia y el apoyo incondicional que siempre me ha dado

AGRADECIMIENTO.

A Dios por darme la vida y estar siempre conmigo, guiándome en mi camino.

A mi hermana Edit Yesica Ayca Mamani, por su apoyo en las diferentes etapas de este proceso

Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas dependiente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas UMSA por abrirme las puertas y permitirme realizar todo el proceso investigativo del presente trabajo.

A mis tutores de tesis: Dr. Eduardo Gonzales Davalos Ph. D. y Dr. Juan Luis Arias Miranda Ph. D., por el apoyo para la realización y culminación del presente trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCION.....	1
2. MARCO TEORICO.....	4
2.1 La Nutrición.....	4
2.2. Alimentos nutricionales.....	5
2.3. <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (Tarwi).....	6
2.4. Composición química y valor nutricional.....	7
2.5 <i>Amaranthus caudatus</i>	10
2.5.1. Descripción botánica de <i>Amaranthus caudatus</i>	10
2.5.2. Valor nutricional.....	10
2.6. Nutrición en Bolivia.....	11
2.7. Producto nutracéutico.....	12
2.8. Inocuidad y toxicidad.....	14
2.8.1. Clasificación de la toxicidad.....	14
2.8.1.1. Toxicidad aguda.....	14
2.8.1.1.1. Definición.....	15
2.8.2. Experimentación toxicológica.....	15
2.8.2.1. Objetivos básicos de la experimentación toxicológica.....	15
2.8.2.2. Toxicidad experimental.....	16
2.8.2.3. Principios de la experimentación toxicológica.....	17
2.9. Daño hepático inducida por sustancias toxicas.....	20
2.9.1. Mecanismo de toxicidad y patrones de lesión.....	20
2.10. Fisiología del hígado.....	22

2.10.1. Transaminasas hepáticas.....	24
2.10.1.1. Alanina aminotransferasa (ALT).....	24
2.10.1.2. Aspartato aminotransferasa (AST).....	25
2.11. Hemograma.....	26
2.11.1. Recuento de eritrocitos.....	26
2.11.2. Hematocrito.....	27
2.11.3. Hemoglobina.....	28
2.11.4. Recuento diferencial de leucocitos.....	29
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivo general.....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
4. MATERIALES.....	32
4.1. Material biológico.....	32
4.2. Materiales.....	32
4.3. Reactivos.....	33
4.4. Equipos.....	33
5. METODOS.....	34
5.1. Recolección del material vegetal.....	34
5.2. Preparación del extracto acuoso de <i>L. mutabilis</i> Sweet sin cascara.....	34
5.3. Condiciones y Mantenimiento de Ratones.....	38
5.4. Determinación de la toxicidad aguda a dosis únicas.....	39

5.4.1. Determinación de la Dosis letal media DL ₅₀	39
5.5. Evaluación de la toxicidad aguda en ratones.....	39
5.6. Determinación de la toxicidad aguda a dosis continua de 1000 mg/kg.....	41
5.7. Recolección de la muestra.....	45
5.7.1. Procedimiento.....	45
5.8. Análisis hematológico.....	49
5.8.1. Determinación de hematocrito y hemoglobina.....	49
5.9.1.1. Materiales.....	50
5.9.1.2. Procedimiento.....	50
5.8.2. Recuento de glóbulos blancos.....	52
5.8.2.1. Materiales y Reactivos.....	52
5.8.2.2. Procedimiento.....	52
5.8.3. Recuento diferencial de glóbulos blancos.....	54
5.8.3.1. Materiales.....	55
5.8.3.2. Procedimiento.....	56
5.8.4. Determinación de transaminasas.....	58
5.8.4.1. Materiales.....	58
5.8.4.2. Procedimiento.....	58
5.9. Análisis estadístico.....	60
6. RESULTADOS.....	61
6.1. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA A DOSIS UNICAS DE 1000, 2000 y 3000 mg/kg.....	60
6.1.1. Extracto: <i>Amaranthus caudatus</i>	60
6.1.1.1. Evaluación de parámetros de toxicidad hasta los 30 min.....	61

6.1.1.2.	Evaluación de parámetros de toxicidad del Extracto acuoso <i>Amaranthus caudatus</i> a los 60 min.....	62
6.1.1.3.	Evaluación de parámetros de toxicidad del Extracto Acuoso <i>Amaranthus caudatus</i> a los 120 min, 240 min y 24 horas...	63
6.1.2.	Extracto: <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet - sin cascara.....	64
6.1.2.1.	Evaluación de parámetros de toxicidad hasta los 30 min....	64
6.1.2.2.	Evaluación de parámetros de toxicidad del Extracto Acuoso <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet sin cascara a los 60 min.....	65
6.1.2.3.	Evaluación de parámetros de toxicidad del Extracto Acuoso <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet sin cascara a los 120 min, 240 min y 24 horas.....	66
6.1.3.	Extracto: <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet - con cascara.....	67
6.1.3.1.	Evaluación de parámetros de toxicidad hasta los 30 mi....	67
6.1.3.2.	Evaluación de parámetros de toxicidad del Extracto Acuoso <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet con cascara a los 60 min.....	68
6.1.3.3.	Evaluación de parámetros de toxicidad del Extracto Acuoso <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet con cascara a los 120 min.....	69
6.1.3.4.	Evaluación de parámetros de toxicidad del Extracto Acuoso <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet con cascara a los 240 min.....	70
6.1.3.4.	Evaluación de parámetros de toxicidad del Extracto Acuoso <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet con cascara a las 24 horas.....	71

6.2. EVALUACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA DL ₅₀	72
6.2.1. Extracto: <i>Amaranthus caudatus</i>	72
6.2.2. Evaluación de la Dosis Letal Media (DL ₅₀) del extracto <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet – Sin cascara.....	73
6.2.3. Evaluación de la Dosis Letal Media (DL ₅₀) del extracto <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet – con cascara.....	74
6.3. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA A DOSIS CONTINUAS.....	74
6.3.1 Determinación de parámetros toxicológicos a dosis continuas de 1000 mg/kg de extractos acuosos de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (EA-Lm) – sin cascara y <i>Amaranthus caudatus</i> (EA – Ac) al día 1 post administración.....	75
6.3.2 Determinación de parámetros toxicológicos a dosis continuas de 1000 mg/kg de extractos acuosos de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (EA-Lm) sin cascara y <i>Amaranthus caudatus</i> (EA – Ac) a los días 7 y 14 días post administración.....	76
6.3.3 Comportamiento del peso corporal en la toxicidad aguda a dosis continuas de 1000 mg/kg de los extractos de Extractos acuosos de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet – sin cascara y <i>Amaranthus caudatus</i>	77
6.3.4 Comportamiento del peso de órganos internos en la toxicidad aguda a dosis continuas de 1000 mg/kg de los extractos de Extractos acuosos de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet – sin cascara y <i>Amaranthus caudatus</i> ..	78

6.4. DETERMINACIÓN DE ENZIMAS MARCADORES DE TOXICIDAD..	79
6.4.1. Determinación de AST y ALT en animales posterior al tratamiento de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (EA – Lm) sin cascara y <i>Amaranthus</i> <i>caudatus</i> (EA Ac) dosis continua de 1000 mg/kg.....	79
6.5 DETERMINACION DE PARAMETROS HEMATOLOGICOS EN RATONES A LOS 14 DIAS POSTERIOR AL TRATAMIENTO DE <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet - sin cascara y <i>Amaranthus</i> <i>caudatus</i>	80
6.5.1. Determinación de la hemoglobina.....	80
6.5.2. Recuento de Leucocitos.....	81
6.6.3. Comportamiento de parámetros hematológicos complementarios....	82
7. DISCUSIONES.....	83
8. CONCLUSIONES.....	91
9. BIBLIOGRAFIA.....	94

INDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS

	Pág.
Tabla 1	Composición relativa de alcaloides en la semilla de tarwi..... 9
Tabla 2	Composición nutricional del Amaranto (g/100)..... 10
Tabla 3	Factores que influyen en los ensayos de DL ₅₀ 18
Tabla 4	Escala de valores DL ₅₀ 19
Tabla 5	Tipos de hepatotoxinas..... 21
Tabla 6	Diseño experimental para la determinación de la DL ₅₀ 39
Tabla 7	Parámetros de evaluación del Test hipocrático para la evaluación de la toxicidad a dosis únicas..... 40
Tabla 8	Diseño experimental para la toxicidad aguda a dosis continua... 42
Tabla 9	Parámetros de evaluación del Test hipocrático para la evaluación de la toxicidad a dosis continúa..... 44
Tabla 10	Método para la determinación de Aspartato aminotransferasa (AST) en suero..... 59
Tabla 11	Método para la determinación de Alanina aminotransferasa (ALT) en suero..... 59
Tabla 12	Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta los 30 min después de la administración del Extracto Acuso A. caudatus (EA – Ac) (N=10)..... 61

Tabla 13	Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta los 60 min después de la administración del Extracto Acuso <i>A. caudatus</i> (N=10).....	62
Tabla 14	Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta los 120, 240 min y 24 horas posterior a la administración del Extracto Acuso <i>Amaranthus caudatus</i> (EA – Ac) (N=10).....	63
Tabla 15	Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta los 30 min después de la administración del Extracto Acuso <i>L. mutabilis</i> Sweet (EA – Lm) (N=10).....	64
Tabla 16	Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta los 60 min después de la administración del Extracto Acuso <i>L. mutabilis</i> Sweet (EA –Lm) (N=10).....	65
Tabla 17	Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos a los 120, 240 min y 24 horas posterior a la administración del Extracto Acuso <i>L. mutabilis</i> Sweet (N=10).....	66
Tabla 18	Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta los 30 min posterior a la administración del Extracto Acuso <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet – con cascara (EA – Lm) (N=10).....	67

Tabla 19	Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta los 60 min después de la administración del Extracto Acuoso <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (EA –Lm) (N=10).	68
Tabla 20	Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta los 120 min posterior a la administración del Extracto Acuoso <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (EA – Lm) (N=10).....	69
Tabla 21	Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta los 240 min posterior a la administración del Extracto Acuoso <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (EA – Lm) (N=10).	70
Tabla 22	Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta las 24 horas posterior a la administración del extracto acuso <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (EA – Lm) (N=10).....	71
Tabla 23	Porcentaje de mortalidad en 24 horas y signos de toxicidad observados en ratones machos y hembras después de la administración oral del Extracto acuoso de <i>Amaranthus caudatus</i> (EA – Ac) (N=10).....	72
Tabla 24	Porcentaje de mortalidad en 24 horas y signos de toxicidad observados en ratones machos y hembras después de la administración oral del Extracto Acuoso de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (EA – Lm) Sin cascara (N=10).....	73

Tabla 25	Porcentaje de mortalidad en 24 horas y signos de toxicidad observados en ratones machos y hembras posterior a la administración oral del Extracto acuoso de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (EA – Lm) con cascara (N=10).....	74
Tabla 26	Efectos sobre el comportamiento general en ratones al día 1 post administración oral de Solución Fisiológica (NaCl 0.9%) y los extractos acuosos de EA-Lm - sin cascara y EA – Ac (N=10).....	75
Tabla 27	Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos a los 7 y 14 días post administración oral de los extractos acuosos de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (EA-Lm) – sin cascara y <i>Amaranthus caudatus</i> (EA – Ac) (N=10).....	76
Tabla 28	Tabla comparativa del comportamiento del peso corporal (g) a los 1, 7 y 14 días de ratones, tratados con Solución Fisiológica, Extracto Acuoso <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (EA – Lm) – sin cascara y Extracto Acuoso <i>Amaranthus caudatus</i> (EA-Ac) a dosis de 1000 mg/kg., (N=10).....	77
Tabla 29	Peso de órganos (g) a 14 días en ratones hembras, machos, control y tratados con EA – Lm y EA - Ac a dosis de 1000mg/kg.....	78

Tabla 30	Determinación bioquímica de transaminasas (AST/ALT) en ratones albinos post administración de los E- Lm y EA - Ac a dosis de 1000 mg/kg.....	79
Tabla 31	Comportamiento de parámetros hematológicos (Media \pm S) en Ratones albinos Swiss luego de la administración oral de Extracto Acuoso <i>Lupinus mutabilis</i> (EA-Lm) y Extracto Acuoso <i>Amaranthus caudatus</i> (EA-Ac) a dosis de 1000 mg/kg., (N=10).....	80

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Cámara Neubauer.....	26
Figura 2. Detalle de cámara Neubauer. El área total de la cámara es de 3x3 mm, con 9 cuadrados grandes, los eritrocitos se cuentan en 5 cuadrados coloreados.....	27
Figura 3. Maceración del Extracto acuoso de <i>Lupinus mutabilis</i> Swet – sin cascara.....	36
Figura 4. Filtración del Extracto acuoso de <i>Lupinus mutabilis</i> Swet – sin cascara.....	36
Figura 5. Concentración del Extracto acuoso de <i>Lupinus mutabilis</i> Swet – sin cascara.....	37
Figura 6. Liofilización del Extracto acuoso <i>Lupinus mutabilis</i> Swet – sin cascara.....	37
Figura 7. Administración vía oral en ratones albinos Swiss.....	38
Figura 8. Evaluación de la toxicidad aguda.....	43
Figura 9. Punción cardiaca en ratones Swiss albinos.....	45
Figura 10. Procedimiento para la obtención de la muestra sanguínea por punción cardiaca.....	46
Figura 11. Diagrama de fases de operación en la determinación de análisis Bioquímico.....	47
Figura 12. Carta de lectura de hematocrito.....	51

Figura 13.	Cálculo para la determinación del porcentaje de hematocrito...	51
Figura 14.	Diagrama de operación en la determinación de parámetros hematológicos.....	57
Figura 15.	Determinación de las Aminotransferasas – Stax Fax 4542...	60
Figura 16.	Determinación de niveles de Hemoglobina en ratones hembras y machos de amaranto, Solución fisiológica y tarwi una vez concluido el ensayo de toxicidad aguda a dosis continua 1000mg/kg.....	80
Figura 17.	Determinación de Leucocitos en ratones hembras y machos post administración de grupo control (solución fisiológica), Extractos acuosos de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (EA – Lm) y Extracto Acuoso de <i>Amaranthus caudatus</i> (EA - Ac) a dosis de 1000mg/kg.....	81

ABREVIATURAS

AG	=	Ácidos Grasos
AST	=	Aspartato Aminotrasferasa
ASDI	=	Agencia Sueca de Cooperación Internacional para el Desarrollo
ALT	=	Alanina Aminotrasferasa
B	=	Basofilos
°C	=	Grados centígrados
ClNa	=	Cloruro de Sodio
CO ₂	=	Dióxido de Carbono
CV	=	Coefficiente de variación
CYTED	=	Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo
DS	=	Desviación estándar
DE ₅₀	=	Dosis Efectiva Media
DL ₁₀₀	=	Dosis letal absoluta
DL ₅₀	=	Dosis Letal Media
DL ₀₁	=	Dosis Letal Mínima
D _u	=	Dosis Umbral
E	=	Eosinófilos
EA-Ac	=	Extracto Acuoso <i>Amaranthus caudatus</i>
EA-Lm	=	Extracto Acuoso <i>Lupinus mutabilis</i>
EDTA	=	Ácido etilendiaminotetraacetico
FAO	=	Food And Agriculture Organization
FCFB	=	Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
FIM	=	Fundación para la Innovación de la Medicina
g	=	Gramos
h	=	Horas
IIFB	=	Instituto de Investigaciones Fármaco – Bioquímicas
Hb-O ₂	=	Oxihemoglobina
Hb-red	=	Desoxihemoglobina
Hto	=	Hematocrito

Hb	=	Hemoglobina
IFCC	=	Federación internacional de química clínica
ICSH	=	International Council for Standardization in Haematology
kcal	=	Kilocalorías
L	=	Linfocitos
LDH	=	Lactato Deshidrogenasa
LOT	=	Lote
M	=	Monocitos
MDH	=	Malato Deshidrogenasa
m.s.n.m	=	Metros sobre el nivel del mar
mm	=	Milímetros
mL	=	Mililitros
mg	=	Miligramos
NAD	=	Nicotinamida Adenina Dinucleotido
NADH	=	Nicotinamida Adenina Dinucleotido Reducido
nm	=	Nanómetro
cm	=	Centímetros
N	=	Neutrófilos
NN.UU.	=	Naciones Unidas
NCCLS	=	Comité nacional de estándares en laboratorio clínico
OECD	=	Organization for Economic Cooperation and Development
OMS	=	Organización Mundial de la Salud
OPS	=	Organización Panamericana de la Salud
O ₂	=	Oxígeno
P	=	Probabilidad
PMIC	=	Punto de Mayor Intensidad Cardiaca
RPM	=	Revolución por minuto
REF.	=	Referencia
SF	=	Solución Fisiológica
SNC	=	Sistema Nervioso Central
SSCC	=	Sociedad Escandiva de Química y Fisiología Clínica

RESUMEN

El *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) y *Amaranthus caudatus* (Amaranto) pertenecen al grupo de plantas a los cuales se lo denominan la base del producto nutracéutico. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la toxicidad aguda del Tarwi y el Amaranto en ratones albinos Swis y ver la influencia sobre parámetros hematológicos y bioquímicos.

La evaluación de la toxicidad aguda se realizó en base de la metodología descrita por el CYTED y la OECD, 2001. La evaluación de parámetros bioquímicos y hematológicos realizó por el el Método Cinético – UV, TECO DIAGNOSTICS y la metodología descrita por Vives (1987) respectivamente. Se emplearon ratones albinos Swis de ambos sexos (N=10), administrando dosis de 1000, 2000 y 3000 mg/kg para la determinación de la DL₅₀ y dosis de 1000 mg/kg para la evaluación de la toxicidad aguda, realizando las observaciones correspondientes para la determinación del efecto toxico, posteriormente fueron sacrificados para realizar los exámenes bioquímicos. Se pudo evidenciar que los animales tratados con el extracto de *Amaranthus caudatus* no mostró signos de toxicidad, su influencia en parámetros hematológicos se manifestó al observar un incremento en el recuento de glóbulos blancos (P<0.01) en comparación al grupo control. Sin embargo a través de la evaluación de la toxicidad aguda de *Lupinus mutabilis* con cascara se pudo determinar la DL₅₀ que corresponde a 3000 mg/kg, su influencia en parámetros bioquímicos muestran un incremento significativo (P<0.05) a nivel de la hemoglobina y glóbulos blancos en comparación al grupo control.

Palabras Claves: *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi), *Amaranthus caudatus* (Amaranto), Toxicidad oral aguda, hemograma, AST, ALT.

ABSTRACT

Lupinus mutabilis Sweet (Tarwi) and *Amaranthus caudatus* (Amaranto) belong to the group of plants which are called the base of the nutraceutical product. Plants used since pre-Columbian times, as food and / or medicinal. The work objective was to evaluate the acute toxicity of Tarwi and Amaranth in albino Swiss mice and to see the influence on hematological and biochemical parameters.

The acute toxicity evaluation was carried out based on the methodology described by CYTED and the OECD, 2001. The evaluation of biochemical and hematological parameters was carried out by the Kinetic Method - UV, TECO DIAGNOSTICS and the methodology described by Vives (1987) respectively. Swiss albino mice of both sexes (N = 10) were used, administering doses of 1000, 2000 and 3000 mg / kg for the determination of LD₅₀ and dose of 1000 mg / kg for the evaluation of acute toxicity, making the corresponding observations for the determination of the toxic effect, they were subsequently sacrificed to perform the biochemical tests. It was demonstrated that the animals treated with the *Amaranthus caudatus* extract showed no signs of toxicity, its influence on hematological parameters were manifested when observing an increase in the white blood cell count (P <0.01) in comparison to the control group. However, through the evaluation of the acute toxicity of *Lupinus mutabilis* Sweet with peel, it was possible to determine the DL₅₀ corresponding to 3000 mg/kg, its influence on biochemical parameters show a significant increase (P <0.05) at the level of hemoglobin and white blood cells compared to the control group.

Keys word: *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi), *Amaranthus caudatus* (Amaranto), Acute oral toxicity, blood count, AST

1. INTRODUCCIÓN

La alimentación y la nutrición son necesidades vitales para el ser humano, por lo que alimentarse correctamente es esencial para el mantenimiento de todas las funciones metabólicas y fisiológicas de nuestro organismo.

Según el concepto tradicional de nutrición, la principal función de la dieta es aportar los nutrientes necesarios para el buen funcionamiento del organismo. Este concepto de “nutrición adecuada” está siendo sustituido por el de “nutrición óptima”, que contempla la posibilidad de que algunos alimentos mejoren la salud de la población y reduzcan el riesgo de desarrollar determinadas enfermedades, en ese sentido muchas enfermedades crónicas están relacionadas directamente con la nutrición y muchas podrían prevenirse con una dieta adecuada. Surge por lo tanto un nuevo concepto en nutrición, que da lugar a la aparición de nuevas disciplinas de especial interés, orientadas al estudio de productos naturales con potencial actividad preventiva o terapéutica. Así surge la ciencia de los Alimentos, que representa uno de los segmentos de mayor crecimiento dentro de la industria alimentaria y su significado trasciende el mundo comercial para convertirse en una de las mayores áreas de investigación científica en la actualidad.

En este sentido, la alta prevalencia de enfermedades crónicas (obesidad, diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, cáncer, etc.), en las últimas décadas ha hecho que los servicios sanitarios a nivel mundial busquen alternativas de tratamiento para poder frenar y controlar dichas enfermedades. Los malos hábitos alimentarios son un factor de riesgo importante en la aparición de estas patologías.

Aunque queda mucho trabajo por hacer, “cada día se ve aumentado el número de estudios con evidencia científica suficiente sobre los efectos y propiedades de los llamados productos nutracéuticos, de manera que quede avalada su recomendación en determinadas situaciones” (Arteche y col., 1994). Gran parte de los componentes nutricionales tienen todavía que ser estudiados en mayor profundidad, para constatar sus beneficios y efectos adversos, prestando especial atención sobre los más utilizados y los menos conocidos. “Existen gran número de evidencia científica que prueban la efectividad de estos productos; por el contrario, existen también estudios que hablan sobre los posibles efectos secundarios y la potencial toxicidad de algunos de ellos, sobre todo cuando aparecen interacciones con otros medicamentos” (Arteche, 1994).

En definitiva los productos nutracéuticos tienen un gran futuro como fuente de salud y prevención de enfermedades y que es más que probable que asistamos en la oferta de estos productos en un futuro muy cercano. De hecho, el “reglamento de declaraciones nutricionales y de propiedades saludables de los alimentos” que ha preparado la Comisión Europea, pondrá orden legal a la avalancha de productos que aparecen continuamente en el mercado. El Reglamento que la Comisión Europea exige realizar estudios bioquímicos, celulares experimentales, de intervención controlada, epidemiológicos y estudios clínicos que se puedan hacer para respaldar la fiabilidad de estos productos y en consecuencia debido a que el campo nutracéutico está emergiendo con el pico más alto de investigación y desarrollo (Bourre, 1991).

En ese sentido, el presente estudio realizó procedimientos toxicológicos y bioquímicos estandarizados con el objetivo de proporcionar la base para que las

declaraciones de propiedades saludables del *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) y *Amaranthus caudatus* (Amaranto) produzcan un impacto y seguridad en los consumidores y población en general sobre sus beneficios.

“*Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) y *Amaranthus caudatus* (Amaranto) se desarrollan en los valles interandinos del Altiplano de Bolivia y Perú, presentan un alto grado nutricional precursores de los productos nutraceuticos” (Jacobsen y Mujica., 2006; Schoeneberg y col., 1981). El área de Farmacología del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas – UMSA viene realizando proyectos de investigación con la finalidad de obtener Productos Nutraceuticos a base de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) y *Amaranthus caudatus* (Amaranto) para el tratamiento alternativo de trastornos metabólicos como la diabetes.

En el presente estudio se ha evaluado la toxicidad aguda y la influencia sobre parámetros Bioquímicos y Hematológicos de *Lupinus mutabilis* Sweet y *Amaranthus caudatus* en animales de experimentación. Estas investigaciones forman parte del proyecto “Diabetes tipo 2: Nuevas terapias del programa de cooperación UMSA-Asdi/BRC-Team Bolivia”.

2. MARCO TEORICO

2.1 La nutrición

La alimentación adecuada es el derecho humano más importante y esencial para el desarrollo social y económico de un país. Una buena nutrición contribuye a mejorar la eficiencia y los resultados de acciones para el desarrollo: mayor capacidad de aprendizaje, menores gastos para el cuidado de la salud, mayor productividad, entre otros. Es decir, la nutrición como base para el desarrollo, está relacionado principalmente con la educación, salud, demografía, agricultura, pobreza y género.

La fase prenatal y los primeros años de vida son los periodos más importantes en términos de desarrollo mental, físico y emocional; es durante este tiempo crítico que se forma el capital humano. El retardo del crecimiento o desnutrición crónica, la deficiencia de yodo y las anemias nutricionales están asociados a una reducción substancial de la capacidad mental y/o reducción de las habilidades cognoscitivas, que causa el rendimiento escolar deficiente y la productividad laboral reducida.

Una buena nutrición reduce la mortalidad materna, neonatal e infantil, en países en desarrollo, aproximadamente el 55 por ciento de la mortalidad en niños menores de 5 años está asociada a la desnutrición. Los niños severamente desnutridos tienen 8 veces más probabilidad de morir con relación a los niños bien nutridos. Por estas razones, es importante dar alta prioridad al estado nutricional a través de una adecuada alimentación complementaria, orientadas a prevenir la desnutrición pero también a revertir las tendencias hacia la obesidad, diabetes y enfermedades coronarias (NN.UU. Ginebra., 2002).

2.2. Alimentos nutricionales

La alimentación y la nutrición son necesidades vitales para el ser humano, por lo que alimentarse correctamente es esencial para el mantenimiento de todas las funciones metabólicas y fisiológicas de nuestro organismo. La nutrición es el proceso por el cual nutrientes contenidos en los alimentos satisfacen las necesidades de nuestras células y permiten el desarrollo adecuado de nuestros sistemas y órganos con el fin de proporcionar a las personas de una resistencia física adecuada a nuestra actividad diaria. Para llevar a cabo una correcta nutrición debemos conocer las necesidades específicas de nuestro organismo en función de la edad, sexo y actividad que realizamos.

En los últimos años, se ha puesto de manifiesto mediante numerosos estudios la importancia que un buen estado nutricional tiene como sinónimo del mantenimiento de la salud y para la prevención de la enfermedad o bien para reducir el riesgo de enfermar. Surge por lo tanto un nuevo concepto en nutrición, que da lugar a la aparición de nuevas disciplinas de especial interés, orientadas al estudio de productos naturales con potencial actividad preventiva o terapéutica. Se trata de la ciencia y el arte de diseñar alimentos y dietas adaptadas a las particularidades fisiológicas de ciertos individuos y poblaciones específicas con determinadas características y riesgos particulares.

Los suplementos dietarios son productos cuyo propósito es adicionar la dieta normal y que es fuente concentrada de nutrientes y otras sustancias con efecto fisiológico o nutricional que puede contener vitaminas, minerales, proteínas, aminoácidos, otros nutrientes y derivados de plantas, concentrados y extractos de plantas solas o en combinación (Rendón, 2013).

2.3. *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi)

Lupinus mutabilis Sweet es una leguminosa originaria de los Andes de Bolivia, Ecuador y Perú, tiene relevancia en la gastronomía de estos países desde la época prehispánica. Su alto contenido de proteínas, mayor que el de la soja lo hace una planta de interés para la nutrición humana y animal. Según los especialistas su consumo en diversas presentaciones ayuda a los niños en su crecimiento y desarrollo cerebral, debido a la presencia de calcio y aminoácidos (García, G. 1947.; Mc Cawley., 1985).

El tarwi (*Lupinus mutabilis*) es una leguminosa herbácea erecta de tallos robustos, algo leñosa. Alcanza una altura de 1.8 – 2 m. Se cultiva principalmente entre los 2000 y 3800 metros de altura, en climas templados y fríos, su consumo está limitado por su contenido de alcaloides, entre los que se encuentran principalmente la Lupanina, y la Esparteína, siendo más toxica la Lupanina (Montes; Hurtado., 1984); en el tarwi, se han encontrado 25 alcaloides quinolizídínicos de los cuales se han identificado 19 (Gross., 1982). El tarwi tiene un alto contenido de alcaloides que fluctúa de 0.02 a 4.45% que le confiere un sabor amargo, por lo que no puede ser consumido directamente. Para la aceptación como variedades dulces se fija su contenido máximo de alcaloide de 0.04 en el grano (Lescano., 1998).

Los alcaloides quinolizídínicos amargos en la semilla del tarwi son sustancias antinutritivas que han sido hasta la actualidad el mayor obstáculo para su utilización en la alimentación humana, ya que su ingestión, puede producir trastornos tales como malestar, náuseas, parálisis del sistema respiratorio así como problemas visuales, estado de debilidad progresiva y hasta coma (Lescano, 1998).

El género *Lupinus* consta de unas 200 especies distribuidas en América, se cultiva entre los 2500 a 3400 m.s.n.m., requiere entre 350-800 mm de precipitación anual, siendo cultivado exclusivamente en zonas secas, es susceptible al exceso de humedad, y moderadamente susceptible a la sequía durante la floración y envainado. No tolera las heladas en la fase de formación del racimo y madurez, aunque algunos ecotipos cultivados a orillas del lago Titicaca, tienen una mayor resistencia al frío. Prefiere suelos francos y franco-arenosos, con balance adecuado de nutrientes y buen drenaje, pH que oscila entre 5 y 7 (Siavichay., 1986; Velasco y Col., 1981).

2.4. Composición química y valor nutricional

En el análisis bromatológico se encontró un alto contenido de nutrientes (Tabla N° 3), donde se destaca la proporción de proteínas, grasas y extractos no nitrogenados.

El valor proteico de la semilla entera y los cotiledones es superior al de otras materias primas comúnmente utilizadas en la industria alimentaria, como la soya. (Orf., 1988). Las semillas de lupino contienen elevados niveles de macronutrientes como fósforo, potasio y de micronutrientes como hierro; pero bajos niveles de minerales esenciales como calcio y magnesio.

El *Lupinus mutabilis* Sweet tiene un elevado contenido de grasa (18 - 25 %), lo que hace factible para la extracción de aceite a nivel industrial. Los lípidos constan de ácidos grasos insaturados y su composición es semejante a la del maní, aproximadamente la mitad de estos constan de ácido oleico (36.1–54.6%), existiendo un 22.3 - 43.9% de ácido linoleico y el 2.1 - 2.7 % le corresponde al ácido linolénico. (CYTED., 1995; CYTED., 1996).

Tabla 1*Composición por 100 gramos de porción comestible de tarwi*

Composición	Tarwi cocido con cascara	Tarwi crudo sin cascara	Tarwi harina
Energía (Kcal)	151	277	458
Agua (g)	69.7	46.3	37.0
Proteína (g)	11.6	17.3	49.6
Grasa (g)	8.6	17.5	27.9
Carbohidratos (g)	9.6	17.3	12.9
Fibra (g)	5.3	3.8	7.9
Ceniza (g)	0.6	1.6	2.6
Calcio (mg)	30	54	93
Fosforo (mg)	123	262	440
Hierro (mg)	1.4	2.3	1.38
Tiamina (mg)	0.01	0.60	-
Riboflavina (mg)	0.34	0.4	-
Niacina (mg)	0.95	2.10	-
Ácido ascórbico	0.00	4.6	-

Fuente: CYTED., 1995.

Dentro de las propiedades descritas, una de las más importantes es el contenido de valor nutritivo en las semillas de tarwi. Las semillas de tarwi presentan ácidos grasos esenciales como el oleico (Omega 9), linoleico (Omega 6) y linolénico (omega 3) que representan el 40.4 %, 37.1 % y 2.9 % del total respectivamente (Jacobsen; Mujica., 2006; Gross y col., 1988; Castañeda y col., 2008). Por otro lado, el valor de proteínas es de 44.3 %, mientras que la soya solo posee el 33.4 % (Jacobsen y Mujica, 2006). Presenta alto contenido de fósforo, potasio y Hierro (Ortega- David y col., 2010), así como vitaminas y minerales (Castañeda y col., 2008).

Estos tipos de ácidos grasos son esenciales pues nuestro organismo no puede sintetizarlos y se deben adquirir en la dieta. El ácido linoleico aumenta las defensas y disminuye la presión arterial; mientras que el ácido oleico reduce los riesgos de sufrir enfermedades cardiovasculares y tiene efecto antitumoral (Carrillo., y col. 2012). El valor de proteínas siempre ha sido comparado con la soya, porque posee de 30-40 %, un considerable nivel de lisina (7.3 %) pero carece de aminoácidos como la metionina y cisteína esenciales para la síntesis de queratina (Güenes-Vera y col., 2004). Sin embargo, los *Lupinus* presentan menor cantidad de inhibidores de tripsina, taninos y saponinas que la soya. Siendo además el tarwi la especie que presenta más cantidades de proteínas y lípidos esenciales para el organismo y que éste no puede sintetizar, por lo que se deben ingerir en la dieta (Gálvez y col., 2009).

Aunque las semillas de *L. mutabilis* Sweet presentan mayor cantidad de proteínas que la soya (Jacobsen y Mujica., 2006) no son consumidas directamente ya que requieren de un tratamiento previo que consiste en remojar 3 kilogramos de grano en 18 litros de agua, cambiándola cada 6 horas durante 5 días (Jacobsen y Mujica, 2006), debido a la presencia de alcaloides quinolizídnicos que le dan sabor amargo. El alcaloide que se encuentra en mayor concentración es lupanina seguido de tetrahidrorombifolina, 4-hidroxilupanina, esparteína y 13-hidroxilupanina (Gross y col., 1988; Ortega y col., 2010; Castañeda y col., 2008). Estas sustancias son importantes para la planta pues la protegen de fitopatógenos y animales herbívoros debido a su acción mutagénica y por su efecto tóxico en varios de estos organismos (Keeler., 1976).

2.5. *Amaranthus caudatus*

2.5.1. Descripción botánica de *Amaranthus caudatus*

Esta especie se originó como un cultivo de producción de grano en la región andina probablemente por domesticación de *A. quitensis* (Sauer., 1967). Es una planta herbácea anual, con un tallo escasamente ramificado, llega a alcanzar hasta 2 m de altura, sus hojas es muy variable. Las semillas son blancas, con bordes rojos/rosas y negras. Las plantas con semilla de color claro son las que utilizan para la producción de grano (Grubben., 1976; Grubben y Sloten., 1981; Feine., 1979).

El amaranto es un producto de origen vegetal muy completo, ya que es una de las fuentes más importantes de proteínas, minerales y vitaminas naturales. La semilla de amaranto se puede utilizar en la preparación de diversos alimentos y tiene además, un prometedor potencial en la industria de los alimentos (Becerra., 2001).

2.5.2. Valor nutricional

El amaranto es un grano andino que se caracteriza por contener proteínas de alto valor biológico (aminoácidos esenciales disponibles al organismo para satisfacer su requerimiento durante una situación biológica) y valor nutricional (aminoácidos para la síntesis de proteínas totales juntamente con otros nutrientes (Tabla N° 5, 6,7).

Tabla 2

Composición Nutricional del Amaranto (g/100g)

Composición	Amaranto
Proteína	12.9
Grasa	7.2
Carbohidrato	65.1
Fibra	6.7

Fuente: Collazos y col., 1975.

2.6. Nutrición en Bolivia

Al igual que en el resto de los países de Latinoamérica, Bolivia se encuentra en una etapa de “Polarización Epidemiológica Nutricional”; es decir, la población infantil presenta enfermedades por deficiencias (desnutrición y carencias de micronutrientes) en cambio la población adulta, presenta enfermedades por exceso (diabetes, obesidad e hipertensión arterial) consideradas como problemas de salud. Según la OPS/OMS la prevalencia de diabetes en personas mayores de 20 años en Bolivia es de 4,9%.

La desnutrición, constituye el efecto, consecuencia o manifestación más preocupante porque tiene gran implicancia social y económica en el país. La interacción de diferentes factores causales produce un círculo vicioso, la desnutrición y pobreza (Ministerio de Salud., 2005).

Un consumo inadecuado de alimentos y la presencia de enfermedades son causas directas de la desnutrición donde la carencia de micronutrientes, el sobrepeso y la obesidad tienen causas profundas que hacen referencia a problemas multidimensionales como la pobreza, el subdesarrollo y el bajo nivel económico. Asimismo refiere a la falta de acceso a alimentos suficientes en cantidad y calidad, y a prácticas deficientes de alimentación y cuidado de los lactantes y niños pequeños, o a deficiencias sanitarias, de agua potable y a problemas educativos (FAO;OMS., Roma, 2014)

Sin embargo a través de programas u organizaciones no gubernamentales y estudios se orientan a la población a tomar conciencia y promover cambios de comportamiento que mejoren la nutrición de la población Boliviana.

2.7. Producto nutracéutico.

La introducción formal del término nutracéutico fue planteada por el Doctor Stephen DeFelice en 1989, y consta simplemente de fusión de dos elementos básicos: un componente nutricional y otro farmacéutico. DeFelice resumió el termino como “un alimento (o parte del mismo) que proporciona beneficios a la salud, que incluye la prevención y/o tratamiento de una enfermedad; tales productos pueden variar desde nutrientes aislados, suplementos dietarios, hasta productos diseñados genéticamente”, esta definición hoy en día continua vigente aunque con algunas modificaciones. Este mismo concepto ha sido utilizado por el ser humano desde el periodo paleolítico procedente del conocimiento de la relación inseparable entre alimentación y salud. Igualmente Hipócrates, hace más de 2500 años, planteo que la alimentación puede ser una alternativa terapéutica contra la enfermedad, sintetizando esta noción en la frase “deja que la comida sea tu medicina”, la cual hoy se aplica ampliamente a los productos nutracéuticos (Rajasekaran y col., 2008; Das, L., 2012).

Los nutracéuticos son productos generados, a partir de nutrientes y/o sustancias bioactivas y están presentes de forma natural en determinados alimentos, tras su aislamiento y purificación. Dichos productos se preparan en presentaciones farmacéuticas (cápsulas, comprimidos, sobres para disolver, etc.), que contienen concentraciones de dichas sustancias bioactivas en mucha mayor cantidad que la que tendrían en una o varias raciones normales del alimento del que proceden. Tienen por tanto un uso terapéutico, de ahí que su nombre provenga de la conjunción de la palabra "nutriente", porque su composición consta de nutrientes presentes de forma natural en los alimentos y "farmacéutico", por la forma en que se dispensan, así como por su acción terapéutica.

En este sentido, la alta prevalencia de enfermedades crónicas (obesidad, diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, cáncer, etc.), en las últimas décadas, ha hecho que los servicios sanitarios a nivel mundial busquen alternativas de tratamiento para poder frenar y controlar dichas enfermedades. Los malos hábitos alimentarios son un factor de riesgo importante en la aparición de estas patologías. Es por tanto de vital importancia el mejor aprovechamiento de los componentes alimentarios de los alimentos, para el tratamiento y prevención de diversas patologías. Según estudios publicados el 48 % de los usuarios de productos nutracéuticos están de acuerdo en que su consumo es una forma fácil de obtener un adecuado estado de salud, a la vez que permite compensar los estilos de vida no saludables o el mantenimiento de dietas no balanceadas (Van der., 2013; Weiss, L., 2011); esto se ve representado en que la mayoría de los consumidores que desarrollan estilos de vida saludables, presentan menor incidencia de diabetes mellitus y problemas cardiovasculares que la población en general (Rovira., 2013) Por esta razón, el desarrollo de estos productos puede constituir una estrategia sanitaria, lo que representaría una alternativa factible en la prevención de ciertas patologías, al mismo tiempo que sirvan para reducir la sintomatología y paliar los efectos negativos de su instauración en el organismo.

Aunque queda mucho trabajo por hacer, cada día se ve aumentado el número de estudios con evidencia científica suficiente sobre los efectos y propiedades de los llamados nutracéuticos, de manera que quede avalada su recomendación en determinadas situaciones para dar el aval a estos productos, dando a conocer el alcance de los beneficios que puedan proporcionar a la comunidad si se incluyen como alternativas terapéuticas (Arteche y col., 1994).

2.8. Inocuidad y toxicidad

Paracelsus (1493-1541) dijo que "Todas las sustancias son venenos; no hay ninguno que no sea veneno. La dosis correcta diferencia el veneno del remedio" (Goodman and Gillman's 1996). Según Loomis (1982), el único factor que determina el grado de nocividad de un compuesto es su dosis. A medida que aumenta la dosis de cualquier agente químico desde niveles mínimos a máximos, no aparecen súbitamente efectos indeseables sino que la respuesta, sea beneficiosa o perjudicial, es gradual y está relacionada con los progresivos cambios de la dosis. Una de las observaciones más fundamentales que puede hacerse con respecto a cualquier efecto biológico de un agente químico es la relación existente entre la dosis (concentración) y la respuesta obtenida.

El tamizaje farmacológico y el tamizaje fitoquímico de una sustancia permiten evaluar su posible acción farmacológica, toxicidad y los principales grupos químicos presente en la planta. La evaluación de la toxicidad permite determinar la Dosis Letal 50 (DL_{50}), que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte al 50% de los animales lo que servirá como orientación para determinar la Dosis Efectiva 50 (DE_{50}).

2.8.1. Clasificación de la toxicidad

2.8.1.1. Toxicidad aguda

Tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia. Generalmente el punto final del estudio es la muerte del animal. Se expresa por la dosis letal 50 (DL_{50}), que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte al 50% de los animales.

La toxicidad aguda se refiere al desarrollo rápido de síntomas y efectos después de la aplicación de una dosis única relativamente alta o comúnmente se relaciona con los daños inmediatos generados por dosis únicas suficientemente grandes. La observación de los animales se lleva a cabo después de la administración de la sustancia durante 14 días.

2.8.1.1.1. Definición

La toxicidad aguda de una sustancia química se refiere a los efectos adversos que se manifiestan tras la administración por vía oral o cutánea de una sola dosis de dicha sustancia, de dosis múltiples administradas a lo largo de 24 horas o como consecuencia de una exposición por inhalación durante 4 horas.

Los ensayos de toxicidad aguda implican la administración de la sustancia a evaluar en una sola ocasión para la determinación de la DL_{50} , también conocida como dosis-única y consisten en administrar el compuesto sólo una vez en animales de una especie en particular, cepa, edad y peso que son mantenidos bajo condiciones controladas de dieta, jaulas, temperaturas, humedad relativa y tiempo de dosificación, el concepto fue introducido por Trevan en 1917 y representa la muerte de la mitad (50%) de la población estudiada.

2.8.2. Experimentación toxicológica

2.8.2.1. Objetivos básicos de la experimentación toxicológica

Entre ellos se encuentra el contribuir al conocimiento de los peligros, o toxicidad intrínseca de las sustancias: de los efectos tóxicos provocados y de su reversibilidad: de los mecanismos moleculares, de las dianas biológicas sobre las que actúan, estableciendo niveles de seguridad en la exposición a las mismas.

2.8.2.2. Toxicidad experimental

Los estudios iniciales de toxicidad generalmente son realizados para determinar un rango aproximado de la dosis tóxica. A su vez, incluye la observación de animales con el fin de adquirir comprensión en los posibles efectos tóxicos (Timbrell., 1995).

Entre las pruebas de observación se encuentran los signos clínicos de comportamiento a nivel del Sistema Nervioso Central Disminución de la actividad motora como Ataxia (perturbación y problemas de coordinación tales como movimientos torpes e inestabilidad producida por la degeneración del tejido nervioso en la medula espinal y de nervios que controlan el movimiento muscular) Pérdida de reflejo de erección (Incapacidad de enderezamiento del cuerpo del ratón), Parálisis de las patas anteriores, Parálisis de la cabeza, Pérdida de la habilidad prensil, Reacción de alarma, Reflejo corneal, Reflejo pineal, Tremores finos de cuerpo, Fasciculaciones (contracciones musculares visibles bajo la piel) Convulsiones clónicas, Fenómeno de Straub (Erección de la cola), Regulación Autonómica: Salivación, Lagrimación y Micción. Todas estas observaciones deben realizarse diariamente (Jurado, 1989). Estas determinaciones implican estudios integrales de las propiedades tóxicas; la demostración de dosis que no producen efectos negativos observables; el establecimiento de relaciones Dosis-Efecto y Dosis-Respuesta; estudios farmacocinéticos y de biotransformación (Lu., 1992).

2.8.2.3. Principios de la experimentación toxicológica

La experimentación toxicológica se fundamenta en una serie de principios básicos, que se resume bajo los siguientes enunciados

- a) Por razones prácticas, económicas y éticas, para este estudio son los roedores y se recomienda trabajar con un pequeño número de animales para cada dosis. Los estudios generan datos sobre la dosis no efectiva, la dosis máxima a la cual un efecto tóxico no es visto, la dosis mínima letal, la dosis más pequeña requerida para matar a un animal y la dosis letal media (DL_{50}) que representa la muerte de la mitad (50%) de la población estudiada.
- b) La muerte de las especies experimentadas es la respuesta que más comúnmente es utilizada en pruebas toxicológicas ("toxicological testing") preliminares. Cuando una sustancia está siendo evaluada inicialmente, los rangos tóxicos específicos deben ser caracterizados.
- c) DL significa dosis letal y 50 significa que la dosis es agudamente letal para el 50% de los animales a quienes la sustancia en cuestión fue administrada bajo condiciones de laboratorio controlada. Un nivel "subíndice 0" significa que la dosis no fue letal para ninguno de los animales y un nivel "subíndice 100" significaría de que la dosis fue letal para el 100% de los animales. Las unidades de DL_{50} son mg/kg, que significa miligramos de la sustancia por kilogramo de peso corporal del animal. Mientras menor la DL_{50} , menor son los miligramos de la sustancia por kilogramo de peso corporal que es requerido para matar a los animales, y mayor es la toxicidad aguda. Viceversa, mientras mayor la DL_{50} , menor es la toxicidad aguda. DL_{50} y toxicidad aguda están inversamente relacionadas (Malachowski, 1995).

- d) El número de individuos sobre los que se realiza la experimentación está limitado en la práctica en comparación con las amplias poblaciones que estarán expuestas. Por ello, para obtener resultados estadísticamente válidos es preciso emplear dosis suficientemente altas para que los efectos ocurran con la suficiente frecuencia para ser detectados (Klaassen., 1986).
- e) Por ello al aumentar la dosis se incrementan los efectos observados.

Tabla 3

Factores que influyen en los ensayos de DL₅₀

Factores a considerar	Descripción
Especies	Diferencias metabólicas
Cepas	Deficiencias enzimáticas
Sexo	Nivel hormonal/Preñación
Edad/Peso	Hígado/ Función renal: actividad microsomal enzimática
Medio ambiente	Alojamiento, manejo de humedad relativa, temperatura, actividad
Dieta	Proteínas: grasa, proporción
Modo de administración	Ruta/ velocidad de administración
Formulación	Vehículo, volumen, pH, osmolaridad

Fuente: Jurado., 1989.

Las dosis letales se calculan a partir de un número suficiente de animales para que los resultados obtenidos puedan tener una significación estadística, de este modo se obtiene:

1. La Dosis letal absoluta (DL_{100}), que corresponde a la mínima cantidad de sustancia con capacidad para provocar la muerte de todos los animales del grupo ensayado bajo condiciones definidas.
2. La Dosis letal media (DL_{50}), que equivale a la cantidad de sustancia que mata al 50% de la población en estudio.
3. La Dosis letal mínima (DL_{01}), que corresponde a la menor cantidad de sustancia capaz de provocar la muerte de algún animal en el grupo experimental.
4. La Dosis umbral (D_u), que concierne al nivel de sustancia por debajo del cual no se espera que aparezcan efectos nocivos aunque sean de carácter leve.

Para indicar la potencia de cualquier tipo de sustancia toxica se ha utilizando una escala de valores basada en la DL_{50} de la sustancia (Tabla N° 9).

Tabla 4

Escala de valores DL_{50}

Parámetro	DL_{50}
Extremadamente toxico	< 1 mg/Kg
Altamente toxico	1 – 50 mg/Kg
Moderadamente toxico	50 – 500 mg/Kg
Ligeramente toxico	0,5 – 5 g/Kg
Prácticamente no toxico	1. 5 – 15 g/Kg

Fuente: Repetto., 1997.

2.9. Daño hepático inducido por sustancias tóxicas

2.9.1. Mecanismos de toxicidad y patrones de lesión

Las sustancias capaces de dañar a los hepatocitos se denominan hepatotoxinas y entre ellas, se suele distinguir entre hepatotoxinas intrínsecas e idiosincrásicas. Las primeras producen daño hepático en cualquier individuo expuesto a partir de una determinada dosis. Los fármacos, pese a los estrictos controles de selección durante su desarrollo, son también causa de hepatitis tóxica. (Castel y col., 1997; Larry., 2000; Lee., 1995).

Existen una enorme diversidad de fármacos y productos químicos capaces de generar daño hepático además del daño ocasionado por agentes infecciosos, alteraciones del flujo biliar, causas metabólicas, congénitas o autoinmunes, lo cual dificulta con frecuencia el diagnóstico etiológico, a esto se suma en dificultar el diagnóstico etiológico, que siendo los agentes medicinales el grupo más importante de todos los agentes hepatotóxicos por el número y su disponibilidad, lo hacen aún en dosis no tóxicas y por mecanismos no previsibles

Las reacciones de biotransformación, cuya finalidad última es facilitar la eliminación de compuestos extraños al organismo, que por su lipofilia lo harían muy lentamente, son un conjunto de reacciones enzimáticas que modifican químicamente los xenobióticos e introducen nuevos grupos funcionales (reacciones de fase I) y los conjugan con moléculas endógenas para convertirlos en compuestos más solubles y, en definitiva, más fácilmente eliminables (Castel y col., 1997; Larry., 2000; Lee., 1995).

Tabla 5*Tipos de hepatotoxinas*

Tipos de	Características
Hepatotóxicas	
Intrínsecas	<p>Sus efectos se manifiestan en casi todos los individuos expuestos a partir de una determinada dosis.</p> <p>Es predecible, generalmente es reproducible en animales</p>
Idiosincrásicas	<p>Los efectos se manifiestan sólo en algunos individuos, en ocasiones de manera no dependiente de la dosis e incluso tras un periodo de tolerancia al fármaco.</p> <p>Tiene las características de una reacción de hipersensibilidad.</p> <p>En otros individuos la toxicidad se manifiesta de manera dosis-dependiente.</p> <p>Es la consecuencia de un metabolismo anormal de fármaco debido a una expresión diferente de las enzimas de biotransformación (polimorfismos del CYP, edad, estados fisiopatológicos), con el resultado de un patrón de metabolismo-desintoxicación diferente</p> <p>No es predecible con modelos animales</p>

Fuente: Castell y col., 1998.

2.10. Fisiología del hígado

El hígado es el órgano más grande del cuerpo humano y uno de los más importantes en cuanto a la actividad metabólica que desarrolla en el organismo. Entre sus innumerables funciones se destacan:

1. Almacenamiento de glucógeno.
2. Síntesis de Ácidos grasos (AG) y conversión a cetonas.
3. Síntesis de proteínas plasmáticas, conversión y desaminación de aminoácidos y formación de urea.
4. Metabolismo y almacen de proteínas.
5. Síntesis, liberación y degradación de factores de coagulación.
6. Catabolismo y excreción de hormonas.
7. Detoxicación de sustancias endógenas (Bilirrubina), Bacterias, subproductos y sustancias exógenas (fármacos).
8. Formación de bilis: secretora y excretora.
9. Mantenimiento del balance hidroelectrolítico.
10. Barrera defensiva por medio de células del SRE.

En la práctica clínica diaria, las múltiples funciones hepáticas solo son superadas por los métodos bioquímicos diseñados para examinarlos.

De forma esquemática, las pruebas funcionales hepáticas se pueden dividir en:

- a) Pruebas que informen sobre posible lesión hepatocelular o citolisis.
- b) Pruebas relacionadas con el metabolismo de la bilirrubina (Captación, conjugación y excreción) así como estasis biliar (colestasis).
- c) Pruebas que analizan la síntesis hepática de sustancias necesarias para el funcionamiento corporal.

Generalmente suelen alterarse varias de estas funciones al mismo tiempo, aunque hay formas aisladas con afectación única.

Entre las pruebas que informan de lesión hepatocelular o citolisis destacan las transaminasas o aminotransferasas. Estas representan enzimas del metabolismo intermedio, que catalizan la transferencia de grupos amino del ácido aspártico o alanina al ácido acetoglutárico, formando ácido oxalacético y ácido pirúvico. En el hígado se producen múltiples reacciones de transaminación, pero la única transaminasa con valor clínico son dos:

1. Aspartato – aminotransferasa o transaminasa glutámicooxalacética (AST o GOT) cuya vida media es de 48 horas.
2. Alanina – aminotransferasa o transaminasa glutámico – pirúvica (ALT o GPT) con una vida media de 18 horas.

La ALT es más específica de daño hepático que la AST, debido a que la primera se localiza casi exclusivamente en el citosol del hepatocito, mientras que la AST, además del citosol y mitocondria, se encuentra en el corazón, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, eritrocitos y leucocitos (Alvarez., 2005).

Cualquiera sea el caso, la determinación de las transaminasas adquiere importancia diagnóstica cuando sus valores se comparan con las otras enzimas de similar origen tisular, es decir que permita completar el perfil enzimático de órganos como tales el hígado.

2.10.1. Transaminasas hepáticas

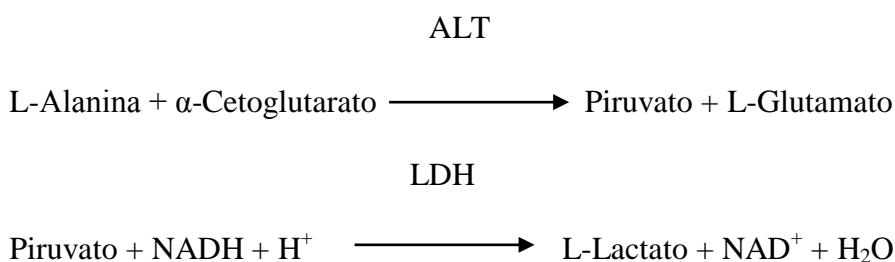
2.10.1.1. Alanina aminotransferasa (ALT)

La Alanina Aminotransferasa (ALT) es una enzima citoplasmática cuya mayor actividad se localiza en el tejido hepático. En mucho menor proporción se encuentra actividad de ALT en el musculo esquelético, corazón, riñón, páncreas y eritrocitos. Teniendo en cuenta su distribución los mayores aumentos de ALT en suero, se producen como consecuencia de alteraciones hepáticas (Sociedad Escandiva de Química y Fisiología Clínica –SSCC., 1974).

Las aminotransferasas catalizan la formación del ácido glutámico a partir de 2-oxoglutarato mediante la transferencia de grupos amino. ALT se encuentra en diferentes tejidos aunque sus mayores concentraciones se hallan en el hígado y riñón (Friedman y col., 1997).

La reacción principal, catalizada por la GPT (ALT o Alanina Aminotransferasa), esta desplazada hacia la formación de piruvato, que reacciona inmediatamente con la LDH, de modo que la velocidad de oxidación del NADH medida a 340 nm (334 ò 336nm) es proporcional a la actividad GPT de la muestra. En el medio de reacción hay LDH en exceso para consumir cetoácidos de origen endógeno, evitando así su interferencia.

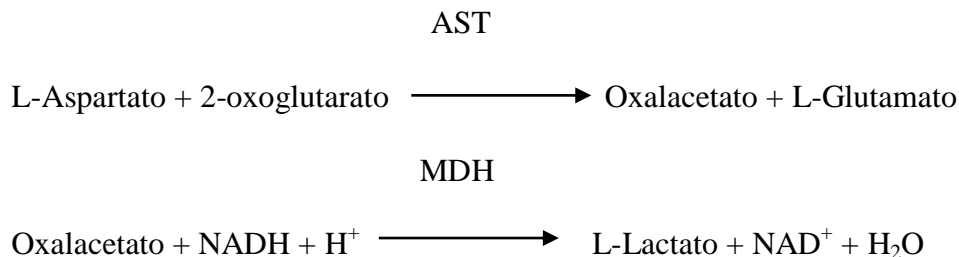
La reacción enzimática empleado en el siguiente ensayo es la siguiente



2.10.1.2. Aspartato aminotransferasa (AST)

La Aspartato Aminotransferasa (AST) es una enzima citoplasmática y mitocondrial. Cualquier alteración de estos tejidos produce un aumento en los niveles de AST circulantes, en forma proporcional al grado del daño. En general, altos niveles séricos de AST son índice de lesión profunda (Sociedad Escandiva de Química y Fisiología Clínica –SSCC., 1974).

La reacción enzimática empleado en el siguiente ensayo es la siguiente



La AST cataliza la transferencia de un grupo amino entre L- Aspartato y 2-Oxoglutarato. El oxalacetato formado en la primera reacción reaccionara con el NADH en la presencia de malato deshidrogenasa (MDH) para formar NAD. La actividad de AST es determinada midiendo la tasa de oxidación del NADH a 340nm. La lactato deshidrogenasa es incluida en el reactivo para convertir el piruvato endógeno en la muestra a Lactato durante la fase anterior a la medida.

2.11. Hemograma

El hemograma, también conocido como cuadro hemático y biometría hemática, es una de las pruebas más solicitadas y uno de los estudios que mayor información aporta sobre la homeostasis de un individuo.

El hemograma se define como el análisis cuantitativo y cualitativo de los componentes celulares de la sangre periférica. El hemograma como prueba de laboratorio permite tener una visión global de homeostasis del sistema hematopoyético, de ahí la importancia de que se evalúen el mayor número de parámetro y sobre todo de que estos tengan la mayor precisión y exactitud

2.11.1. Recuento de eritrocitos

Consiste en determinar la cantidad de eritrocitos en sangre periférica por unidad de volumen por milímetro cúbico (mm^3). Par realizar el recuento manual de Eritrocitos se requiere pipeta de dilución para glóbulos rojos, cámara Neubauer y un microscopio convencional.

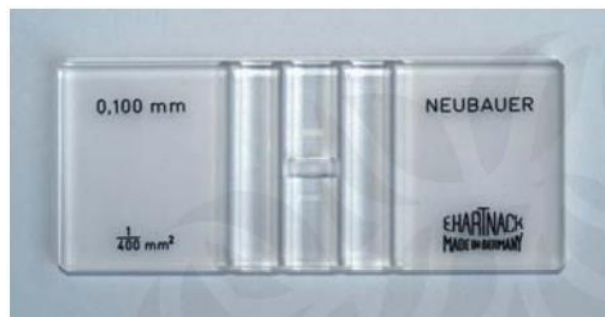


Figura 1. Cámara Neubauer

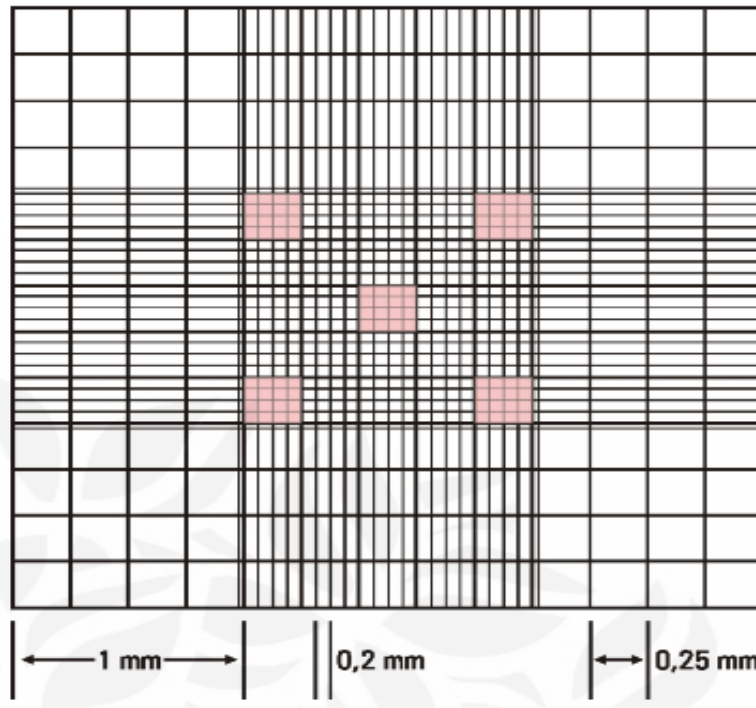


Figura 2. Detalle de cámara Neubauer. El área total de la cámara es de 3x3 mm, con 9 cuadrados grandes, los eritrocitos se cuentan en 5 cuadrados coloreados.

2.11.2. Hematocrito

El hematocrito representa la fracción de volumen eritrocitario y corresponde al volumen ocupado por los glóbulos rojos en relación con el volumen total de la sangre.

El hematocrito se expresa de acuerdo a la nomenclatura tradicional como porcentaje, o preferiblemente, de acuerdo al Sistema Internacional (SI) de unidades recomendado por el ICSH (*International Council for Standardization in Haematology*), como una fracción decimal en donde la unidad L/L está implícita.

2.11.3. Hemoglobina

La hemoglobina (Hb) es un pigmento respiratorio, de naturaleza proteica, que constituye el 95% del peso seco del eritrocito. Debido a ello es el componente estructural funcional más importante del hematíe. A través de la Hb, el hematíe realiza su función transportadora de oxígeno (O_2) desde los pulmones a los tejidos. A nivel de los pulmones, el O_2 se fija a la Hb, dando lugar a la formación de oxihemoglobina (Hb- O_2), y de esta forma es transportado hacia los tejidos, donde el O_2 es liberado y la Hb se transforma en Hb reducida o desoxihemoglobina (Hb-red) (Vives., 1984).

Desde el punto de vista clínico, la hemoglobina define los conceptos de anemia y policitemia. La hemoglobina es la proteína transportadora de oxígeno. Representa el 32 % de la masa total del eritrocito. La hemoglobina es el mejor índice para medir la capacidad transportadora de gases, tanto para oxígeno (O_2) como para dióxido de carbono (CO_2) por parte del eritrocito. La hemoglobina al igual que el hematocrito representan en forma indirecta el número de eritrocitos. Desde el punto de vista de la evaluación de la integridad hematológica, la determinación de la hemoglobina es superior a la del hematocrito y la del recuento de eritrocitos (Perkins., 2004).

La función de la hemoglobina consiste fundamentalmente en el transporte del oxígeno desde los pulmones a los tejidos y, en parte, también del dióxido de carbono (CO_2) por la hemoglobina se realiza mediante unión covalente con los grupos amino de las cadenas globínicas, dando lugar a carbaminohemoglobina que posee un color algo más oscuro que la oxihemoglobina. El resto de CO_2 , que constituye la mayor parte, es transportado en el plasma en forma de bicarbonato.

2.11.4. Recuento diferencial de leucocitos

La fórmula leucocitaria es el recuento diferencial de cada uno de los leucocitos presentes en la sangre periférica. Estos se clasifican en dos grandes grupos: polinucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y mononucleares (linfocitos y monocitos) (Vives., 1984)

El recuento diferencial de leucocitos permite establecer los conceptos de neutrofilia, neutropenia, agranulocitosis, eosinofilia, eosinopenia, basofilia, basopenia, monocitosis, monocitopenia, linfocitosis y linfopenia que pueden estar asociados a enfermedades benignas como procesos infecciosos, procesos inflamatorios y mielotoxicidad, entre otros, o enfermedades malignas como leucemia y mieloptisis.

Se basa en la observación mediante microscopio de 100 o 200 leucocitos extendidos en un frotis sanguíneo teñido con la tinción de Romanowsky, debe realizarse una primera observación de mismo mediante un objetivo de poco aumento al objeto de apreciar la calidad de la tinción y las características de la distribución general de la células. Con este aumento se puede apreciarse también la eventual presencia de sangre periférica de elementos atípicos, tales como blastos, elementos inmaduros de la serie mieloide, eritroblastos o linfocitos reactivos.

La realización de la fórmula leucocitaria propiamente dicha exige el empleo de un objetivo de mayor aumento (generalmente inmersión). Una vez asegurada la buena calidad de la extensión y la distribución relativamente regular de los leucocitos (en los extremos y cola de la extensión, el número de células es generalmente superior al que se encuentra en el cuerpo), debe seleccionarse la zona ideal donde las

células puedan ser observadas en toda su superficie y sin artefactos tanto en el tamaño como en la forma. Esta zona generalmente corresponde a la denominada “cuerpo” del frotis, situada entre las “barbas” y la cola. Al realizar el recorrido debe escogerse un trayecto en el cual el 5% de las células contabilizadas pertenecen a las zonas periféricas o bordes de la extensión, y el 95% restante, a la zona central, teniendo cuidado en no contar dos veces la misma célula. El número de células observadas tiene valor para la interpretación estadística del resultado. Es evidente que la exactitud del recuento diferencial leucocitario depende del número de las células incluidas en el mismo. Por ello un recuento a 100 células, por ejemplo, es más exacto que uno a 50. La apreciación que se consigue con una fórmula a 100 elementos, si bien con escaso valor estadístico, si posee indudable valor clínico, porque permite afirmar que en la sangre del paciente la proporción de leucocitos es normal y no se observan elementos atípicos, lo cual en realidad ya es mucho (Vives., 1984).

La fórmula leucocitaria no solo tiene como objetivo fundamental analizar los aspectos cuantitativos de las células que forman cada subpoblación de leucocitos (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos) si no también señalar eventuales alteraciones morfológicas o de coloración en las mismas, así como la existencia en la sangre periférica de células no presentes normalmente en ella (blastos, mielocitos, eritroblastos y otras).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar de la toxicidad aguda de los extractos acuosos de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) y *Amaranthus caudatus* (Amaranto) y la influencia sobre parámetros bioquímicos y hematológicos en animales de experimentación.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar la DL₅₀ en ratones Swiss albinos
- Determinar la toxicidad aguda a dosis únicas no letal de Extractos acuosos de *Lupinus mutabilis* Swett (Tarwi) y *Amaranthus caudatus* (Amaranto) en ratones Swiss albinos.
- Evaluar la toxicidad aguda a dosis continuas no letales hasta 14 días de los extractos acuosos de *Lupinus mutabilis* Swett (Tarwi) y *Amaranthus caudatus* (Amaranto) en ratones Swiss albinos
- Evaluar la influencia de los Extractos acuosos de *Lupinus mutabilis* Swett (Tarwi) y *Amaranthus caudatus* (Amaranto) sobre enzimas marcadores de toxicidad y parámetros hematológicos en ratones Swiss albinos sometidos a toxicidad.

4. MATERIALES

4.1. Material biológico

- Se utilizaron ratones albinos suizos de ambos sexos, con un peso corporal comprendido entre 20 y 25g., en condiciones estándares de humedad, temperatura (20 ± 2 °C), fotoperiodos (ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h), fueron alimentados con ratonina peletizada y agua *ad libitum*.
- Extractos acuosos liofilizados de: *Lupinus mutabilis* Swett (Tarwi) y *Amaranthus caudatus* (Amaranto).

4.2 Materiales

- Hemacitómetro (cámara Neubauer)
- Laminas porta-objeto
- Gradilla
- Tubos de hemolisis (13 x 100 mm)
- Tubos capilares para hematocrito
- Vaso precipitados (500 mL)
- Pipetas Graduadas (1 – 2 mL)
- Viales *Eppendorf*
- Bureta (250 mL)
- Erlenmeyer (500 mL)
- Pipeta Pasteur de vidrio
- Jeringas (1 mL)
- Papel Filtro 0.2 μ m
- Papel Parafilm
- Micropipetas graduadas

4.3. Reactivos

- Randox 2 (reactivo de control de calidad en química clínica; Lote: 345TYD; Vencimiento: Mayo/2018)
- Solución de Turk (Ácido acético 3%)
- Solución Fisiológica (NaCl 0.9%)
- Tinción panóptico: Solución fijadora (metanol); Colorante ácido (solución tamponada de xanteno); Colorante básico (solución de tiazina)
- Aceite de inmersión
- Agua destilada
- EDTA al 10%
- Etanol al 70° GL
- Cloroformo

4.4. Equipos

- Balanza analítica Modelo BP – 210S Sartorius, industria Japonesa.
- Liofilizador Modelo CHRIST, Alpha 2 -4, GERMANI.
- Rota evaporador Modelo Heidolph, Laborota GERMANI.
- Baño María marca Químis, industria Brasileira.
- Microscopio: Marca OLYMPUS CX 31, Industria Japonesa
- Analizador Químico: Stax Fax 4542, AWARENESS, Industria Americana
- Centrifugadora
- Micro centrifugadora
- Contador celular

5. MÉTODOS

5.1. Recolección del material vegetal

Las semillas de *A. caudatus* fueron colectadas en la comunidad de Tomina, Segunda sección, Provincia Tomina departamento de Chuquisaca, que se encuentra a una latitud de 19°30'07'' oeste, su altitud es de 2700 m.s.n.m.

Las semillas de *L. mutabilis* fueron colectados en la comunidad de Ancoraimes, segunda sección de la provincia Omasuyos del departamento de La Paz. Se encuentra a una latitud de 15°54'32'' sur y longitud oeste 68°52'3'', su altitud es de 3825 m.s.n.m. Las cuales fueron autenticadas por el Herbario Nacional de Bolivia, posteriormente las semillas fueron clasificadas, separadas, almacenadas y procesadas en instalaciones del Instituto de Investigaciones Fármaco –Bioquímicas.

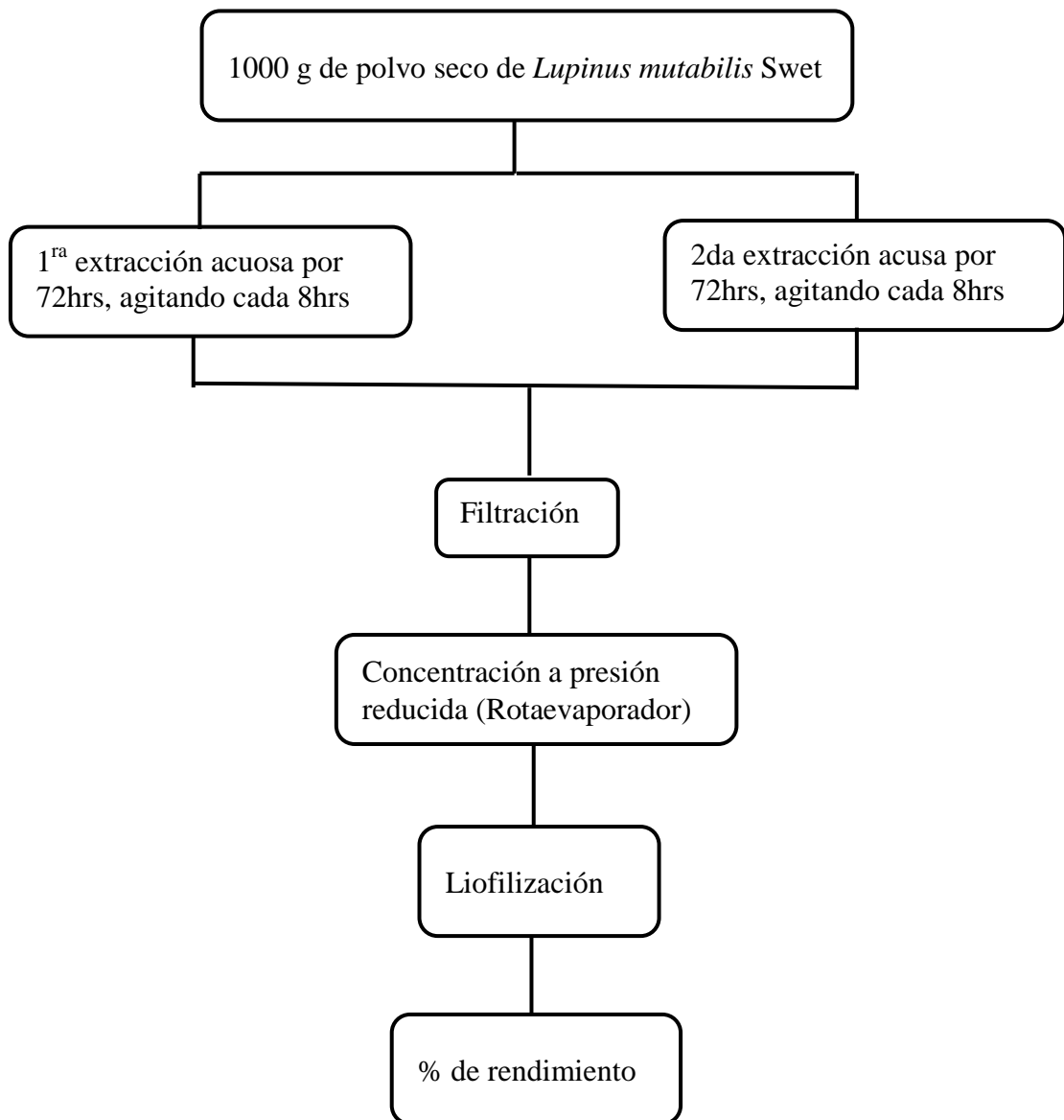
Las muestras de *L. mutabilis* molidos sin cascara fueron proporcionados por el Laboratorio de alimentos AGRONAT S.A. en convenio con el Instituto de Investigaciones Fármaco – Bioquímicas para su posterior análisis y evaluación de parámetros bioquímicos

5.2 Preparación del extracto acuoso de *L. mutabilis* Sweet sin cascara

Las muestras de *L. mutabilis* molidos sin cascara fueron sometidos a una maceración acuosa en frascos de vidrio de 1 litro que fueron cerrados herméticamente, los cuales fueron depositados durante un periodo de 96 horas, siendo agitada cada 8 horas. La solución se filtró a través de papel filtro whatman, y esta fracción fue concentrada a presión reducida en un rotaevaporador (110 rpm y a 35 °C) para eliminar el exceso de solvente de la muestra. La maceración obtenida se llevó a congelación a – 70 °C por 3 días para su posterior liofilización.

Esquema 1.

Marcha de extracción acuosa del *Lupinus mutabilis* Sweet sin cascara



Rendimiento

1000 g de Materia prima ----- 100% de EA-Lm

182 g.----- X

Rendimiento. = 18,2 %



Figura 3. Maceración del Extracto acuoso de *Lupinus mutabilis* Sweet – sin cascara
Fuente: IIFB – UMSA



Figura 4. Filtración del Extracto acuoso de *Lupinus mutabilis* Sweet – sin cascara
Fuente: IIFB – UMSA

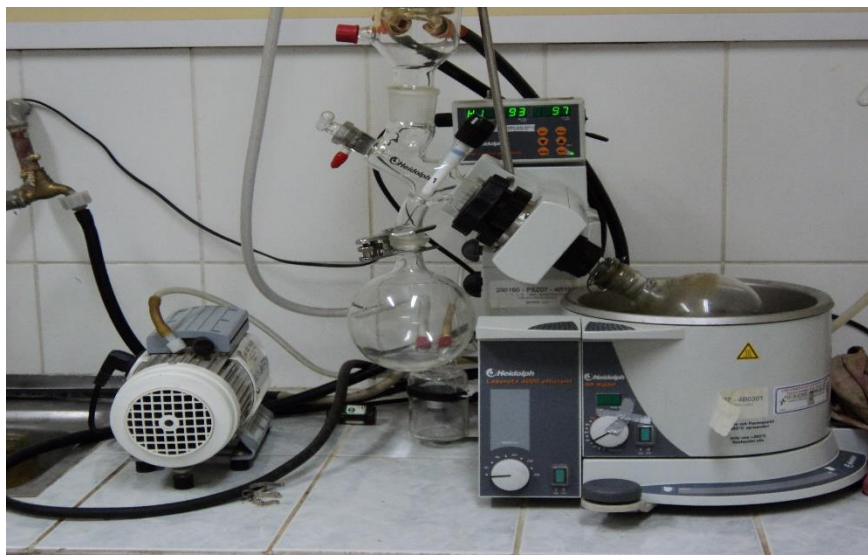


Figura 5. Concentración del Extracto acuoso de *Lupinus mutabilis* Sweet – sin cascara.
Fuente: IIFB – UMSA



Figura 6. Liofilización del Extracto acuoso *Lupinus mutabilis* Sweet – sin cascara.
Fuente: IIFB – UMSA

5.3. Condiciones y Mantenimiento de Ratones

Se utilizaron ratones albinos suizos de ambos sexos, con un peso corporal comprendido entre 20 y 25 g. Todos los animales fueron criados y mantenidos adecuadamente en el bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, con ciclos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, con alimento y agua *ad libitum*. El número de animales utilizados para cada ensayo fue de 10. El Protocolo del ensayo realizado fue revisado y aprobados por el Comité de Ética institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio.

La administración de los grupos de tratamiento a diferentes dosis fue por vía oral, utilizando una cánula intragastrica N° 22 (Figura 7).

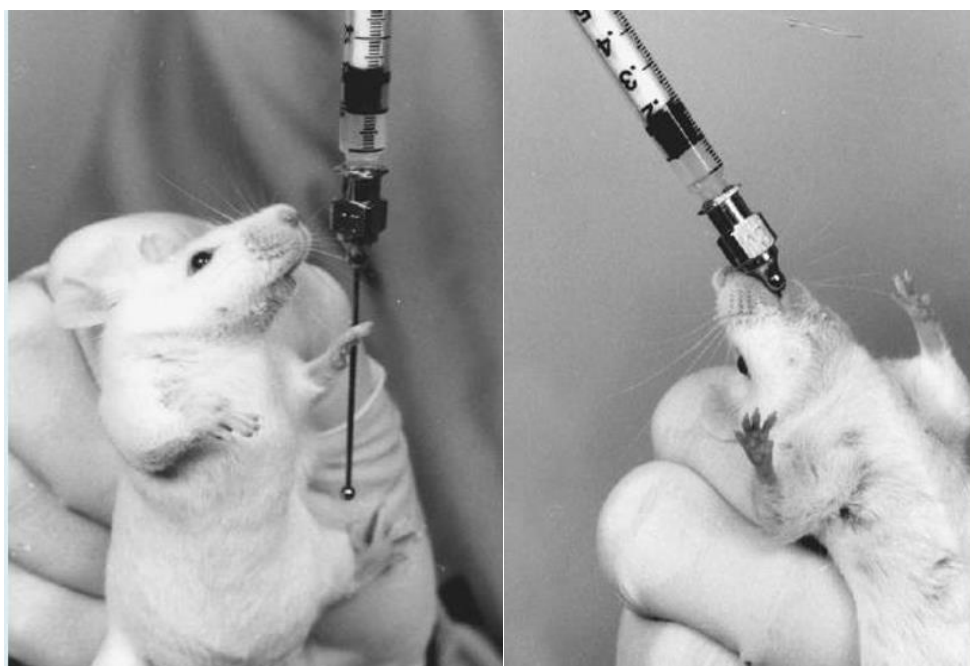


Figura 7. Administración vía oral en ratones albinos Swiss

Fuente.- IIFB – UMSA

5.4. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA A DOSIS ÚNICAS

5.4.1. Determinación de la dosis letal media DL₅₀.

La evaluación de la DL₅₀ de los Extracto Acuoso del *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) y *Amaranthus caudatus* (Amaranto) se realizó en base de la metodología descrita por el CYTED y la OECD., 2001. Para esta evaluación se determinó el porcentaje de sobrevivencia y/o mortalidad en un tiempo de observación de 24 horas, de acuerdo al diseño experimental (Tabla 6) se utilizó aleatoriamente tres grupos de ratones de 10 (5 hembras y 5 machos) por cada extracto utilizado, se utilizó ratones con un peso comprendido entre 20 - 25g.

Tabla 6

Diseño experimental para la determinación de la DL₅₀.

Tratamiento	Especie: Ratones albinos Swiss	Nº de animales	Grupo	Dosis
<i>A. caudatus</i>	Hembras	5	I	1000 mg/kg
				2000 mg/kg
	Machos	5		3000 mg/kg
<i>L. mutabilis</i> Sweet Sin cascara	Hembras	5	II	1000 mg/kg
				2000 mg/kg
	Machos	5		3000 mg/kg
<i>L. mutabilis</i> Sweet Con cascara	Hembras	5	III	1000 mg/kg
				2000 mg/kg
	Machos	5		3000 mg/kg

5.5. Evaluación de la toxicidad aguda en ratones

Una vez realizado la administración de los extractos se observó y se determinaron efectos sobre el SNC a los 30, 60, 120, 240, 480 minutos hasta las 24 horas:

Tabla 7

Parámetros de evaluación del Test hipocrático para la evaluación de la toxicidad a dosis únicas

Nombre del experimento: _____
Nombre del evaluador: _____ Fecha _____ Hora _____
Sexo: _____ Peso: _____
Tratamiento: _____ Vía de Adm.: _____

	TIEMPO POST ADM (Minutos/ Horas)	30	60	120	240	480	24 h	Obs.
	OBSERVACIONES							
	SNC							
1	Disminución de la actividad motora							
2	Ataxia							
3	Perdida reflejo de erección							
4	Parálisis de patas anteriores							
5	Parálisis de la cabeza							
6	Pérdida de la habilidad prensil							
7	Reacción de alarma							
8	Reflejo corneal							
9	Reflejo pineal							
10	Tremores finos del cuerpo							
11	Fasciculaciones							
12	Convulsiones clónicas							
13	Erección de la cola (Straub)							
	REGULACION AUTONOMICA							
14	Salivación							
15	Lagrимación							
16	Micción							

Al concluir el período experimental se procedió al sacrificio de los animales por inhalación de dióxido de carbono para el posterior estudio anatomopatológicos macroscópico del corazón, riñón, bazo, pulmones, hígado, estomago e intestinos.

5.6. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DOSIS CONTINÚA DE 1000 mg/kg

La determinación del ensayo de toxicidad aguda a dosis continuas en ratones fue realizado a dosis de 1000 mg/kg de peso corporal y evaluados de acuerdo al Test hipocrático del CYTED (Tabla 9) evaluados a los tiempos 1,7 y 14 días y según lo establecido por las normas de la Organización para la Colaboración Económica y el Desarrollo (OECD). Para el diseño experimental (Tabla 8), se utilizaron 10 ratones albinos suizos por cada grupo (5 hembras y 5 machos) los cuales fueron conformados de manera aleatoria. Los animales fueron distribuidos en grupos de 10 (5 hembras y 5 machos) por grupo, con un peso corporal comprendido entre 20 -25 g, todos los animales fueron mantenidos en condiciones experimentales de humedad, temperatura (20 ± 2 °C) y fotoperiodos (ciclos de 12 hrs luz/12 hrs oscuridad). La alimentación consistió en ratonina peletizada y agua *ad libitum*.

Tabla 8*Diseño experimental para la toxicidad aguda a dosis continua.*

Tratamiento	Especie: Ratonés albinos Swiss	Nº de animales	Grupo	Dosis
Sol. Fisiológica	Hembras	5	I	-
NaCl 0.9%	Machos	5		
<i>A. caudatus</i>	Hembras	5	II	1000 mg/kg
	Machos	5		
<i>L. mutabilis</i> Sweet	Hembras	5	III	1000 mg/kg
	Sin cascara	Machos		

Las sustancias de ensayo fueron administrados con un ayuno previo de 6 horas por vía oral mediante cánula intragástrica, a dosis única de 1000 mg/kg de peso corporal, teniendo en cuenta la ausencia de signos o síntomas de toxicidad por esta vía de administración.

Los animales fueron observados individualmente durante los primeros 30 minutos post administración con especial atención durante las primeras 4 horas y diariamente hasta los 14 días del experimento, registrándose signos y síntomas de toxicidad.



Figura 8. Evaluación de la toxicidad aguda
Fuente: IIFB - UMSA

Las observaciones estuvieron dirigidas a la determinación de: muerte y tiempo de ocurrencia de la misma, signos y síntomas de toxicidad incluyendo parámetros del Test hipocrático tal como se observa en la Tabla 12.

Tabla 9

Parámetros de evaluación del Test hipocrático para la evaluación de la toxicidad a dosis continúa

Nombre del experimento: _____
Nombre del evaluador: _____ Fecha _____ Hora _____
Sexo: _____ Peso: _____
Tratamiento: _____ Vía de Adm.: _____

	TIEMPO POST ADM (días)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Obs.
	OBSERVACIONES															
	SNC															
1	Disminución de la actividad motora															
2	Ataxia															
3	Perdida reflejo de erección															
4	Parálisis de patas anteriores															
5	Parálisis de la cabeza															
6	Pérdida de la habilidad prensil															
7	Reacción de alarma															
8	Reflejo corneal															
9	Reflejo pineal															
10	Tremores finos del cuerpo															
11	Fasciculaciones															
12	Convulsiones clónicas															
13	Erección de la cola (Straub)															
	REGULACION AUTONOMICA															
14	Salivación															
15	Lagrimación															
16	Micción															

Se controló el peso vivo de los animales en los días 0, 7 y 14 del experimento como uno de los parámetros demostrativos de toxicidad.

Al concluir el período experimental se procedió al sacrificio de los animales por inhalación de dióxido de carbono para la posterior recolección de la toma de muestra sanguínea y el estudio anatomopatológicos macroscópico del corazón, riñón, bazo, pulmones, hígado, estomago e intestinos.

5.7. Recolección de la muestra

La recolección de la muestra sanguínea fue realizada vía intracardiaca según el manual para el manejo de animales con fines de experimentación y enseñanza de la Universidad de Juárez Autónoma de Tabasco - México

5.7.1. Procedimiento

Sujeción e inmovilización: El modelo animal “roedor” fue sujetado de la siguiente manera: El animal se ubicó en decúbito supino para garantizar ausencia de reflejos (corneal y podal).

- **Preparación de materiales y exposición de la zona.**

Para la preparación del roedor se debe palpar la zona esternal con los dedos índice y pulgar a nivel de la costilla aproximadamente. El dedo pulgar se ubica en el costado lateral izquierdo y el anular en el derecho. Lentamente se ubica el punto de mayor intensidad cardiaca (PMIC) y el dedo pulgar se coloca caudal a este.

- **Ubicación de la aguja-jeringa**

Con la otra mano se sostiene la jeringa y se ubica la aguja en ángulo de 45° directamente sobre el PMIC. Lentamente se introduce la aguja un centímetro aproximadamente y se observa si hay salida de sangre a través de la aguja por capilaridad. En caso negativo se puede reubicar la aguja con muy leves movimientos, direccionando la aguja hacia craneal y caudal. Con una adecuada ubicación, lentamente se empieza a succionar la sangre con el dedo pulgar, la mano debe estar fija y solo debe moverse el dedo para evitar malas reubicaciones

- **Retiro del instrumento y observación del animal**

Una vez obtenido la muestra se debe realizar una presión en zona de punción con un algodón con el objetivo de detener el posible sangrado, así mismo una vez obtenido la muestra se debe garantizar la eutanasia del roedor.

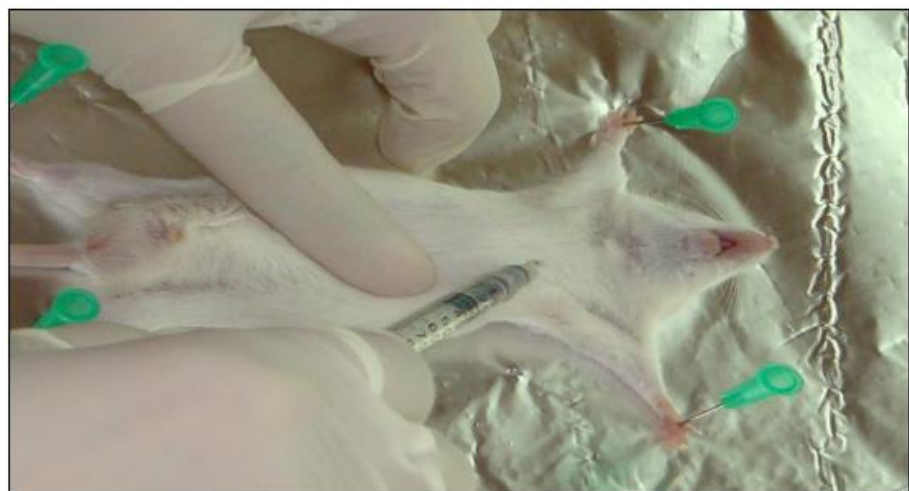


Figura 9. Punción cardiaca en ratones Swiss albinos

Fuente: Bioterio, IIFB - UMSA

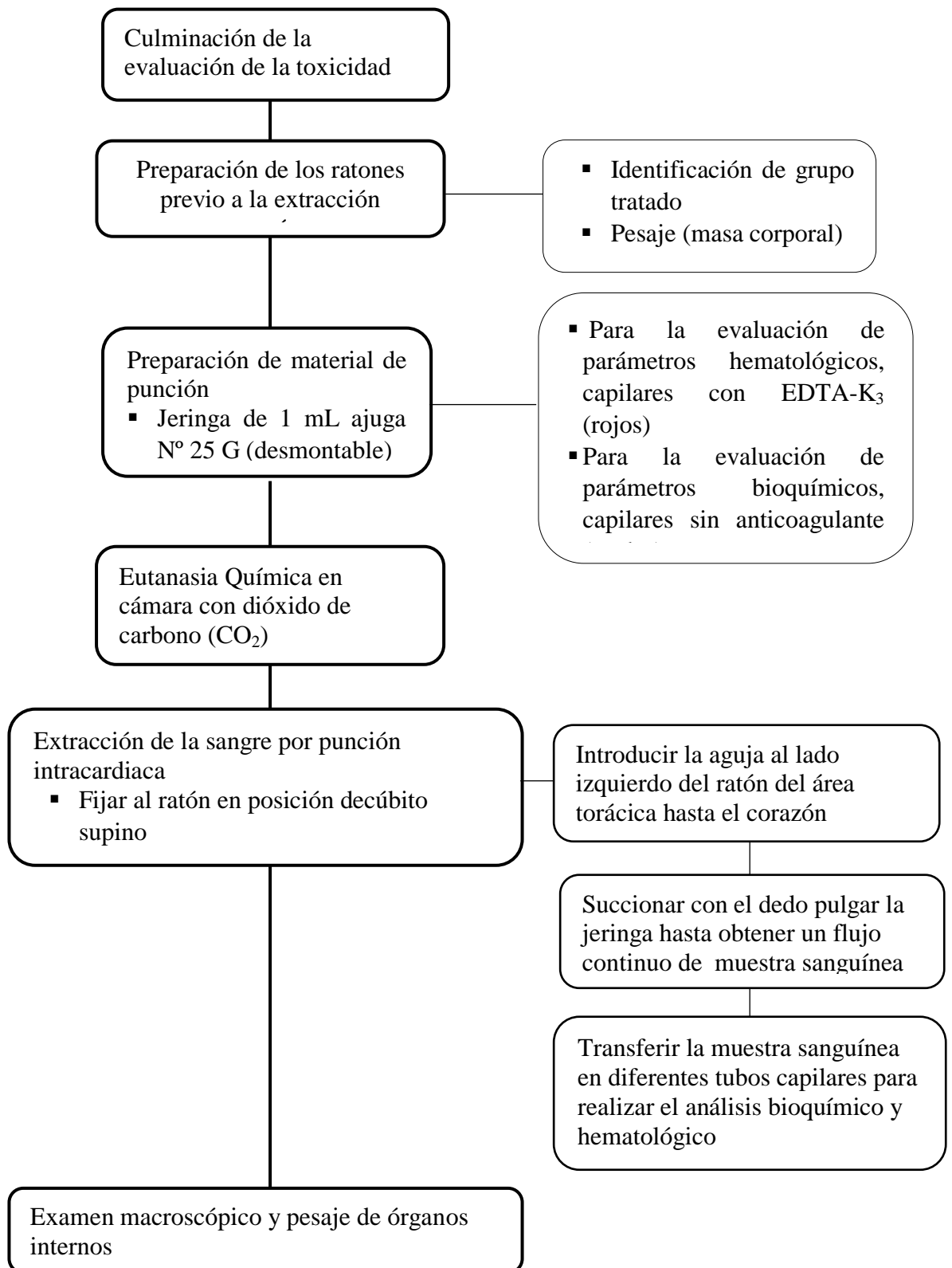


Figura 10. Procedimiento para la obtención de la muestra sanguínea por punción cardiaca.

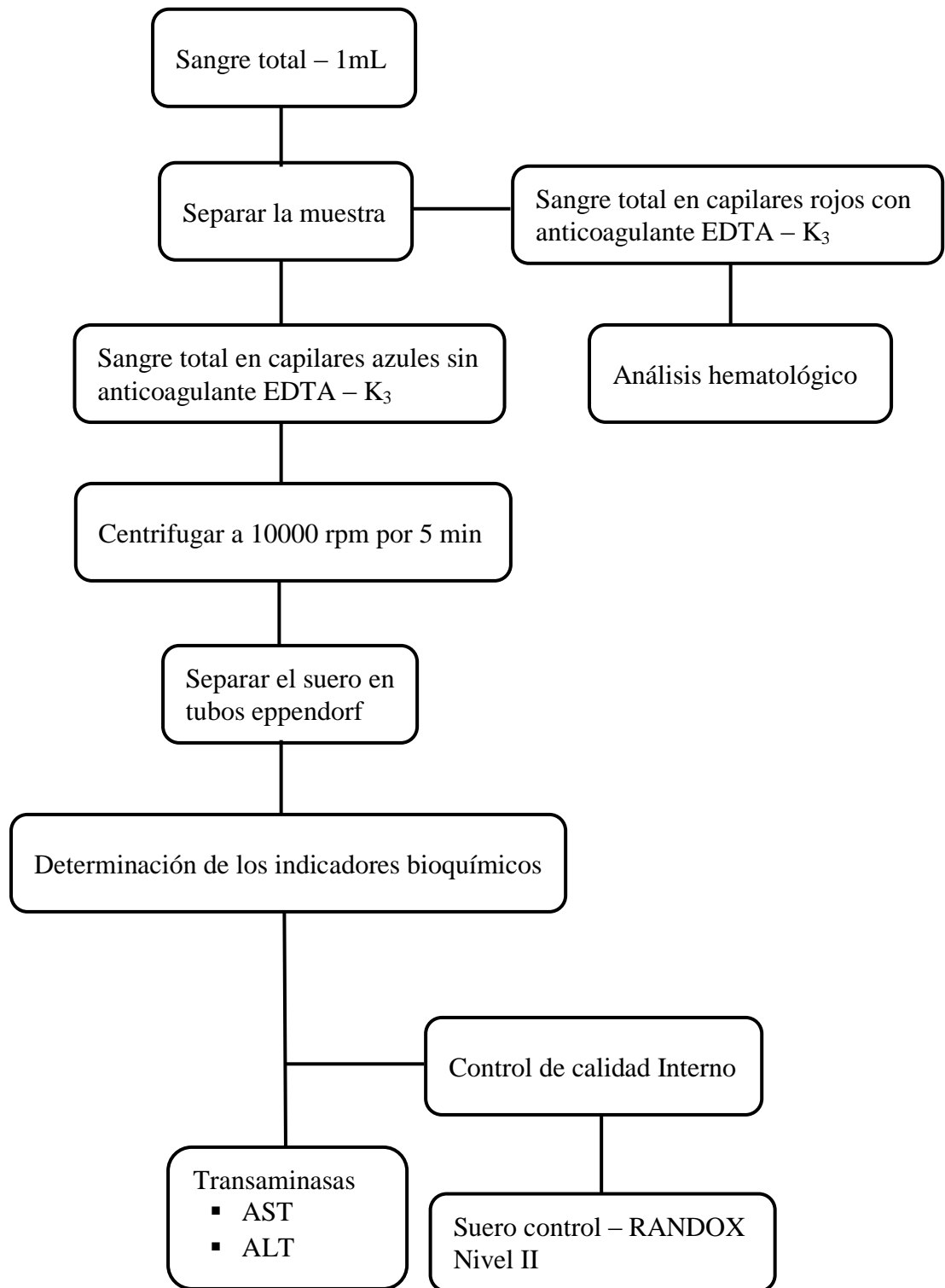


Figura 11. Diagrama de fases de operación en la determinación de análisis Bioquímico

5.8 ANÁLISIS HEMATOLÓGICO

El Hemograma completo se determinó la concentración de la hemoglobina, conteo de eritrocitos, hematocrito y leucocitos totales. El conteo diferencial incluyo conteo de neutrófilos (N), linfocitos (L), monocitos (M), eosinófilos (E) y basófilos (B); se determinó mediante técnica tradicional de extensión de sangre y los resultados se expresaron en porcentajes (%).

5.8.1 Determinación de hematocrito y hemoglobina

La determinación se realizó en base a procedimientos estandarizados de acuerdo con el Comité Internacional de Estandarización en Hematología y el Comité Nacional para Estándares en la Clínica y el Laboratorio (Bull y col., 2003). Es un estudio de laboratorio que nos orienta para el diagnóstico y alteración en la sangre por que nos va determinar en términos de porcentaje la concentración de los glóbulos rojos. El método de preferencia para la determinación de hematocrito es la microcentrifugación de sangre total en un tubo capilar (micrométodo), es una técnica sencilla, barata y accesible a laboratorios de baja complejidad.

El método se basa en medir el empaquetamiento de la columna de eritrocitos cuando la sangre total con anticoagulante se somete a la acción de la fuerza centrífuga. Se trata de un indicador clave del estado corporal de hidratación, anemia o pérdida de sangre, así como la capacidad de la sangre para transportar oxígeno.

5.8.1.1 Materiales

- Capilares rojos (con anticoagulante).
- Microcentrifugadora.
- Plastilina.
- Lector de hematocrito, modelo Critocaps (Oxford, McCormick Scientific).

5.8.1.2 Procedimiento

- Para el análisis hematológico, la sangre fue extraída a través de una jeringa vía intracardiaca y colectada en capilares heparinizados.
- Se obtuvo la muestra vía punción intracardiaca.
- Se transfirió la muestra obtenida en la jeringa a los tubos capilares de vidrio color rojo (con anticoagulante), desechable no graduado de 1 mm de diámetro inferior, 7,5 cm de longitud y paredes de 0.2 a 0.25 mm de grosor y se dejó que pase por gravedad hasta tres cuartas partes del capilar y se realizó el sellado o taponamiento con plastilina.
- Se llevó los capilares a la microcentrifugadora colocándole en uno de los canales el lado de la plastilina en dirección interna y el otro extremo en dirección externa siempre haciendo contacto con el borde de la microcentrifugadora.
- Fue centrifugada a 10.000 rpm en un tiempo de 5 minutos.
- Una vez centrifugado los capilares fueron retirados del equipo y se llevó al lector de hematocrito siempre con la base de la plastilina en la base del lector donde cruza la línea cero y el otro extremo con las líneas de borde de la concentración de los glóbulos rojos.

- Se realizó la lectura utilizando el lector de tubos de microhematocrito colocando el extremo inferior de la columna de sangre en la línea correspondiente a 0 y el extremo superior en la línea correspondiente al 100, la determinación del hematocrito se realizó por duplicado.
- La estimación de la hemoglobina (Hb) se efectuó empleando la tabla de valores normales del volumen globular por el hematocrito.

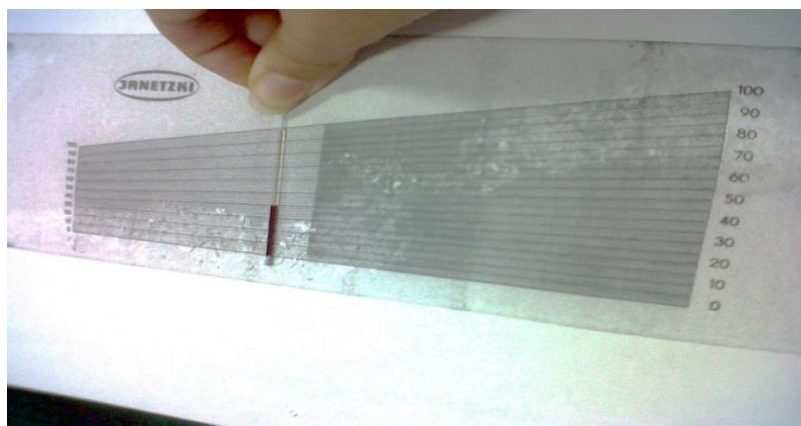


Figura 12. Carta de lectura de hematocrito

Fuente: IIFB – UMSA

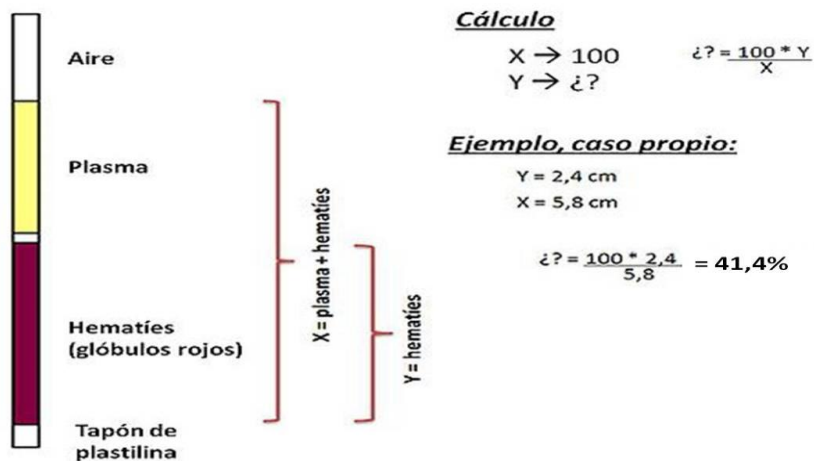


Figura 13. Cálculo para la determinación del porcentaje de hematocrito

Fuente: <http://laboratoriohematologiadefelipe.blogspot.com/2015/05/hematocrito.html>.

5.8.2 Recuento de glóbulos blanco

El recuento de glóbulos blancos se realizó en base a la metodología descrita por Vives (1987), que consiste en realizar el recuento de los leucocitos presentes en una dilución de sangre. La técnica consiste en diluir la sangre anticoagulada con EDTA en líquido de Turck y realizar el recuento de las células mediante hemocitómetro o cámara de recuento utilizando un microscopio óptico. Protegen frente a infecciones y juegan un papel importante en inflamaciones y en respuestas alérgicas, además de proteger contra el cáncer.

Para calcular el valor total de recuento se tomó en cuenta la dilución realizada, el área contada y la altura de la cámara.

5.8.2.1 Materiales y Reactivos

- Cámara Neubauer
- Microscopio
- Contador Celular
- Pipeta de Thoma de Leucocitos
- Solución de Turk

5.8.2.2 Procedimiento

1. Se preparó un tubo con 380 μL de solución de Turk
2. Se pipeteó 20 μL de sangre
3. Se transfirió 20 μL de sangre en el tubo con diluyente y se procedió a mezclar suavemente la sangre y el diluyente
4. Se colocó una gota en la cámara de Neubauer por capilaridad toda la superficie

5. Se dejó en reposo durante 5 minutos para que sedimenten los leucocitos
6. Enfocar la cámara con el objetivo de 10x
7. Se procedió a la lectura con el microscopio con el objetivo de 10x y el contador celular realizando el conteo de todos los leucocitos presentes en los 16 cuadros de los 4 cuadros grandes situados en las esquinas de la cámara.
8. Se realizó el cálculo de leucocitos de la muestra (expresado en leucocitos por mm^3 de sangre) teniendo en cuenta la dilución realizada y el volumen total en la que se ha realizado el recuento.

Para obtener el resultado final se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Numero de leucocitos por mm}^3 = L \cdot D \cdot CV$$

L = Numero de leucocitos contados

D = Es el factor de dilución

CV= Es la corrección del volumen

Para aplicar la formula anterior se tomó en cuenta las siguientes consideraciones:

1. Como se ha mezclado 20 microlitros de sangre y 380 microlitros de solución de Turck la dilución realizada es 1:20. Por tanto se multiplica por 20 ($D = 20$)
2. Como el recuento de leucocitos se hizo en 16 cuadros de los 4 cuadros grandes situados en las esquinas de la cámara, por lo tanto el volumen total en el que se ha realizado el recuento es $0.1 \text{ mm}^3 \times 4 = 0.4 \text{ mm}^3$. Como el

resultado del recuento se tiene que expresar por mm^3 la corrección de volumen (CV) será igual a $1/0.4 \text{ mm}^3 = 2.5$.

Por lo tanto:

Numero de leucocitos por $\text{mm}^3 = \text{Numero de leucocitos contados} \cdot 2.5 \cdot 20$

Numero de leucocitos por $\text{mm}^3 = \text{Numero de leucocitos contados} \cdot 50$

Calculo:

$$\text{Área total de cuadrados contados} = 4 \times 1 \text{ mm}^2 = 4\text{mm}^2$$

$$\text{Volumen de la cámara (altura} = 0.1 \text{ mm)} = 4 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 0.4 \text{ mm}^3$$

Se han contado todos los leucocitos en un volumen de $0.4 (=2/5) \text{ mm}^3$, por lo que si el numero obtenido es B, la cifra de leucocitos en 1 mm^3 de sangre diluida será igual a $B \times 5/2$. Finalmente, la cifra de leucocitos se obtendrá multiplicando por 20 (factor de dilución) el valor obtenido anteriormente ($B \times 5/2$) (Vives., 1987).

5.8.3 Recuento diferencial de glóbulos blancos

El recuento diferencial de glóbulos blancos se realizó en base a la metodología descrita por Vives (1987), realizando un recuento total de 100 leucocitos en una lámina periférica previa tinción modificada de Romanowsky (Panóptico rápido). La presencia de subpoblaciones linfocitarias fue expresada en porcentajes (%).

El recuento diferencial de leucocitos es una parte rutinaria de biométrica hemática que puede ser útil en la valoración de una infección o inflamación, en la determinación de los efectos de intoxicación posible por sustancias químicas o

drogas, en monitoreo de trastornos sanguíneos como la leucemia, y en los efectos secundarios de tratamientos como la quimioterapia.

Pueden diferenciarse 5 tipos de leucocitos maduros (Neutrófilos, Eosinófilos, Basófilos, Monocitos y Linfocitos) basándose en general en las siguientes características:

- ❖ Tamaño de la célula
- ❖ Forma del núcleo
- ❖ Contenido de gránulos
- ❖ Consistencia de la cromatina nuclear
- ❖ Coloración de los gránulos

5.8.3.1 Materiales

- Microscopio
- Portaobjeto de vidrio
- Papel secante
- Contador celular
- Cronometro
- Aceite de inmersión
- Alcohol metanol fijador
- Eosina
- Colorante policromático

5.8.3.2 Procedimiento

- Inicialmente la muestra fue homogenizada para realizar el frotis
- El extendido se realizó con el portaobjeto a 20 o 30 grados tocando la gota de sangre y esperando a que la sangre se distribuya por capilaridad en el extremo del portaobjeto extensor deslizándolo suavemente sobre el otro primer portaobjeto
- Una vez obtenido el extendido se dejó secar el frotis
- Se realizó la tinción correspondiente de la siguiente manera:
 - a. La fijación de la extensión en metanol absoluto fue de 30 segundos aproximadamente.
 - b. Se procedió a teñir con la solución de eosina por 20 segundos
 - c. Se procedió a enjuagar con agua de la llave.
 - d. Se introdujo la extensión en solución de azul de policromo durante 30 segundos.
 - e. Se procedió a realizar el enjuague con agua de la llave, dejar escurrir el agua y dejar secar al aire libre.
- Se colocó una gota de aceite de inmersión y se procedió a la lectura en microscopio con el objetivo de 100x

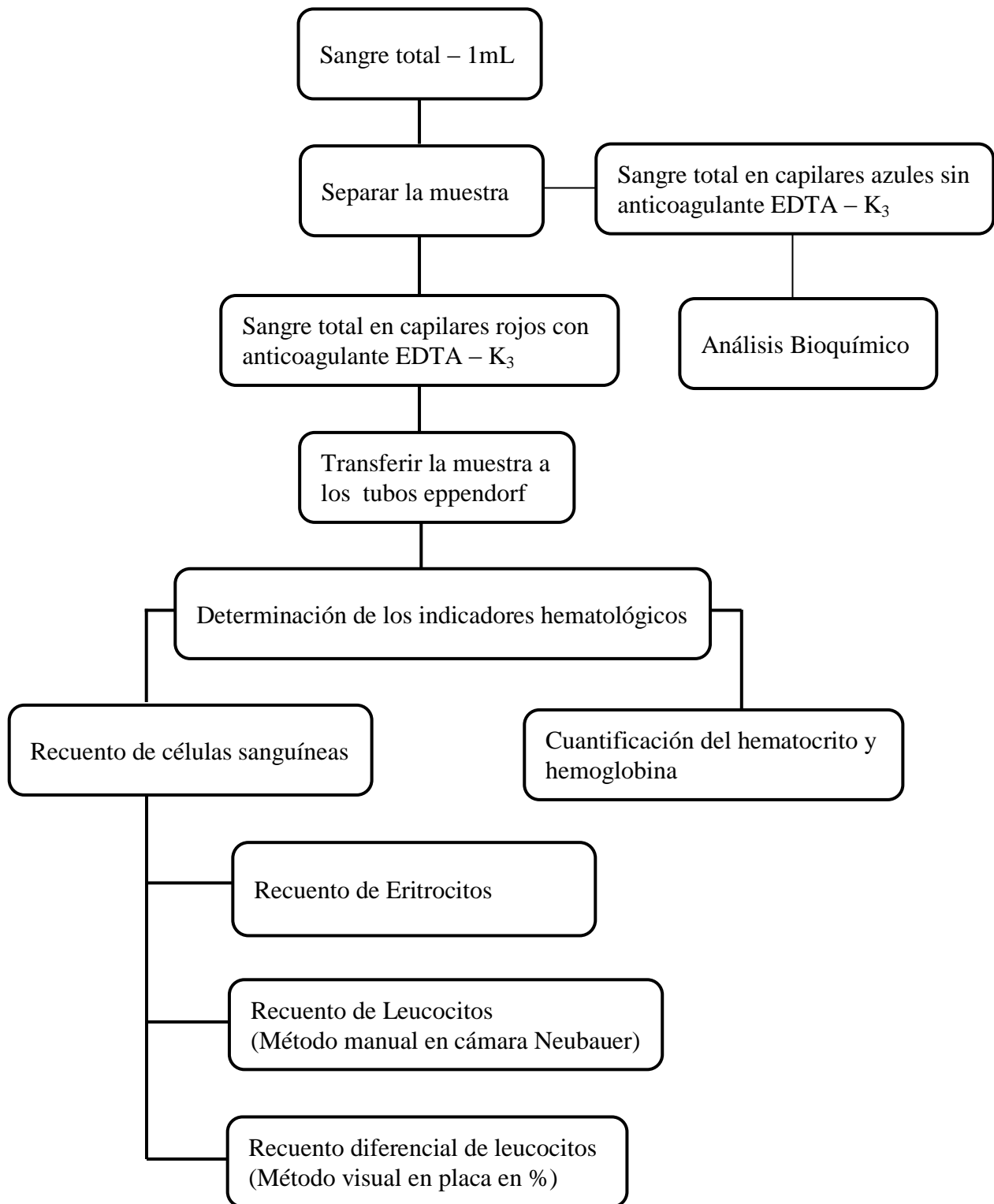


Figura 14. Diagrama de operación en la determinación de parámetros hematológicos.

5.8.4 DETERMINACIÓN DE TRANSAMINASAS

La determinación de las enzimas (AST y ALT) se realizó por el Método Cinético – UV, TECO DIAGNOSTICS, en el equipo STAX FAX 4542 bajo programación de longitud de onda, cálculos y condiciones de lectura.

El uso de los reactivos se ajusta a la formulación recomendada por la (IFCC).

5.8.4.1 Materiales

- Micropipetas de 50, 100 uL
- Tips
- Tubos de lectura (12 x 75 mm)
- Equipo Stax Fax Awareness 4542

5.8.4.2 Procedimiento

1. Reconstituir el reactivo (ALT) con agua destilada (12 mL) según instrucciones TECO – DIAGNOSTICS, USA y homogenizar el reactivo liofilizado hasta su completa disolución.
2. Programar y estandarizar bajo condiciones de lectura el Analizador Químico – Stax Fax Awareness 4542 a una longitud de onda a 340 nm y leer como blanco agua destilada.
3. Pipetear 1.0 mL de reactivo a tubos de lectura (Blanco, Estándar y Muestra) y pre incubar a 37 °C durante 3 – 4 min.
4. Añadir 100 uL de la muestra (suero) homogenizar y llevar inmediatamente a lectura en el equipo, el equipo medirá la absorbancia en tiempos de prelectura y lectura y calculará la diferencia de absorbancias.

Tabla 10

Método para la determinación de Aspartato aminotransferasa (AST) en suero.

En tres tubos marcados B (Blanco), S (Estándar) y M (Muestra)			
	Blanco	Estándar	Muestra 1
Reactivo A (/AST)			
Colocar en Baño seco a 37 °C 3 – 4 minutos			
Blanco:	1 mL Reactivo	Lectura —————→	Resultado
Estándar:	1 mL Reactivo + 100 µl Estándar	Lectura —————→	Resultado
Muestra:	1 mL Reactivo + 100 µl Suero	Lectura —————→	Resultado

Tabla 11

Método para la determinación de Alanina aminotransferasa (ALT) en suero.

En tres tubos marcados B (Blanco), S (Estándar) y M (Muestra)			
	Blanco	Estándar	Muestra 1
Reactivo A (ALT)			
Colocar en Baño seco a 37 °C 3 – 4 minutos			
Blanco:	1 mL Reactivo	Lectura —————→	Resultado
Estándar:	1 mL Reactivo + 100 µl Estándar	Lectura —————→	Resultado
Muestra:	1 mL Reactivo + 100 µl Suero	Lectura —————→	Resultado



Figura 15. Determinación de las Aminotransferasas – Stat Fax 4542
Fuente: IIFB – UMSA

5.9 Análisis estadístico.

Los resultados de este trabajo fueron procesados con el paquete estadístico de Microsoft Office Excel 2013 y almacenados en una base de datos según el programa Statgraphics para Windows 8. Para establecer si las diferencias entre ambos grupos (tratado y control) fueron estadísticamente significativas se utilizó la prueba de t de Dunnet (bilateral). Se aceptó $p < 0,05$; $p < 0,01$ como indicadores de las diferencias estadísticamente significativas. Los resultados obtenidos se exponen como el promedio de grupo \pm desviación estándar.

6 RESULTADOS

6.1. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA A DOSIS ÚNICAS DE 1000, 2000 y 3000 mg/kg.

6.1.1. Extracto: *Amaranthus caudatus*

6.1.1.1. Evaluación de parámetros de toxicidad hasta los 30 min

Se puede observar (Tabla 12) la presencia de síntomas durante los primeros 30 min, observando la presencia de conducta pasiva (4 ratones) y conducta temerosa (4 ratones) no significativos en comparación al grupo control (solución fisiológica) a dosis de 2000 y 3000 mg/kg, estos síntomas sugieren no ser indicativos de toxicidad debido a la presencia de igual manera en el grupo control.

Tabla 12

Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta los 30 min después de la administración del Extracto Acuso A. caudatus (EA – Ac) (N=10).

Dosis	Sexo	Ataxia	C. tónicas	C. clónicas	Analgesia	C. pasiva	C. temerosa
S.F.	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5*
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5*	1/5*
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5*	2/5*
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

H: Hembras; M: Machos

* Síntomas presentados a los 30 min

6.1.1.2. Evaluación de parámetros de toxicidad del Extracto acuoso *Amaranthus caudatus* a los 60 min

Se puede observar (Tabla 13) la presencia de síntomas a los 60 min, observando síntomas en conducta pasiva (2 ratones) y conducta temerosa (2 ratones) significativos (*) en comparación al grupo control (solución fisiológica) a dosis de 2000 y 3000 mg/kg.

Tabla 13

Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta los 60 min después de la administración del Extracto Acuso A. caudatus (EA – Ac) (N=10).

Dosis	Sexo	Ataxia	C. tónicas	C. clónicas	Analgesia	C. pasiva	C. temerosa
S.F.	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5*	1/5*
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5*	1/5*
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

H: Hembras; M: Machos

* Síntomas presentados a los 30 min

6.1.1.3. Evaluación de parámetros de toxicidad del Extracto Acuoso *Amaranthus caudatus* a los 120 min, 240 min y 24 horas.

La tabla 14 muestra la ausencia de síntomas indicativos de toxicidad observado en los grupos de tratamiento en ratones hembras y machos a diferentes dosis a los tiempos de 120 min, 240 min y extendiéndose hasta las 24 horas, mostrando en todos los grupos un comportamiento habitual similar no significativo en comparación al grupo control.

Tabla 14

*Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos a los 120 min, 240 min y 24 horas posterior a la administración del Extracto Acuoso *Amaranthus caudatus* (EA – Ac) (N=10).*

Dosis	Sexo	Ataxia	C. tónicas	C. clónicas	Analgesia	C. pasiva	C. temerosa
S.F.	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

H: Hembras; M: Machos

Nota: No presentan síntomas de toxicidad

6.1.2. Extracto: *Lupinus mutabilis* Sweet - sin cascara**6.1.2.1. Evaluación de parámetros de toxicidad hasta los 30 min**

Se puede observar (Tabla 15) la presencia de síntomas durante los primeros 30 min, observando la presencia de conducta pasiva (8 ratones) y conducta temerosa (9 ratones) no significativos en comparación al grupo control (solución fisiológica) a dosis de 2000 y 3000 mg/kg respectivamente, estos síntomas sugieren no ser indicativos de toxicidad debido a la presencia de igual manera en el grupo control.

Tabla 15

*Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta los 30 min posterior a la administración del Extracto Acuso *Lupinus mutabilis* Sweet (EA – Lm) sin cascara (N=10).*

Dosis	Sexo	Ataxia	C. tónicas	C. clónicas	Analgesia	C. pasiva	C. temerosa
S.F.	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5*	0/5
1000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5*	3/5*
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	3/5*	3/5*
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5*	3/5*

H: Hembras; M: Machos

* Síntomas presentados a los 30 min

6.1.2.2. Evaluación de parámetros de toxicidad del Extracto Acuoso *Lupinus mutabilis* Sweet sin cascara a los 60 min

Se puede observar (Tabla 16) la presencia de síntomas a los 60 min, observando síntomas en conducta pasiva (5 ratones) y conducta temerosa (4 ratones) significativos (*) en comparación al grupo control (solución fisiológica) a dosis de 2000 y 3000 mg/kg respectivamente.

Tabla 16

Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta los 60 min posterior a la administración del Extracto Acuoso Lupinus mutabilis Sweet (EA -Lm) sin cascara (N=10).

Dosis	Sexo	Ataxia	C. tónicas	C. clónicas	Analgesia	C. pasiva	C. temerosa
S.F.	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5*	2/5*
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5*	1/5*
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5*	1/5*

H: Hembras; M: Machos

* Síntomas presentados a los 60 min

6.1.2.3. Evaluación de parámetros de toxicidad del Extracto Acuoso *Lupinus mutabilis* Sweet sin cascara a los 120 min, 240 min y 24 horas.

La tabla 17 muestra la ausencia de síntomas indicativos de toxicidad observado en los grupos de tratamiento en ratones hembras y machos a diferentes dosis a los tiempos de 120 min, 240 min y extendiéndose hasta las 24 horas, mostrando en todos los grupos un comportamiento habitual similar no significativo en comparación al grupo control.

Tabla 17

*Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos a los 120, 240 y 24 horas posterior a la administración del Extracto Acuoso *Lupinus mutabilis* Sweet (EA -Lm) sin cascara (N=10).*

Dosis	Sexo	Ataxia	C. tónicas	C. clónicas	Analgesia	C. pasiva	C. temerosa
S.F.	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

H: Hembras; M: Machos

Nota: No se presentan síntomas de toxicidad

6.1.3. Extracto: *Lupinus mutabilis* Sweet - con cascara

6.1.3.1. Evaluación de parámetros de toxicidad hasta los 30 min

Se puede observar (Tabla 18) la presencia de signos durante los primeros 30 min, se puede evidenciar la presencia de signos (*) significativos en comparación al grupo control como: Ataxia, conducta pasiva, conducta temerosa a dosis de 2000 mg/kg, sin embargo a dosis de 3000 mg/kg los ratones además de los signos mencionados expresaron Convulsiones tónicas, Convulsiones clónicas y en consecuencia la muerte de 4 ratones (2 Hembras; 2 Machos) que evidencia niveles indicativos de toxicidad del EA – Lm con cascara.

Tabla 18

Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta los 30 min posterior a la administración del Extracto Acuoso Lupinus mutabilis Sweet – con cascara (EA –Lm) (N=10).

Dosis	Sexo	Ataxia	C. tónicas	C. clónicas	Analgesia	C. pasiva	C. temerosa
S.F.	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2000 mg/kg	H	1/5*	0/5	0/5	0/5	4/5*	4/5*
	M	1/5*	0/5	0/5	0/5	2/5*	3/5*
3000 mg/kg	H	3/5*	2/5*	2/5*	0/5	4/5*	4/5*
	M	2/5*	2/5*	2/5*	0/5	3/5*	3/5*

H: Hembras; M: Machos

* Signos expresados a los 30 min, generando letalidad en 4 ratones (H: 2; M: 2)

6.1.3.2. Evaluación de parámetros de toxicidad del Extracto Acuoso *Lupinus mutabilis* Sweet con cascara a los 60 min

Se puede observar (Tabla 19) los parámetros del test hipocrático a los 60 min, se puede evidenciar la presencia de signos (*) significativos en comparación al grupo control como: Ataxia, conducta pasiva, conducta temerosa a dosis de 2000 mg/kg, sin embargo a la dosis de 3000 mg/kg además de los signos expresados 1 ratón hembra presentó Convulsiones tónicas, Convulsiones clónicas y en consecuencia su muerte. La letalidad de ratones a dosis de 3000 mg/kg en EA- Lm con cascara a un tiempo de observación de 60 min fue de 5 ratones

Tabla 19

Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta los 60 min después de la administración del Extracto Acuoso Lupinus mutabilis Sweet – con cascara (EA –Lm) (N=10).

Dosis	Sexo	Ataxia	C. tónicas	C. clónicas	Analgesia	C. pasiva	C. temerosa
S.F.	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2000 mg/kg	H	1/5	0/5	0/5	0/5	4/5*	4/5*
	M	1/5	0/5	0/5	0/5	2/5*	3/5*
3000 mg/kg	H	1/2	1/2	1/3*	0/2	2/2*	2/2*
	M	3/3	0/3	0/3	0/3	3/3*	3/3*

H: Hembras; M: Machos

* Síntomas presentados, generando letalidad en 1 ratón (H: 1)
Total letalidad a los 60 min: 5 (H: 3; M: 2).

6.1.3.3. Evaluación de parámetros de toxicidad del Extracto Acuoso *Lupinus mutabilis* Sweet con cascara a los 120 min

Se puede observar (Tabla 20) los signos a los 120 minutos post administración, se puede evidenciar la presencia de signos (*) significativos en comparación al grupo control (solución fisiológica) como: Conducta pasiva y Conducta temerosa en ratones hembras y machos administrados de EA – Lm a dosis de 2000 y 3000 mg/kg.

Tabla 20

Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta los 120 min posterior a la administración del Extracto Acuoso Lupinus mutabilis Sweet – con cascara (EA – Lm) (N=10).

Dosis	Sexo	Ataxia	C. tónicas	C. clónicas	Analgesia	C. pasiva	C. temerosa
S.F.	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2000 mg/kg	H	1/5	0/5	0/5	0/5	2/5*	1/5*
	M	1/5	0/5	0/5	0/5	1/5*	1/5*
3000 mg/kg	H	1/2	1/2	1/2	0/2	1/2*	1/2*
	M	3/3	0/3	0/3	0/3	1/3*	2/3*

H: Hembras; M: Machos

* Síntomas presentados a los 120 min.

6.1.3.4. Evaluación de parámetros de toxicidad del Extracto Acuoso *Lupinus mutabilis* Sweet con cascara a los 240 min

En la Tabla 21 se puede observar los signos a los 240 minutos, se puede evidenciar la presencia de signos (*) significativos en comparación al grupo control (solución fisiológica) como: Conducta pasiva y Conducta temerosa en ratones administrados de EA – Lm con cascara a dosis de 2000 y 3000 mg/kg.

Tabla 21

Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta los 240 min posterior a la administración del Extracto Acuoso Lupinus mutabilis Sweet (EA – Lm) – con cascara (N=10).

Dosis	Sexo	Ataxia	C. tónicas	C. clónicas	Analgesia	C. pasiva	C. temerosa
S.F.	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5*	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5*
3000 mg/kg	H	0/2	0/2	1/2	0/2	1/2*	1/2*
	M	2/3	0/3	0/3	0/3	1/3*	2/3*

H: Hembras; M: Machos

* Síntomas presentados a los 240 min.

6.1.3.4. Evaluación de parámetros de toxicidad del Extracto Acuoso *Lupinus mutabilis* Sweet con cascara a las 24 horas.

La tabla 22 muestra la ausencia de síntomas indicativos de toxicidad observado en los grupos de tratamiento en ratones hembras y machos a diferentes dosis y a un tiempo de observación de 24 horas mostrando en todos los grupos un comportamiento habitual similar no significativo en comparación al grupo control.

Tabla 22

*Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos hasta las 24 horas posterior a la administración del extracto acuso *Lupinus mutabilis* Sweet (EA – Lm) – con cascara (N=10).*

Dosis	Sexo	Ataxia	C. tónicas	C. clónicas	Analgesia	C. pasiva	C. temerosa
S.F.	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2000 mg/kg	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3000 mg/kg	H	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	M	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

H: Hembras; M: Machos

Nota: No se presentan síntomas de toxicidad

6.2. EVALUACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA DL₅₀

6.2.1. Extracto: *Amaranthus caudatus*

La tabla 23 muestra la determinación de la Dosis Letal Media (DL₅₀) del Extracto acuoso de *Amaranthus caudatus* a dosis de 1000, 2000 y 3000 mg/kg, se observó que no existieron anomalías clínicas evidentes a través del test hipocrático, se registró una conducta normal en los animales con respuesta habitual a los estímulos nociceptivos, así como consumo de alimentos y agua como corresponde a su especie, por lo tanto no se observó letalidad en ninguna de las dosis ensayadas.

Tabla 23

*Porcentaje de mortalidad en 24 horas y signos de toxicidad observados en ratones machos y hembras después de la administración oral del Extracto acuoso de *Amaranthus caudatus* (EA – Ac) (N=10).*

Dosis (mg/kg)	Mortalidad (%)	Signos de toxicidad	Animales que mostraron signos de toxicidad	Porcentaje de sobrevivencia
S.F.	0	0	0	100%
1000	0	0	0	100%
2000	0	0	0	100%
3000	0	0	0	100%

DL₅₀: no se presenta mortalidad

6.2.2. Evaluación de la Dosis Letal Media (DL₅₀) del extracto *Lupinus mutabilis* Sweet – Sin cascara

En la siguiente tabla se puede observar la evaluación de la Dosis Letal Media (DL₅₀) del Extracto acuoso de *Lupinus mutabilis* Sweet – Sin cascara a dosis de 1000, 2000 y 3000 mg/kg, no se observó anomalías clínicas evidentes a través del test hipocrático, se registró una conducta normal en los animales con respuesta habitual a los estímulos nociceptivos, así como consumo de alimentos y agua como corresponde a su especie, por lo tanto no se observó letalidad en ninguna de las dosis ensayadas.

Tabla 24

*Porcentaje de mortalidad en 24 horas y signos de toxicidad observados en ratones machos y hembras después de la administración oral del Extracto Acuoso de *Lupinus mutabilis* Sweet (EA – Lm) Sin cascara (N=10).*

Dosis (mg/kg)	Mortalidad (%)	Signos de toxicidad	Animales que mostraron signos de toxicidad	Porcentaje de sobrevivencia
S.F.	0	0	0	100%
1000	0	0	0	100%
2000	0	0	0	100%
3000	0	0	0	100%

DL₅₀: no mortalidad

6.2.3. Evaluación de la Dosis Letal Media (DL₅₀) del extracto *Lupinus mutabilis* Sweet – con cascara

En la tabla 25 se puede muestra la evaluación de la Dosis Letal Media (DL₅₀) del Extracto acuoso del *Lupinus mutabilis* Sweet – con cascara. Se pudo observar que a dosis de 1000 y 2000 mg/kg no se observó letalidad en ninguno de los animales tratados, sin embargo a dosis de 3000 mg/kg y a partir de los 30 min y hasta los 60 min de observación los ratones expresaron signos de convulsiones tónico-clónicas que llevaron a la muerte de 5 animales de experimentación (3 ratones hembras y 2 ratones machos), logrando determinar de esta manera la DL₅₀ que corresponde a 3000 mg/kg para el Extracto Acuoso *Lupinus mutabilis* Sweet – con cascara.

Tabla 25

*Porcentaje de mortalidad en 24 horas y signos de toxicidad observados en ratones machos y hembras después de la administración oral del Extracto acuoso de *Lupinus mutabilis* Sweet (EA – Lm) con cascara (N=10).*

Dosis (mg/kg)	Mortalidad (%)	Signos de toxicidad	Animales que mostraron signos de toxicidad	Porcentaje de sobrevivencia
S.F.	0	0	0	100%
1000	0	0	0	100%
2000	0	2	1	100%
3000	50	5	6	50%

DL₅₀: 3000 mg/kg

6.3 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA A DOSIS CONTINUAS

6.3.1 Determinación de parámetros toxicológicos a dosis continuas de 1000 mg/kg de extractos acuosos de *Lupinus mutabilis* Sweet (EA-Lm) – sin cascara y *Amaranthus caudatus* (EA – Ac) al día 1 post administración.

La evaluación de parámetros toxicológicos (Tabla 26) al día 1 posterior a la administración de los Extractos acuso de *Lupinus mutabilis* Sweet – sin cascara y el Extracto acuoso de *Amaranthus caudatus* generan un comportamiento pasivo y temeroso generado en una mínima cantidad de animales, siendo esta casi inapreciable al igual que el grupo control (solución fisiológica) tanto en ratones hembras y machos.

Tabla 26

Efectos sobre el comportamiento general en ratones al día 1 post administración oral de Solución Fisiológica (NaCl 0.9%) y los extractos acuosos de EA-Lm – sin

Dosis	Sexo	Ataxia	C. tónicas	C. clónicas	Analgesia	C. pasiva	C. temerosa
S. F.	H	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5*	1/5*
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5*	0/5
1000 m/kg EA – Lm	H	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5*	2/5*
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5*	0/5
1000 m/kg EA – Ac	H	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5*	1/5*
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5*	0/5

cascara y EA – Ac (N=10).

H: Hembras; M: Machos

Nota: No se presentan síntomas de toxicidad

* Síntomas presentados al primer día post administración; N =10

6.3.3 Determinación de parámetros toxicológicos a dosis continuas de 1000 mg/kg de extractos acuosos de *Lupinus mutabilis* Sweet (EA-Lm) sin cascara y *Amaranthus caudatus* (EA – Ac) a los días 7 y 14 días post administración.

La Tabla 27 muestra la evaluación de la toxicidad a dosis continua de los EA – Lm y EA – Ac a dosis de 1000 mg/kg a los tiempos de 7 y 14 días respectivamente, se pudo ver la ausencia de signos significativos indicativos de toxicidad a partir del día 7 y en el transcurso hasta el día 14 en comparación al grupo control (solución fisiológica).

Tabla 27

*Efectos sobre el comportamiento general en ratones hembras y machos a los 7 y 14 días post administración oral de los extractos acuosos de *Lupinus mutabilis* Sweet (EA-Lm) – sin cascara y *Amaranthus caudatus* (EA – Ac) (N=10).*

Dosis	Sexo	Ataxia	C. tónicas	C. clónicas	Analgesia	C. pasiva	C. temerosa
S. F.	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1000 m/kg EA – Lm	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1000 m/kg EA – Ac	H	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

H: Hembras; M: Machos

Nota: No se presentan signos de toxicidad

6.3.3 Comportamiento del peso corporal en la toxicidad aguda a dosis continuas de 1000 mg/kg de los extractos de *Lupinus mutabilis* Sweet – sin cascara y *Amaranthus caudatus*

En la presente tabla se observa la evaluación del peso corporal de ratones a los días 1, 7 y 14 días post administración de: grupo control (solución fisiológica), Extracto Acuoso *Lupinus mutabilis* Sweet – sin cascara y Extracto Acuosos *Amaranthus caudatus* a dosis de 1000 mg/kg, se puede observar que no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) evaluado a través del test de Dunnet (Bilateral) en ninguno de los grupos tratados y a diferentes tiempos estudiados en variables de peso vivo con relación al grupo control.

Tabla 28

*Tabla comparativa del comportamiento del peso corporal (g) a los 1, 7 y 14 días de ratones, tratados con Solución Fisiológica, Extracto Acuoso *Lupinus mutabilis* Sweet (EA – Lm) – sin cascara y Extracto Acuoso *Amaranthus caudatus* (EA-Ac) a dosis de 1000 mg/kg., (N=10).*

	Control (S. Fisiológica)	EA-Lm (1000 mg/kg)	EA-Ac (1000 mg/kg)
Peso corporal ± SEM			
Hembras			
1° día	21,92 ± 0,67	21,04 ± 0,46	21,54 ± 0,91
7° día	25,18 ± 0,96	24,42 ± 0,68	23,54 ± 0,73
14 día	26,30 ± 1,52	24,96 ± 0,29	24,16 ± 1,21
Machos			
1° día	21,28 ± 0,46	21,52 ± 0,56	21,62 ± 1,05
7° día	25,54 ± 1,14	24,96 ± 0,92	24,64 ± 2,08
14 día	28,12 ± 0,59	27,56 ± 1,09	27,92 ± 1,58

Cada valor representa la media + S.E.M., N=10.

6.3.4 Comportamiento del peso de órganos internos en la toxicidad aguda a dosis continuas de 1000 mg/kg de los extractos de *Lupinus mutabilis* Sweet – sin cascara y *Amaranthus caudatus*

En la tabla 29 se puede observar el peso de órganos internos de ratones hembras y machos posterior a la culminación del ensayo de toxicidad aguda a dosis continua a los 14 días, se puede identificar que existe variaciones de peso significativos ($P < 0,05$) en comparación al grupo control (solución fisiológica) de hígado. Sin embargo no ha mostrado toxicidad evidente a nivel de los signos clínicos característicos de un efecto toxico evaluado durante su desarrollo.

Tabla 29

Peso de órganos (g) a 14 días en ratones hembras, machos, control y tratados con EA – Lm y EA - Ac a dosis de 1000mg/kg.

	Control (Sol Fisiológica)	EA -Lm (1000mg/kg)	EA - Ac (1000mg/kg)
Hembras			
Corazón	0,13±0,15	0,13±0,02	0,12±0,02
Intestino	3,34±0,51	3,67±0,29	3,56±0,30
Pulmón	0,23±0,06	0,24±0,02	0,23±0,02
Bazo	0,23±0,02	0,24±0,30	0,23±0,30
Estomago	0,25±0,02	0,24±0,05	0,29±0,04
Riñones	0,34±0,03	0,36±0,02	0,35±0,02
Hígado	1,48±0,16	1,71±0,14*	1,49±0,13
Machos			
Corazón	0,15±0,03	0,17±0,01	0,16±0,01
Intestino	3,56±0,28	3,66±0,56	3,63±0,55
Pulmón	0,25±0,03	0,25±0,01	0,26±0,11
Bazo	0,17±0,23	0,18±0,25	0,18±0,25
Estomago	0,49±0,06	0,42±0,08	0,42±0,08
Riñones	0,47±0,01	0,49±0,03	0,49±0,03
Hígado	1,44±0,02	1,45±0,17	1,40±0,15

Cada valor representa la media + S.E.M., N=10.

* $P < 0,05$

6.4. DETERMINACIÓN DE ENZIMAS MARCADORES DE TOXICIDAD

6.4.1. Determinación de AST y ALT en animales posterior al tratamiento de *Lupinus mutabilis* Sweet (EA – Lm) sin cascara y *Amaranthus caudatus* (EA Ac) dosis continua de 1000 mg/kg

La tabla 30 muestra la determinación de las transaminasas, se puede observar que en ratones tratados con EA- Ac la determinación de transaminasas no ha presentado diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en relación al grupo control (solución fisiológica), así como no presentó manifestaciones clínicas indicativas de toxicidad durante el tiempo que duro el ensayo. Sin embargo en la determinación de transaminasas en ratones tratados con EA-Lm sin cascara presentan un incremento significativo ($p < 0,05$) en los niveles de TGO y TGP respectivamente en comparación al grupo control (Sol. Fisiológica) no presentando manifestaciones clínicas indicativas de toxicidad.

Tabla 30

Determinación bioquímica de transaminasas (AST/ALT) en ratones albinos post administración de los E- Lm y EA - Ac a dosis de 1000 mg/kg.

Parámetros	Grupo Control (Sol. Fisiológica)		EA – Lm (1000 mg/kg)		EA – Ac (1000 mg/kg)	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
AST	35,8 ± 9,2	59 ± 1,4	75,4 ± 24*	66,4 ± 9,2	55,2 ± 8,8	59,6 ± 11
ALT	39,8 ± 15,2	53,4 ± 6,6	64,2 ± 9,2*	58,4 ± 12	43,5 ± 8,2	49,8 ± 7,4

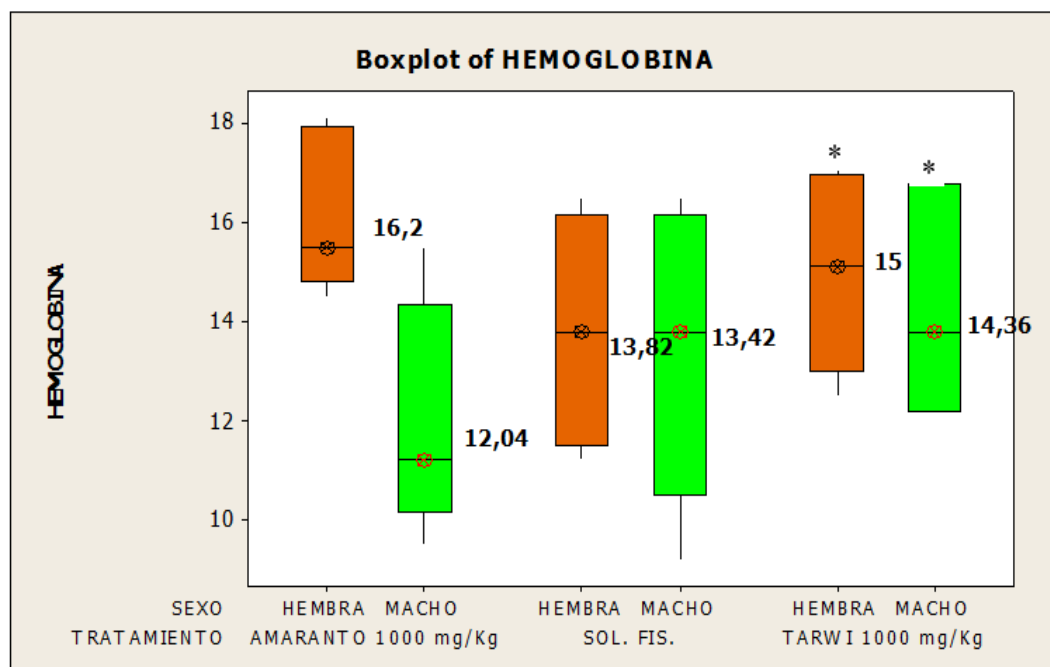
Cada valor representa la media + S.E.M., N=10

* $P < 0,05$

6.5 DETERMINACION DE PARAMETROS HEMATOLOGICOS EN RATONES A LOS 14 DIAS POSTERIOR AL TRATAMIENTO DE *Lupinus mutabilis* Sweet – sin cascara y *Amaranthus caudatus*.

6.5.1. Determinación de la hemoglobina

La figura 16 muestra la determinación de la hemoglobina en ratones una vez concluido el ensayo a los 14 días post administración en los diferentes grupos de tratamiento, se pudo observar que el Extracto acuoso de *Lupinus mutabilis* Sweet sin cascara (Tarwi) incremento estadísticamente significativas ($P < 0,05$) los niveles de hemoglobina en ratones hembras y machos con relación al grupo control (solución fisiológica).



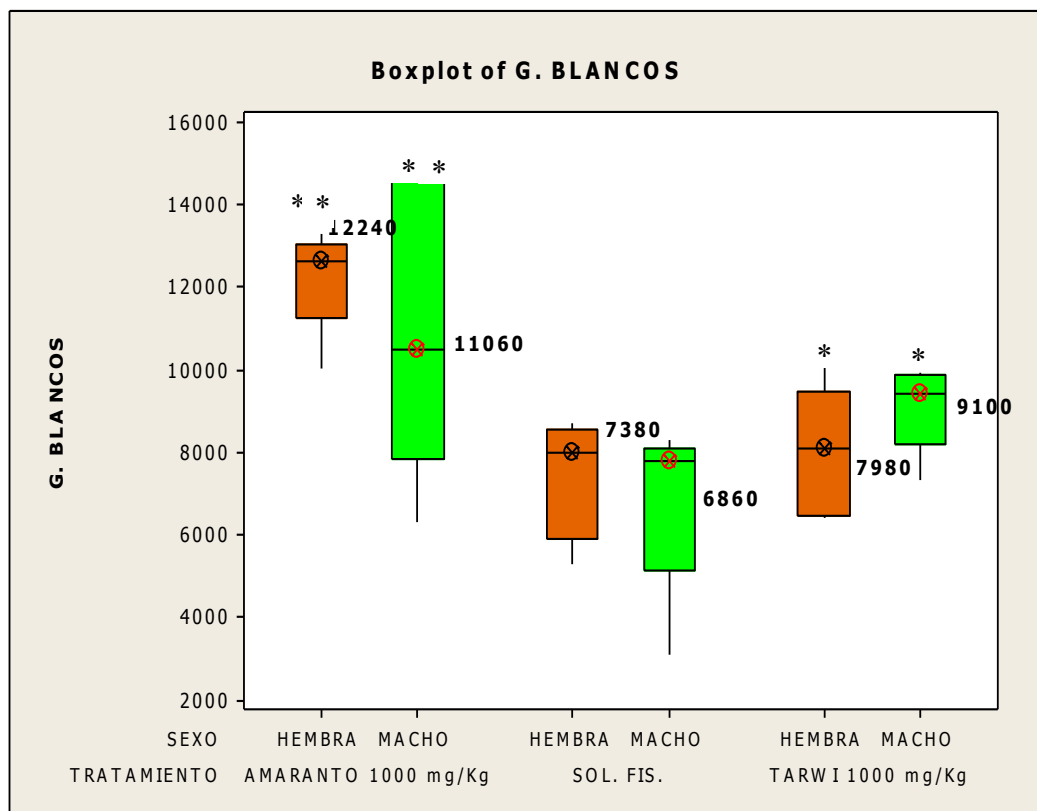
Cada valor representa la media + S.E.M., N=10

* $P < 0,05$

Figura 16. Determinación de niveles de Hemoglobina en ratones hembras y machos de Amarantho, Solución fisiológica y Tarwi una vez concluido el ensayo de toxicidad aguda a dosis continua de 1000 mg/kg.

6.5.2. Recuento de Leucocitos

En la figura 17 expone la evaluación en el recuento de leucocitos en los diferentes grupos de tratamiento, se puede observar un incremento en el recuento de leucocitos con niveles de significancia ** $P < 0.001$ y * $P < 0.05$ para los EA – Lm y EA – Ac respectivamente en comparación al grupo control (Sol. Fisiológica).



Cada valor representa la media + S.E.M., N=10

* $P < 0.05$

** $P < 0.001$

Figura 17. Determinación de Leucocitos en ratones hembras y machos de Amaranto, Solución fisiológica y Tarwi una vez concluido el ensayo de toxicidad aguda a dosis continua de 1000 mg/kg.

6.5.3. Comportamiento de parámetros hematológicos complementarios

La tabla 31 expresa la evaluación completa de parámetros hematológicos en ratones post administración de los diferentes tratamiento, donde se puede observar incremento estadísticamente significativos $P < 0.05$ y $P < 0.01$ con relación a la determinación de la hemoglobina y recuento de glóbulos blancos tal como se muestra y se detalla en la figura 16 y 17 respectivamente. En el conteo diferencial de leucocitos se observó el predominio de dos tipos de células, segmentados y linfocitos, además de eosinófilos y monocitos en menor porcentaje, el análisis estadístico muestra niveles de significancia ($P < 0.01$) para células tipo neutrófilos en comparación al recuento diferencial del grupo control (solución fisiológica).

Tabla 31

Comportamiento de parámetros hematológicos (Media \pm S) en Ratones albinos Swiss luego de la administración oral de Extracto Acuoso Lupinus mutabilis (EA-Lm) y Extracto Acuoso Amaranthus caudatus (EA-Ac) a dosis de 1000 mg/kg., (N=10).

Parámetros	Grupo Control (Sol. Fisiológica)		EA – Lm (1000 mg/kg)		EA – Ac (1000 mg/kg)	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Hb (g/dL)	13,82 \pm 2,3	13,4 \pm 2,9	15 \pm 2,03*	14,3 \pm 2,3*	16,2 \pm 1,6	12,04 \pm 2,3
Leu($\times 10^9$ cel/L)	7,30 \pm 1,4	6,86 \pm 2,13	7,9 \pm 1,5*	9,1 \pm 1,0*	12,2 \pm 12,8**	11,0 \pm 3,5**
Linfocitos (%)	46,4 \pm 10	31 \pm 15	59,8 \pm 8,7*	51 \pm 7,2*	46,4 \pm 9,12	56,8 \pm 9,2*
Neutrófilos (%)	52 \pm 12	68 \pm 14	39,4 \pm 9,7*	47,4 \pm 8,7**	52,6 \pm 9,8	42 \pm 8,5*
Monocitos (%)	2,33 \pm 1,52	1,3 \pm 0,57	2 \pm 1,4	3 \pm 1,4	1,6 \pm 1,15	1,3 \pm 0,57
Eosinófilos (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Basófilo (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Cada valor representa la media + S.E.M., N=10 (ANOVA de un factor).

* $P < 0,05$ ** $P < 0,001$

7. DISCUSIONES

DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA A DOSIS UNICAS DE 1000, 2000 y 3000 mg/kg

- La determinación de la toxicidad aguda a dosis únicas de los Extractos Acuósos de *Amaranthus caudatus* (Tabla 12) y *Lupinus mutabilis* Sweet - sin cascara, (Tabla 13) no mostraron signos indicativos de toxicidad, sin embargo durante el transcurso y hasta los 120 min ambos grupos de tratamiento se observó la presencia de signos en conducta pasiva y temerosa debido posiblemente al estrés generado durante la manipulación de los roedores al momento de realizar la administración, los cuales no son significativos debido a la presencia de igual manera en el grupo control.
- La determinación de la toxicidad aguda del Extracto acuoso del *Lupinus mutabilis* Sweet – con cascara (Tabla 18) a dosis de 1000 y 2000 mg/kg no se observó letalidad en ninguno de los animales tratados, Sin embargo a dosis de 3000 mg/kg y en los primeros 30 min de observación los ratones expresaron ataxia y convulsiones tónico-clónicas que llevaron a la muerte de los animales de experimentación. Según parámetros del test hipocrático sugiere que el EA – Lm tiene un efecto depresor sobre el SNC a dosis de 3000 mg/kg. Según Camacho (1995) y Dias (1999) la toxicidad de *Lupinus mutabilis* Sweet con cascara se debe a la presencia de alto contenido de alcaloides tóxicos como la Lupanina, tetrahidrorombifolina, 4-hidroxilupanina, esparteína y 13-hidroxilupanina que generan las convulsiones además de tener acción paralizante del SNC, especialmente sobre el centro respiratorio y vasomotor produciendo la muerte por asfixia asociada.

DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀)

- El estudio de toxicidad aguda de los extractos Acuoso de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) – sin cascara y *Amaranthus caudatus* (Amaranto) se pudo evidenciar que a dosis de 1000, 2000 y 3000 mg/kg No genera signos indicativos de toxicidad y en consecuencia la muerte de los animales tratados, lo que sugiere que la Dosis Letal Media (DL₅₀) para dichos extractos se encuentran encima de los 3000 mg/kg.
- A través del siguiente estudio se pudo determinar la Dosis Letal Media (DL₅₀) de *Lupinus mutabilis* Sweet con cascara el cual se determinó y corresponde a la dosis de 3000 mg/kg, dosis la cual generó la letalidad de 5 ratones (3 hembras y dos machos) que corresponde al 50 por ciento de los animales en estudio, dosis similar encontrado por Castañeda (2002) para *Lupinus mutabilis* Sweet determinando la DL₅₀ en ratas de 3500 mg/kg, cabe mencionar que los resultados obtenidos de este test varían significativamente debido a diferentes variables fisiológicas y condiciones de tratamiento (Repetto., 1995). En ese sentido y de acuerdo a la tabla de William publicada en CYTED 1995 y según las normas de la comunidad Europea (Unión Europea., 2000) para la clasificación de la toxicidad aguda oral, el Extracto Acuoso de *Lupinus mutabilis* Sweet con cascara se considera como: Ligeramente Tóxico a dosis ≤ 5000 mg/kg.

DETERMINACION DE LA TOXICIDAD AGUDA A DOSIS CONTINUA A
DOSIS DE 1000 mg/kg

- La evaluación de la toxicidad aguda a dosis continua de 1000 mg/kg de los Extractos acuosos de *Lupinus mutabilis* Sweet sin cascara (Tarwi) y *Amaranthus caudatus* (Amaranto) evaluados según la metodología de CYTED y la OECD se puede notar que no se observaron cambios que evidenciaran alteración del SNC, o de algún otro parámetro fisiológico en los animales de experimentación, sin embargo durante los primeros 30 minutos se pudo observar comportamientos de agresividad, conducta pasiva y conducta temerosa debido probablemente al estrés generado en la manipulación y administración del extracto, es importante resaltar que en los roedores el comportamiento depende de los factores sensoriales táctiles y la capacidad de responder ante un estímulo generado (Polanco L., 2011) los cuales serían los responsables de dicho comportamiento. Posterior a aquello y durante las observaciones realizadas durante los 14 días para la observación de los diferentes signos clínicos no mostraron signos clínicos significativos e indicativos de toxicidad desarrollando un comportamiento habitual similar al grupo control.
- El comportamiento de peso corporal es uno de los parámetros demostrativos e indicadores de posibles trastornos orgánicos en los estudios de toxicidad aguda esto es debido a que normalmente después de la administración de sustancias tóxicas se produce pérdida de peso en relación al grado de toxicidad. Esto es consecuencia de la movilización de las reservas energéticas de un individuo para

enfrentar la actividad metabólica incrementada que acompaña los procesos de detoxificación (Infante., 1998). Sin embargo la toxicidad aguda a dosis continua a los 14 días de los Extractos acuosos de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) y *Amaranthus caudatus* (Amaranto) a dosis de 1000 mg/kg, no se observaron variaciones estadísticamente significativas ($P < 0.005$) en variables de peso vivo con relación al grupo control (solución fisiológica) evaluados a los días 1, 7 y 14 (Tabla 31), donde la ganancia de peso se comportó dentro de los parámetros establecidos del modelo biológico, que coincide con el estudio realizado en ratas por Castañeta y col., 2007.

- El objetivo de realizar la necropsia y realizar el peso de los órganos internos según Sevilleja (2007) es para determinar la presencia de daños toxicológicos en órganos internos los cuales deben presentar cambios en el tamaño, la forma, la superficie, el color y la consistencia. También deben existir cambios significativos en el peso de órganos de órganos. Los resultados en esta investigación no muestran cambios macroscópicos observables de los órganos examinados los cuales no sugieren toxicidad debido a la ausencia de signos clínicos evidentes indicativos de toxicidad, sin embargo se sugiere a partir del presente estudio realizar estudios histológicos complementarios para determinar su causalidad. En ese sentido en base a la tabla de William publicada en CYTED 1995 y según las normas de la comunidad Europea (Unión Europea., 2000) para la clasificación de la toxicidad aguda oral, el Extracto Acuoso de *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi) - sin cascara y *Amaranthus caudatus* (amaranto) a dosis únicas de 1000 mg/kg se considera como: No Toxico.

DETERMINACIÓN DE ENZIMAS MARCADORES DE TOXICIDAD

La evaluación de la influencia de la toxicidad aguda a dosis continúa en ratones administrados con extractos acuosos *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi)- sin cascara y *Amaranthus caudatus* (Amaranto) sobre el análisis químico de transaminasas muestra los siguientes análisis:

- La determinación de las transaminasas (AST/ALT) post tratamiento en ratones tratados con *Lupinus mutabilis* Sweet a dosis 1000 mg/kg muestra un incremento en su determinación, significativo ($P < 0.01$) en comparación al grupo control (solución fisiológica), incremento que posiblemente se atribuye a los alcaloides presentes en *Lupinus mutabilis* Sweet como la Lupanina, Esparteína, 4-hidroxi-lupanina, Metilangustifolina, Isolupanina y 13-hidroxi-lupanina (INIAP-ESPOCH-SENACYT, 2008; Castañeda y col., 2002).
- La determinación de las transaminasas (AST/ALT) para *Amaranthus caudatus* (amaranto) a dosis de 1000 mg/kg (Tabla N° 39) no ha mostrado niveles de significancia en relación al grupo control (solución fisiológica) no mostrando manifestaciones clínicas indicativas de toxicidad durante el tiempo que duro el ensayo, por lo que es posible predecir que este extracto no induce daños asociados a lesiones en sistemas de órganos a nivel hepático, que traen por resultado alteraciones en sus funciones.

DETERMINACION DE PARAMETROS HEMATOLOGICOS

La evaluación de los parámetros hematológicos se tiene las siguientes observaciones:

- Con respecto a la hemoglobina en ratones se pudo observar que hubo un incremento estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para el grupos tratado con *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi) – sin cascara (Tabla 40). El incremento de la hemoglobina se encuentra directamente relacionados con alimentación de macronutrientes (proteínas lípidos y azucares) y el alto contenido de micronutriente como el hierro 2.3 mg/100 g en *Lupinus mutabilis* Sweet (CYTED., 1995.) entre otros componentes presentes, los cuales favorecen la hematopoyesis logrando el incremento de los niveles de hemoglobina.
- La determinación de leucocitos presentes en ratones hembras y machos como influencia de la administración de los extractos acuoso de *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi) y *Amaranthus caudatus* (amaranto) con respecto al grupo control muestra niveles estadísticamente significativos $P < 0.05$ y $P < 0.01$ respectivamente con respecto al grupo control, tal como se muestra en la Tabla N° 40. Estudios realizados por Álvarez., 2005; identificaron que el incremento de leucocitos en ratones está relacionado principalmente con el alto contenido de flavonoides, saponinas y alcaloides. Así mismo el análisis fitoquímico realizado por Villacres y col., 2013, menciona que la presencia de flavonoides se encuentran en cantidades abundantes en extractos alcohólicos y acuosos en especies de *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi) y *Amaranthus caudatus* y dato que explicaría el incremento de leucocitos que tendrían actividad inmunoestimulador en el bioensayo, aunque no se descarta la presencia de otros metabolitos.

- En el conteo diferencial de leucocitos en muestras sanguíneas provenientes de ratones post tratamiento de los extractos, se observó el predominio de dos tipos de células, segmentados y linfocitos, además de eosinófilos y monocitos en menor porcentaje, dado el análisis diferencial de leucocitos de muestras provenientes de ratones hembras y machos se observa que el grupo tratado con *Amaranthus caudatus* en comparación con el grupo control (solución fisiológica) muestran datos estadísticamente significativas ($P < 0.01$) para células tipo neutrófilos.
- El análisis y recuento diferencial de leucocitos del grupo tratado con *Lupinus mutabilis* Sweet y *Amaranthus caudatus* en comparación al grupo control (S.F.) mostró niveles de significancia ($P < 0.05$) para células tipo linfocitos, diferencia que posiblemente se atribuye a condiciones fisiológicas y factores externos, sin embargo esto no implica un significado clínico evidente a través de los signos y síntomas mostrados durante el desarrollo del ensayo más al contrario pueda deberse a la actividad inmunoestimulador presente en los extractos utilizados.
- La evaluación sobre las células tipo monocitos, no mostraron cambios estadísticamente significativos ($P > 0.05$) en comparación al grupo control así mismo es bueno mencionar que tanto células de tipo eosinófilos y basófilos no fueron tabulados debido a la ausencia en placas de lecturas. El resultado de la exposición a un compuesto químico, generalmente produce alteraciones bioquímicas e incluye modificaciones en la composición celular sanguínea (Macebo y col., 2002).

Por lo tanto se puede considerar que los indicadores hematológicos para este ensayo mostraron cambios en relación al hematocrito, hemoglobina, leucocitos y el incremento de células tipo linfocitos, lo cual indica que el tratamiento ejercido con la administración de los extractos acuosos de *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi) – sin cascara y *Amaranthus caudatus* (amaranto) en la toxicidad aguda a dosis únicas generó cambios en los componentes celulares básicos que contiene la sangre significativos ($P < 0.05$) en relación al grupo control (solución fisiológica), resultados que no fueron sujetos a comparación con valores de referencia obtenidos en estudios realizados en otros países ya que estos difieren con las condiciones de altura entre otros en los cuales fueron desarrollados este ensayo.

8. CONCLUSIONES

- La evaluación de la toxicidad aguda en ratones albinos Swiss a dosis únicas de los Extractos acuosos de *Amaranthus caudatus* y *Lupinus mutabilis* Sweet – sin cascara no provocan mortalidad ni signos y síntomas indicativos de efecto tóxicos a dosis de 1000, 2000 y 3000 mg/kg. En ese sentido en base a la tabla de William publicada en CYTED 1995 y según las normas de la comunidad Europea (Unión Europea., 2000) para la clasificación de la toxicidad aguda oral, el Extracto Acuoso de *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi) – sin cascara y *Amaranthus caudatus* (amaranto) se considera como: No Tóxico.
- La evaluación de la toxicidad aguda en ratones albinos Swiss a dosis únicas de los Extractos acuosos de *Amaranthus caudatus* y *Lupinus mutabilis* Sweet – con cascara a dosis de 1000 y 2000 mg/kg no provocan mortalidad ni signos y síntomas indicativos de efecto tóxicos, sin embargo a dosis de 3000 mg/kg presenta signos indicativos de toxicidad y letalidad.
- La determinación de la toxicidad aguda a través de la Dosis Letal Media (DL₅₀) del Extracto acuoso de *Amaranthus caudatus* y *Lupinus mutabilis* Sweet – Sin cascara, no se observó letalidad en ninguna de las dosis ensayadas (1000, 2000 y 3000 mg/kg). Por lo tanto se concluye que la Dosis Letal media (DL₅₀) podría presentarse sólo a dosis superiores de 3000 mg/kg vía oral, calificándose éstos, según el Sistema Global Armonizado, como “No clasificadas” (“No tóxicas”).

- Se determinó la Dosis Letal Media (DL₅₀) del Extracto acuoso del *Lupinus mutabilis* Sweet - con cascara que corresponde a la dosis de 3000 mg/kg el cual genero la muerte del 50% de los animales tratados. Según la tabla de William publicada en CYTED 1995 y según las normas de la comunidad Europea para la clasificación de la toxicidad aguda oral, el Extracto Acuoso de *Lupinus mutabilis* Sweet – con cascara se considera como: Ligeramente Toxico a dosis ≤ 5000 mg/kg.

La evaluación de la toxicidad aguda a dosis continuas de 1000 mg/kg de los Extractos acuosos de *Lupinus mutabilis* Sweet y *Amaranthus caudatus* y la influencia sobre parámetros bioquímicos y hematológicos muestran los siguientes resultados:

- El comportamiento de peso corporal en ratones albinos Swis hembras y machos administrados sujetos a la administración de los Extractos acuosos de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) y *Amaranthus caudatus* (amaranto) a dosis de 1000 mg/kg, no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.005$) en comparación al grupo control (solución fisiológica), donde la ganancia de peso se comportó dentro de los parámetros establecidos del modelo biológico.
- La influencia sobre parámetros hematológicos, con respecto a la hemoglobina se pudo observar que hubo un incremento estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para el grupos tratado con *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi) – sin cascara con relación al grupo control (solución fisiológica). Así mismo se pudo determinar un incremento de leucocitos estadísticamente significativo

($P < 0.05$) y ($P < 0.01$) para *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi) y *Amaranthus caudatus* (amaranto) respectivamente en comparación al grupo control.

- En el conteo diferencial de leucocitos determinó el predominio de dos tipos de células: segmentados y linfocitos. Se ha podido determinar que el grupo tratado con *Amaranthus caudatus* en comparación con el grupo control (solución fisiológica.) muestran datos estadísticamente significativas ($P < 0.01$) para células tipo neutrófilos y significancias de ($P < 0.05$) para células tipo linfocitos en ambos grupos de tratamiento.
- La evaluación de la toxicidad aguda de *Amaranthus caudatus* a dosis continuas (1000 mg/kg) no generó niveles de significancia sobre las enzimas marcadores de toxicidad (TGO/TGP) en relación al grupo control (solución fisiológica) no mostrando manifestaciones clínicas indicativas de toxicidad durante el tiempo que duro el ensayo.
- La influencia de la toxicidad aguda a dosis continuas (1000 mg/kg) de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) - sin cascara, sobre las enzimas marcadores de toxicidad (AST/ALT) ha expresado un incremento estadísticamente significativo en los valores en comparación al grupo control ($p < 0,05$), sin embargo el incremento no expreso una alteración en el comportamiento evaluado a través del test hipocrático.

9. BIBLIOGRAFIA

ÁLVAREZ, H. 2005. El paciente con hipertransaminemia. Rev. Fac. Med. UNAM. 48: 58 – 65

ARTECHE, A., GÜENECHÉ J., URIARTE, C., VANACLOTXA, B., Fitoterapia. Vademecum de prescripción plantas medicinales. 2ª ed. Asociación Española de Médicos Naturistas. Colegio Oficial de Médicos de Vizcaya. Publicaciones y Documentación; 1994

ARCHER, R., FESTING, M., RILEY, J. 1982. Hematology of conventionally maintained Lac: Pouthbred Wistar rats during the 1st year of life. Lab Anim16: 198 – 200p

BECERRA, R., Amaranto: nuestro alimento del futuro, disponible en <http://www.redtinku.com/documentos/cd-yy01tbz/informacion%20amaranto.doc>

BRANCH, L., DA SILVA, M., 1983. Fol. Medicene of Alter do Chao, Brazil. *Acta Amazónica*. Manaus. 13: 737-797.

Bressani, R. 1989. The proteins of grain amaranth. *Foods Reviews International*. 51: 1338.

BUTLER, W., CREASY, D. 1996. A90-day feeding study of lupin (*Lupinus angustifolius*) flour spiked whith lupin alkaloids in the rat. *Food and chemical toxicology* 34: 531-536.

BOURRE, J. 1991. De la dietética al placer. Madrid: Mondadori

BUTLER, W., CREASY, D. 1996. A90-day feeding study of lupin (*Lupinus angustifolius*) flour spiked with lupin alkaloids in the rat. Food and chemical toxicology 34: 531-536.

BURTIS, A., ASHWOOD, R. 1994. Tietz Textbook of clinical Chemistry, 2edition, sp.

BULL, B., FUJIMOTO, K., HOUWEN, B., KLEE, G., VAN, L., VAN ASSENDELTF, O. 2003. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for "surrogate reference" method for the packed cell volume. Lab Hematol 1: 1-100p.

CAMPANA, A. 1988. Efecto del Hervido y del Lavado, Sobre el Peso, Volumen y Contenido de Alcaloides en el Grano de Tarwi. Trabajo presentado en el III Congreso Internacional de Cultivos Andinos. La Paz: IICA: 303-305.

CARRILLO, C., CAVIA, M. AND ALONSO-TORRE, S.R. 2012. Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action. A review Nutrición Hospitalaria 27(5): 1860-1865.

CASTAÑEDA, 1988 " Estudio Comparativo de 10 variedades de Tarwi" (*Lupinus mutabilis* Sweet) Conducidos en dos Ambientes de la Sierra, Norte y Centro del Perú. Tesis Ing. Agrónomo. Lima-Perú: UNALM. 196 p.

CASTAÑEDA, B., MANRIQUE., R., GAMARRA, F., MUÑOZ, A., RAMOS, F., LIZARASO, F. 2008. Probiótico elaborado en base a las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (chocho or tarwi) seeds. Acta Médica Peruana 25: 210-215

CASTAÑEDA, B., MANRIQUE., R., GAMARRA, F., MUÑOZ, A., RAMOS, F., LIZARASO, F. 2012. Evaluacion del efecto antiinflamatorio del Extracto Acuoso de las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi, Chocho), en animales de Experimentación.

CASTELL, J. y GOMEZ, M. 1997. Fármacos y hepatotoxicidad: Mecanismos moleculares de la hepatotoxicidad por fármacos. Monografía de la Real Academia de Farmacia. Vol. IV, p. 45 – 68.

CHARAGAY, A. 2005. Estudio de Factibilidad del Cultivo del Amaranto. Dirección Provincial de Programación del Desarrollo Ministerio de Producción y Desarrollo Gobierno de la Provincia de Catamarca, Argentina, p. 3

COLLAZOS, C.P.L White, H.S. White et al, 1975 “La Composición de los alimentos peruanos” Instituto de Nutrición-Ministerio de Salud.

CYTED, 1995 Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. "Manual de Técnicas de Investigación; pago 140-141p

CYTED, 1996. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo RED X.C. Red Iberoamericana de productos Fitofarmaceúticos (RIPROFITO) la REUNION DE COORDINACIÓN INTERNACIONAL, Antigua Guatemala.

CYTED, 1995. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. "Manual de Técnicas de Investigación; pago 140-141.

COLES, E. 1986. Veterinary clinical pathology. 4th. Ed., Saunders Company Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Rio de Janeiro, Sydney, Tokyo, Hon Kong. S/p.

DAS, L., BHAUMIK, E., RAYCHAUDHURI, U., CHAKRABORTY, R. 2012. Role of nutraceuticals in human health. *J Food Sci Technol*; 49 (2): 173 – 83.

DIPASCUALE, L. y WALLACE, H. 2001. Acute toxicity and eye irritancy. In: *Principles and methods of toxicology*. Philadelphia, Taylor and Francis. 4a: 853 – 917

DEODELSY, B. 2007. Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo (Evaluation of acute toxicity of extracts of medicinal plants by an alternative testing)

E LJP. Bioquímica. 2009. *Manual moderno de Bioquímica*. Mexico, DF. 549: 116 – 119

FLOREZ, J., *Farmacología Humana.*, México D.F - México., 2003: 204-205.

FRIEDMAN y YOUNG. 1997. *Effects of disease on clinical laboratory tests*, 3ra ed. Sp.

FEINE, L. 1979. An ethnobotanical observation and collection of grain in amaranth in Mexico. In: *Proceedings of the Second Amaranth Conference*. Rodale Press. Inc. Emmaus PA: 111- 116p.

GÁLVEZ, L., GENOVESE, M., LAJOLO, F. 2009. Isoflavones and antioxidant capacity of Peruvian and Brazilian lupin cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 397-404

GARCIA, G. 1947. *Fitopatología agrícola del Perú*. Estación Experimental Agrícola La Molina, Lima Perú.

GROSS, R. 1982. El cultivo y la utilización del tarwi. Estudio Protección Vegetal, Roma, Italia, FAO 36, Pág. 36-48.

GROSS, R. y TUESTA, V. 1981. Proyecto de Cultivo y Utilización de los Lupinos en el Perú. Informe Nro. 7. Lima – Perú: sp

GROSS, R. Y TUESTA, L. 1977. El Cultivo y la Utilización de los Lupinos. Perú: IICA. 165 p.

GROSS, R. 1982. El cultivo y la utilización del tarwi. Estudio FAO. Producción y Protección Vegetal N° 36. Roma, Italia.

GROSS, R., VON BAER, E., KOCH, R., MARQUARD, L., TRUGO, L., WINK, M. 1988. Chemical composition of a new variety of the Andean lupin (*Lupinus mutabilis* cv. Inti) with low alkaloid content. Journal of Food Composition and Analysis 1: 353-361.

GRUBBEN, G. 1976. The cultivation of amarant as tropical leaf vegetable. Departament of Agricultural Research, Royal Tropical Institute, Amsterdam. pp 207p.

GRUBBEN, G., VAN, S. 1981. Genetic resources of amaranths. International Board for Plant Geenetec Resources. Rome, Italy. 57p.

GULATI, G., HYUN, B. 1994. The automated CBC. A current perspective. Hematol Oncol Clin North Am. 8: 593 – 603p.

GILMAN, A.; GOODMAN, L.S.; GILMAN, A., eds. 1980. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (6th ed. New York: Macmillan. ISBN 0-07-146891-9. 1843 pp. London, Toronto: Collier-Macmillan.

GÜENES-VERA, N., ARCINIEGA-RUIZ, O. AND DÁVILA-ORTIZ, G. 2004. Structural analysis of the *Lupinus mutabilis* seed, its flour, concentrate and isolate as well as their behavior when mixed with wheat flour. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 37: 283-290.

HERRERA, S. y MONTENEGRO, A. Universidad de Especialidades Turísticas. El Amaranto: prodigioso alimento para la longevidad y la vida. ISSN: 1390-5775. Num. 8. 2012.

HÖFLE, U. 2007. Técnicas de Diagnóstico Post-Mortem: Necropsia y Toma de Muestras. España: Sevilla de la Jara; . p. 23.

INFANTE, J., SIFONTES, S., PÉREZ, P., GONZÁLEZ, P., MUÑOZ, E., MARRERO, O. 1998. Toxicología de VA-DIFTET por aplicación a dosis única en ratones. *Rev Toxicol*;15:59-63.

INIAP. Usos alternativos del Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Boletín Técnico N° 333. Quito - Ecuador). 2006, pp. 9.

JACOBSEN, E., MUJICA, A. 2006. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) y sus parientes silvestres. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz 2006 458-482.

JACOBSEN, S. y SHERWOOD, S. 2002. Los granos andinos: oportunidad para mejorar la seguridad alimentaria. En Cultivo de granos andinos en Ecuador. Informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, Centro Internacional de la Papa CIP y Catholic Relief Services CRS, Quito, Ecuador.

JAIN, N. 1986. *Schlm`'s veterinary hematology*. 4th ed., sp, Philadelphia.

JOHANNSEN, J. 2017. Gente saludable, Salud en america latina y el caribe Banco Interamericano de Desarrollo sp.

JURADO, C. 1989. Toxicología Veterinaria. 2ª Edición. Salvat. Barcelona.

KATZUNG, B. G. “Farmacología Básica y Clínica” 9na ed. Ed. Manual Moderno.México D.F. 2005

KEELER, R., CRONIN, E., SHUPE J. 1976. Lupin alkaloids from teratogenic and nonteratogenic lupines. IV – Concentration of total alkaloids, and the teratogen anagryne as a afuncion of plant part and stage of growthand their relationship to crooked calf disease. Journal of Toxicology Environmental and Health 1: 899-908

KRASOVSKII, J. 1976. Guia de toxicologia general, experimentacion toxicologica y proteccion animal s/p.

KLAASSEN, C. 1986. Casarett and Doull`s T oxicology: The Basic Science of Poisons. 3th Edition. Macmillan Publishing Company. New York. USA.

LARRY, D. 2000. Drug-induced liver diseases. J Hepatol, p. 77 – 88.

LAGUNA, J., PIÑA, E. Licenciaturas de Q. Farmaceutica, Curso de Bioquímica. 5ta Edicion. Manual modern – UNAM 2009.

LEE, W. 1995. Drug-induced hepatotoxicity, N Engl J Med, p. 1118-27.

LESCANO, R. 1998. Genética y Mejoramiento de Cultivos Andinos, Cañihua, Quinua, kiwicha, Tarwi, Papa amarga, Olluco, y Oca” PINA PELT, Puno – Perú

LESCANO, J. 1994. Genética y mejoramiento de Cultivos Andinos; Quinoa, Kañihua, Tarwi, Kiwicha, Papa amarga, Olluco, Mashua y Oca. Programa Interinstitucional de Waruwaru, convenio INADE/PELT, COTESU Puno – Perú.

LOOMIS, T. 1982. Fundamentos de Toxicología. Editorial Acribia. Zaragoza.

LU, F. 1992. Toxicología Básica, Riesgo por exposición a sustancias tóxicas. Editorial Harla. Ciudad de México. Mexico.

MACEBO, A. y Col. 2002. Ensayo de Toxicidad a dosis repetidas (28 días) por vía oral del Extracto acuoso de *Morinda citrifolia* en ratas Sprague Dawley. Rev. Toxicol; 19: 78 – 8.

MARTINEZ, B., GOMEZ, V., RINCON, F. 2002. Ácido fólico: Aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 52: 219 – 231p

MALACHOWSKI, M. J. 1995. Health Effects of Toxic Substances. Government Institute Inc. Rockville. Maryland. USA

MC CAWLEY, E. 1985. Cardioactive Alkaloids. The alkaloids, chemistry and physiology. New York. U.S.A: Academic Press: 85 – 88.

MONTES, A. y HURTADO, F. 1984. Optimización del proceso de desamargado y desarrollo de una línea de fabricación de harina de tarwi a nivel rural proyecto Lupino- cebada de la GTZ. Lima- Perú: sp

MUJICA, A. y JACOBSEN, S. 2006. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. Botánica Económica de los Andes Centrales, 28: 458-482.

ORF, J. 1988. Modifying soybean compition by plant breeding. En. L. McCann (ed.). Proceedings: Soybean Utilization Alternatives. University of Minnesota, St. Paul, February 16 – 18:131.

ORTEGA, D., RODRIGUEZ, A., DAVID, A., ZAMORA-BURBANO, A. 2010. Caracterización de semillas de *Lupinus mutabilis* sembrado en los andes de Colombia. *Acta agronómica* 59: 111-118.

PERKINS, S. 2004. Examination of the blood and bone marrow. In *Wintrobe`s clinical hematology*. Edition. Philadelphia, USA, 11: 16 – 34p

RAJASEKARAN, A., SIVAGNANAM, G., XAVIER, R. 2008. Nutraceutical as therapeutic agents: A Review. *Research J Pharm and Tech*; 1(4): 328 – 40.

REPETTO, M., & SANZ, P. *Glosario de términos toxicológicos*. (Asociación Española De Toxicología). (Madrid – España), pp. 24. 1995

RENDON., A. *Suplementos dietarios o nutracéuticos*. Normas que lo regulan., 2013, disponible en internet:

<http://suplementosdietariosmaribel.blogspot.com/>

ROVIRA, R., GRAU, M., CASTANER, O., SCHODER, H., 2013. Dietary supplement use and health-related Behaviors in a Mediterranean Population. *J Nutr Educ Behav*; 45:386-91.

POLANCO, L. 2011. Adquisicion de la respuesta de congelamiento de ratas: diferencias sexuales en adolescentes y adultos. *Bogota, Colombia, Vol. 18: 2.*

SAUER, J. 1967. The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey, *Annals of the Missouri Botanical Garden* 37: 561-616p.

SCHONEBERGER, H., E IIDEFONSO, C. 1981. Determinación de factores anti nutritivos del lupino. I. Hemaglutininas. Proyecto Lupino, Instituto de Nutrición, Lima. *INF. N4*:109-120.

SIAVICHAY, G. 1986. Evaluacion agronómica de quince de quince eco tipos de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) y aspectos relacionados con el mejoramiento genético. Tesis de Ing. Agronómica Escuela Politecnica de Chimborazo.

TIMBRELL, J.1995. Principles of biochemical toxicology. London Taylor & Francis.

VAN DER HORST, K., SIEGRIST, M. 2011. Vitamin and mineral supplement user. Do they have healthy or unhealthy dietary behaviours? *Appetite*.57 (3): 758-64.

VELASCO, E. Y VALDIVIA. 1981. Origen y evaluación del Tarwi. Centro de Informática para la Investigación Agrícola. Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina: 56 p.

VILLACRES, J. 2017. Analisis fitoquímico, Actividad antioxidante y hepatoprotectora del extracto acuoso liofilizado del *Curcuma longa* en lesiones hepáticas inducidas con tetraclorometano en ratas albinas. Vol. 2: 3

VIVES, J. 1987. Manual de tecnicas de laboratorio en hematologia. 3ra. Ed. Barcelona.

WEISS, L., Chambers CD, 2013. Associations between multivitamin supplement use and alcohol consumption before pregnancy: Pregnancy Risk Assessment Monitoring System, 2004 to 2008. Alcohol Clin Exp Res: 37(9): 1595-600.

WROBLEWSKI, F. y LADUE, J. 1956. TECO Proc. Soc. Exper. Biol. And Med.91:569

BASE PARA EL DESARROLLO, comité permanente de nutrición del SISTEMA DE NACIONES UNIDAS (SCN) Ginebra 2002

Banco Interamericano de Desarrollo. Panorama de la efectividad en el desarrollo.20017. Disponible en:
https://issuu.com/marcuadro/docs/panorama_de_la_efectividad_en_el_desarrollo_deo_/58

Conferencia Internacional FAO/OMS INC2, Roma, Noviembre. 2002

INE-UDAPE-NACIONES UNIDAS “Progreso de los objetivos de desarrollo del Milenio” Segundo informe, Ginebra, 2002

MINISTERIO DE SALUD, la alimentación y nutrición en los procesos de desarrollo, sistema de las naciones unidas 32 sesión anual de comité permanente de nutrición proceso preparatorio, enero 2005.