



**UNIVERSIDAD VERACRUZANA**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS**



**Diseño y funcionalidad en sistemas *in vivo* de  
nanocápsulas líquidas de aceite de romero (*Rosmarinus  
officinalis L.*)**

**Tesis**

**Que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias Alimentarias**

**Presenta:**

**I en A. Jesús Alberto Briones Concha**

**Directores:**

**Dr. César Ignacio Beristain Guevara**

**Dra. Luz Alicia Pascual Pineda**

**Xalapa de Enríquez, Veracruz**

**Diciembre 2017**



La presente tesis titulada

**Diseño y funcionalidad en sistemas *in vivo* de nanocápsulas líquidas de aceite de romero (*Rosmarinus officinalis* L.).**

Realizada por el

**I. A. JESÚS ALBERTO BRIONES CONCHA**

Ha sido aprobada por el comité de evaluación de tesis, y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**Maestro en Ciencias Alimentarias**

Otorgando su autorización como jurado para ser presentada y defendida oralmente el 13 de diciembre de 2017.

Dra. Maribel Jiménez Fernández

Dra. Elia Nora Aquino Bolaños

Dr. Enrique Flores Andrade

## DEDICATORIA

A dios por darme la Bendición de vivir.

A mis padres por apoyarme en todos los proyectos que he tenido en mi vida, por todos los sabios consejos que me han dado, por ser mi fuerza y motivación.

A mis hermanos Diana y Marco, por su apoyo en todo momento, su amor y cariño, por ser un gran ejemplo para mí.

Yo siento los sufrimientos de los animales tan intensamente que nunca me he dedicado a la caza o al deporte del tiro. El alarido de una alondra me llegaría al alma, pero cuando hemos de investigar los misterios de la vida o conseguir nuevas verdades la soberanía del propósito se antepone.

Luis Pasteur

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a dios por la oportunidad de vivir y realizar un proyecto más en mi vida.

Agradezco al consejo de ciencia y tecnología (CONACYT), por el patrocinio de esta investigación

Agradezco a la Universidad Veracruzana por acogerme como estudiante, y formarme como profesional.

Agradezco a mis directores de tesis Dr. César Ignacio Beristain Guevara y Dra. Luz Alicia Pascual Pineda, por la confianza y la paciencia que depositaron en mí para el desarrollo de este trabajo, por el tiempo dedicado y por el conocimiento que aportaron.

Agradezco a mi asesora Dra. Luz Irene Pascual Mathey, por el conocimiento que aportó a este proyecto, por su tiempo, dedicación, paciencia y por los consejos que me transmitió.

Agradezco a mis sinodales por el tiempo dedicado a la revisión del trabajo y por las aportaciones hechas al mismo.

Agradezco a mis compañeras de generación por la amistad brindada durante esta etapa de mi vida.

A Anita por toda la ayuda que me ha dado, por ser una gran profesional y una excelente persona, por todo lo que hemos vivido adentro y fuera de los laboratorios gracias.

A Montse por esa ayuda que me brindaste en los días intensos de sacrificio de ratas, por tus enseñanzas en las técnicas del laboratorio, por las revisiones a mi tesis gracias.

A Naida gracias por ayudarme en mis técnicas de determinación de actividad antioxidante.

A Nathalia gracias por hacerme feliz, por estar a mi lado y compartir conmigo esta etapa importante mí vida, gracias por ser parte de mi motivación y por quitarme un poco lo amargado.

A Flor por ser mi amiga durante muchos años eres genial, gracias por acogerme en el laboratorio cuando llegué.

A Erick y Jaque son de las mejores personas que he conocido gracias por compartir conmigo esta bonita experiencia fuera y dentro del laboratorio, por los consejos que me han dado gracias.

Andrés y Moni gracias por compartir 1 año como familia, por esas platicas y compañía que nos brindamos durante las noches de trabajo y los momentos difíciles que pasamos.



A mi segunda familia la famosa "vecindad" Orlando, Jonathan, Estuardo, Jorge, Carlos Arturo, Martin, Carlos, Typhaine, Raúl, Ana y Jan, gracias por todos los excelentes momentos que me hicieron pasar, son los mejores músicos que conozco al menos para mí.

# ÍNDICE

1.	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
2.	<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	2
2.1	Romero y generalidades.....	2
2.1.1	Composición química de romero .....	4
2.1.2	Principales compuestos del ( <i>Rosmarinus Officinalis. L</i> ).....	5
2.1.3	Actividad Biológica del romero .....	6
	Actividad antioxidante del romero .....	7
2.2	Aceite esencial de romero ( <i>Rosmarinus officinalis L.</i> ).....	8
2.3	Emulsiones .....	8
2.3.2	Constituyentes de una emulsión.....	10
2.3.2.1	Fase acuosa.....	10
2.3.2.2	Fase oleosa.....	11
2.3.2.3	Emulsificantes.....	11
2.3.3	HLB (Balance Hidrofílico Lipofílico).....	12
2.3.5	Nanoemulsiones.....	15
2.3.5.1	Formulación de nanoemulsiones.....	15
2.3.5.2	Destino de una emulsión in vivo: después de la ingestión oral.....	19
2.4	Morfofisiología del hígado humano.....	20
2.5	Morfología del hígado de la rata Wistar.....	21
2.6	Etiología de afecciones hepáticas.....	22
2.7	Pruebas directas de la función hepática.....	24
2.7.1	Pruebas para la detección de lesiones hepatocitarias (enzimas séricas).....	24
3.	<b>ANTECEDENTES</b> .....	26
4.	<b>JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	28
5.	<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	29
5.1	Objetivo general.....	29
5.2	objetivos particulares.....	29
6.	<b>HIPÓTESIS</b> .....	29
7.	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.</b> .....	30
6.2	Materia prima.....	30

6.3 Equipos .....	30
6.4 Métodos.....	31
Figura 10. Etapas de la investigación .....	31
6.4.1 Elaboración del extracto acuoso. ....	31
6.4.2 Elaboración de la emulsión.....	32
6.4.3 Producción de la nanoemulsión .....	33
6.4.3.1 Análisis de tamaño de partícula PDI y potencial Z.....	33
6.4.5 Actividad antioxidante .....	33
6.4.5.1 Ensayo DPPH .....	33
6.4.5.2 Ensayo FRAP .....	34
6.4.5.3 Ensayo ABTS .....	34
6.4.6 Sistema <i>in vivo</i> .....	34
6.4.6.1 Eutanización y obtención de muestras.....	37
6.4.6.2 Determinación de Transaminasas (TGO y TGP) ó alanina aminotransferasa (ALAT) y aspartato aminotransferasa (ASAT). (Anexo 5) .....	37
6.4.6 Análisis estadístico.....	38
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
7.1 Caracterización de las nanoemulsiones .....	39
7.1.1 Barrido de concentración de HLB y tamaño de partícula.....	39
7.1.2 Índice de polidispersión.....	40
7.1.3 Potencial $\zeta$ .....	41
7.2 Actividad antioxidante.....	42
7.2.1 Porcentaje de inhibición del radical DPPH, FRAP Y ABTS.....	42
7.3 Modelo <i>in vivo</i> .....	46
7.3.1 Pérdida de peso corporal.....	46
7.3.2 Relación peso corporal-hígado.....	48
7.3.2 Fotografías de hígados a nivel macroscópico .....	49
7.3.3 Evaluación de transaminasas (ALAT Y ASAT) .....	52
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>57</b>
<b>10. BILIOGRAFIA.....</b>	<b>59</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>70</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	3
Figura 2. Estructura química de carnosol (Petiwala y Johnson, 2015).....	5
Figura 3. Estructura química de ácido carnosico (Petiwala y Johnson, 2015).....	5
Figura 4. Estructura química del ácido rosmarínico (Sigma-Aldrich, 2017).....	6
Figura 5 Emulsión W/O  y O/W  (Komaiko y McClements, 2016).....	9
Figura 6 .Escala de HLB y usos por afinidad.....	13
Figura 7. Ultrasonido.....	18
Figura 8. Ubicación del hígado humano.....	20
Figura 9. hígado de rata Wistar: 1. Lóbulo lateral derecho; 2.Lóbulo medial derecho; 4.Lóbulo lateral izquierdo; 5.Lóbulo medial izquierdo; 6 proceso caudado del lóbulo caudado.....	22
Figura 10. Etapas de la investigación.....	31
Figura 11. Diseño del Modelo <i>in vivo</i> .....	36
Figura 12. % de pérdida de peso corporal. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $P<0.001$ ).....	47
Figura 13. % relación peso corporal-hígado. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa. (Véase anexo 2).....	49
Figura 14. Fotografías macroscópicas de hígados de los diferentes tratamientos.....	51
Figura 15. Actividad de alanina aminotransferasa (ALAT). Letras diferentes en las barras indican que hay diferencia significativa ( $P<0.001$ ). (Véase anexo 3).....	54
Figura 16. Actividad de aspartato aminotransferasa (ASAT). Letras diferentes en las barras indican que hay diferencia significativa ( $P<0.001$ ). (Véase anexo 4).....	56



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de emulsiones de acuerdo al tamaño de partícula y estabilidad termodinámica. (McClements & Rao, 2011).....	9
Cuadro 2. Escala de valores de balance hidrofílico lipofílico de Griffin para algunos de los surfactantes (Salaguer, 1998).....	14
Cuadro 3. Tamaño de partícula en relación al número de HLB.....	40
Cuadro 4. Índice de polidispersión en relación al número de HLB.....	41
Cuadro 5. Potencial $\zeta$ en relación al número de HLB.....	42
Cuadro 6. Actividad antioxidante (porcentaje de inhibición de radical DPPH, FRAP y ABTS).....	45

## Control de abreviaturas

**AE** Aceites esenciales

**MVA** Acido mevalónico.

**IPP** Isopentil pirofosfato

**MEP** Metileritritol fosfato

**ROS** Especies reactivas de oxígeno

**CTL** Linfocitos T citotóxicos

**VHB** Virus de hepatitis B

**VHC** Virus de hepatitis V

**VHD** Virus de hepatitis delta

**TAA** Tioacetamida

**CCl<sub>4</sub>** Tetracloruro de carbono

**ALAT** Alanina aminotransferasa

**ASAT** Aspartato aminotransferasa

**TGP** Transaminasa glutámico pirúvica

**TGO** Transaminasa glutámico oxalacética

**O/W** emulsión aceite en agua

**W/O** emulsión agua en aceite

**HLB** Balance hidrofílico-lipofílico

**PDI** Índice de polidispersión

**NE** aceite esencial nanoemulsionado con tioacetamida

**EXAC** extracto acuoso de romero con tioacetamida

**ACE** aceite esencial de romero con tioacetamida

**SURF CON TAA** Surfactante con tioacetamida

**NE+EXAC** Aceite esencial de romero nano encapsulado más extracto acuoso de romero con tioacetamida

**SURF** Surfactante

## RESUMEN

Los subproductos como el aceite esencial y extracto acuoso de la planta de romero (*Rosmarinus Officinalis L.*) han sido utilizados desde la antigüedad como fuente medicinal y alimentaria para el ser humano, debido a que durante muchos años se les ha atribuido prevención a muchas alteraciones fisiológicas, bioquímicas e histopatológicas, una de estas alteraciones es el daño hepático el cual puede ser ocasionado por diversos factores como el consumo de fármacos o el alcoholismo. Sin embargo, muchos de los componentes bioactivos de los subproductos del romero tienen limitaciones ya que son sensibles a ciertas condiciones ambientales y en algunos casos como el del aceite esencial su naturaleza hidrofóbica limita su aplicabilidad en diversas matrices alimentarias, es por eso, que en esta investigación se propuso el uso de las nanoemulsiones para solucionar dichas limitaciones y poder aprovechar de mejor manera los compuestos bioactivos del romero. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue elaborar y caracterizar nanoemulsiones aceite/agua (por sus siglas en inglés O/W) de aceite esencial de romero y probar su efecto hepatoprotector en un modelo *in vivo*. La fase oleosa de las nanoemulsiones consistió en aceite esencial de romero y la fase acuosa en extracto acuoso de romero y agua, como agente surfactante se utilizó una mezcla de Tween 40 y Span 20. Se utilizó ultrasonido a una amplitud de 30% y un tiempo de 10 min para disminuir el tamaño de partícula. Las siguientes mediciones fueron utilizadas para caracterizar a las nanoemulsiones: tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI), potencial  $\zeta$  y actividad antioxidante. La nanoemulsión con mejores características fue utilizada en el modelo *in vivo* con un tamaño de partícula de 50.03nm, PDI de 0.2 y potencial  $\zeta$  de -26.70. Los resultados obtenidos en el modelo *in vivo*, en cuanto al análisis de transaminasas, relación peso corporal hígado y pérdida de peso corporal indican que el aceite esencial de romero nanoemulsionado confiere un efecto hepatoprotector.

Palabras clave: nanoemulsiones, aceite esencial de romero, *Rosmarinus Officinalis L.*, hepatoprotector.

## SUMMARY

By-products such as the essential oil and aqueous extract of the rosemary plant (*Rosmarinus Officinalis L.*) have been used since antiquity by humans as a medicinal and food source, because for many years they have been attributed with the property of prevent many physiological, biochemical and histopathological alterations, one of these alterations is the liver damage which can be caused by various factors such as drug use or alcoholism. However, many of the bioactive components of rosemary byproducts have many limitations because they are sensitive to certain environmental conditions and in some cases, such as essential oil, its hydrophobic nature limits its applicability in various food matrices, that is the reason why in this research is proposed the use of nanoemulsions to solve these limitations and to take better advantage of the bioactive compounds of rosemary. Therefore, the main objective of this work was to elaborate and characterize oil / water nanoemulsions (O/W) of rosemary essential oil and to test its hepatoprotective effect in an *in vivo* model. The oil phase of the nanoemulsions was rosemary essential oil and the aqueous phase was rosemary aqueous extract and water, as a surfactant a mixture of Tween 40 and Span 20 was used. Ultrasound was used at an amplitude of 30% and a time of 10 min to decrease the particle size. The following measurements were used to characterize the nanoemulsions: particle size, polydispersity index (PDI), potential  $\zeta$  and antioxidant activity. The nanoemulsion with better characteristics was used in the *in vivo* model with a particle size of 50.03nm, PDI of 0.2 and potential  $\zeta$  of -26.70. The results obtained in the *in vivo* model, in terms of transaminase analysis, liver weight ratio and body weight loss, indicate that the nanoemulsified rosemary essential oil confers a hepatoprotective effect.

Keywords: nanoemulsions, rosemary essential oil, *Rosmarinus Officinalis L.*, hepatoprotector.

## 1. INTRODUCCIÓN

El ser humano ha tenido desde hace miles de años estrecha relación con las plantas, debido a su uso como fuente medicinal. En la actualidad las plantas siguen siendo importantes para desarrollar medicamentos y alimentos funcionales, ya que son una fuente importante de compuestos bioactivos. Una de las principales plantas que se ha investigado desde la antigüedad es el romero (*Rosmarinus Officinalis L.*), porque que se cultiva alrededor del mundo y es utilizada como condimento y aromatizante en la elaboración de algunos alimentos. Los subproductos más importantes del romero son su extracto acuoso y aceite esencial.

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles altamente utilizados en la industria, destacando principalmente en la alimentaria por su alta aplicabilidad en satisfacer las necesidades de los consumidores en cuanto a la inclusión de compuestos de origen natural que provean de mejores cualidades organolépticas y de conservación. Diversos estudios sugieren que el romero y sus subproductos pueden proporcionar beneficios a la salud, previniendo algunas alteraciones fisiológicas como el daño hepático (ocasionado por diversos factores como el alcoholismo, virus y el consumo de algunos medicamentos), por lo cual es necesario aprovechar y potenciar los beneficios que pueden brindar los compuestos bioactivos de esta planta. La presente investigación propone el diseño de una nanoemulsión de aceite esencial y extracto acuoso de romero para mejorar el efecto hepatoprotector en un modelo de daño hepático *in vivo*.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Romero y generalidades

El romero (*Rosmarinus officinalis L.*) es una planta aromática conocida y utilizada desde la antigüedad como condimento y con fines medicinales. La planta de romero ha sido un peso importante a lo largo de la historia de la humanidad debido a las propiedades que se le han atribuido en diversas culturas (Villiera, 2002). Un ejemplo es en los restos hallados en la primera dinastía faraónica, donde se solían colocar ramilletes de romero en las tumbas con la finalidad de perfumar el viaje hacia el país de los muertos (De rivera & Obón, 1995) por otro lado griegos y romanos creían que el romero era la planta de la regeneración, creían que el romero simbolizaba el amor y la muerte, apareciendo desde entonces esta planta en bodas y funerales, como símbolo manifiesto de amor duradero y que ese vínculo jamás se rompería (López & Costa, 1996; Brines *et al.*, 2007). Hoy se emplea como planta digestiva y, por vía externa, como rubefaciente. Sin embargo, hay estudios que demuestran otras propiedades terapéuticas que pueden resultar interesantes.

La planta de *Rosmarinus officinalis* fue identificada por Lineo en 1753 (Sánchez, 1980). Tradicionalmente se ha creído que la palabra “*Rosmarinus*” deriva de dos vocablos griegos “*rhos*, arbusto y *myrinos*, aromático”, los cuales concuerdan perfectamente con las características de la planta (Morales, 2014), por otro lado el origen de la palabra “*officinalis*”, hace referencia a su aplicación como planta medicinal (Font Quer, 1999; Stuart, 1981).

Taxonómicamente, el romero *Rosmarinus officinalis L.* Es un subarbolito perfumado que pertenece a la familia de las labiadas (Labiateae). Puede medir de 50 a 150 cm de altura y es perenne, frondoso y muy ramificado. Los principios activos se concentran en las hojas y, a veces, en la sumidad florida. Las primeras son opuestas, coriáceas y estrechamente lineares. Pueden llegar a medir hasta 3 cm de largo y 4 mm de ancho, y sus márgenes enteros enrollados hacia abajo

hacen que parezcan casi cilíndricas. La cara superior de las hojas jóvenes es pelosa y de color verde intenso, las hojas adultas son glabras.

La floración dura casi todo el año y produce flores labidas que se agrupan en inflorescencias densas, que se encuentran en las axilas de las hojas. La corola es azulada, rosa o blanca, con manchas violáceas en el interior y tienen dos estambres encorvados que están soldados a la corola y tienen un pequeño diente. Estas flores presentan dos labios bien marcados, el superior con dos lóbulos y el inferior con tres, de los cuales el intermedio es cóncavo y alargado. El fruto es una tetraqueno de color pardo (Tránsito, 2008).

Toda la planta desprende un fuerte y aromático olor, algo alcanforado. Su sabor característico también es aromático, pero áspero y algo picante.

Este arbusto, propio de zonas secas y áridas, es originario de la zona mediterránea, donde también se cultiva. De hecho, sus principales países productores son España, Marruecos y Túnez, pero también podemos encontrar esta planta en Oceanía, Asia y en América del sur, Centroamérica y algunas partes de norte América. La recolección se realiza entre los meses de abril a julio, y se conserva en cajas de cartón o bolsas de papel, en la Figura 1 se pueden observar las ramas de romero



**Figura1. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.) (Petiwala y Johnson, 2015)**



### 2.1.1 Composición química de romero

En la planta se han identificado diversos compuestos químicos los cuales han sido agrupados de manera general por diversos autores en ácidos fenólicos, flavonoides, aceite esencial, ácidos triterpénicos y alcoholes triterpénicos. (Caribe & Campos 1991, Botsaris 1995, Atti-Santos 2005, Ávila *et al.*, 2011).

De manera general las principales moléculas que se han identificado en el romero son las siguientes:

Terpenoides: carnosol, ácido oleánico, ácido oleanólico, ácido acetiloleanólico, ácido ursólico y ácido acetilursólico (triterpenos), ácido carnosílico, rosmaridienol, 7-metoxirosmarol,  $\alpha$  y  $\beta$ - amirenoma.

Flavonoides: apigenina, diosmetina, diosmina, hispidulina, luteolina, cirsimarina, nepriteina, sinensetina, cupafolina.

Ácidos fenólicos: cafeico, clorogénico, labiático, neoclorogénico y rosmarínico.

Diterpenos: carnosol, rosmanol, rosmadial.

Ácidos triterpénicos (ácido ursólico).

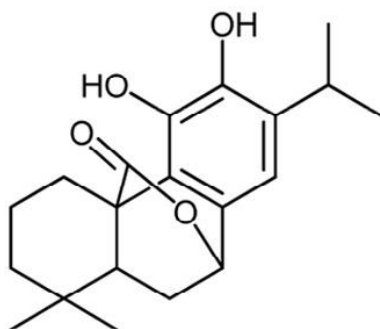
Alcoholes triterpénicos ( $\alpha$  y  $\beta$ -amirina, betulósido).

Además contiene taninos, azúcares y elementos minerales:

- 1.11% de sodio
- 1.06% de potasio
- 0.63% de calcio
- 0.23% de magnesio
- 17ppm de hierro
- 10 ppm de cobre
- 26 ppm de zinc
- 15 ppm de manganeso

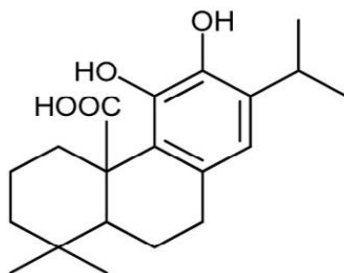
### 2.1.2 Principales compuestos del (*Rosmarinus Officinalis. L*)

- Carnosol diterpeno se ha convertido en una de las principales moléculas bioactivas del extracto de romero. Fue aislado por primera vez en 1942 a partir de *Salvia carnosa* y posee una amplia gama de actividades biológicas, es decir, antimicrobiana, neuroprotector, antioxidante anti-inflamatoria (Altiner *et al.*, 2007; Poeckel *et al.*, 2008 & Johanson, 2011) y propiedades anti-cáncer (Dörrie, 2001; Lo *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005; Visanji *et al.*, 2006; Lo *et al.*, 2002; Johanson, 2011 & Vergara *et al.*, 2014).



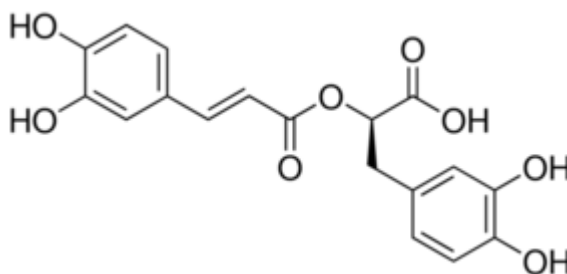
**Figura 2. Estructura química de carnosol (Petiwala y Johnson, 2015)**

- El ácido carnósico es un diterpeno féenólico, fue descubierto por primera vez en *Salvia officinalis L.* (Linde, 1964). Más tarde, Wenkert *et al.*, 1965 encontró ácido carnósico a niveles mucho más altos en hojas de *Rosmarinus officinalis L.*



**Figura 3. Estructura química de ácido carnósico (Petiwala y Johnson, 2015)**

- El ácido rosmarínico es un compuesto fenólico natural, es un éster de ácido cafeico y ácido láctico 3,4-dihidroxifenil. Se encuentra en plantas de la familia *Lamiaceae* y *Boraginaceae*, incluyendo romero, tomillo, salvia y orégano. De este modo el ácido rosmarínico se ha convertido en un producto valioso en la industria de alimentos, cosméticos y la industria farmacéutica.



**Figura 4. Estructura química del ácido rosmarínico (Sigma-Aldrich, 2017)**

### 2.1.3 Actividad Biológica del romero

En algunos estudios *in vitro* se ha demostrado que el ácido carnósico podría ser el componente antioxidante más activo, con una actividad tres veces superior al carnosol y siete veces superior que otros componentes sintéticos como el hidroxitolueno butilado e hidroxianisol butilado (Cuvelier *et al.*, 1996). Otros estudios *in vitro* indican que uno de los compuestos más importante para la actividad antioxidante sería el ácido rosmarínico (Thorsen *et al.*, 2003).

Pérez *et al.*, (2010), han publicado que los ácidos rosmarínico, carnósico y carnosol, serían los responsables de la actividad antioxidante de los extractos de hojas de romero. Sin embargo, otra investigación afirma que la mayor actividad biológica se alcanza al estudiar el extracto total de la planta, que podría tener un efecto de sinergismo entre todos componentes que forman los extractos de romero (Erkan *et al.*, 2008).

Algunos estudios afirman que los compuestos antioxidantes de los extractos de romero pueden tener efectos fisiológicos actuando como un remedio eficaz frente a la depresión (Souza *et al.*, 2012), actividad anticancerígena y actividad hepatoprotectora (Al-Attar *et al.*, 2014).

#### *Actividad antioxidante del romero*

Los antioxidantes son compuestos o sistemas que retrasan la autooxidación inhibiendo la formación de radicales libres o irrumpiendo la propagación del radical libre por uno o varios mecanismos.

Se han realizado diversos estudios de la actividad antioxidante del romero, algunos de estos han confirmado que esta planta podría tener potencial como un antioxidante de origen natural.

Los antioxidantes de origen natural son una buena alternativa a los antioxidantes convencionales, debido a su alto contenido de compuestos fenólicos y otros ingredientes activos que pueden prevenir eficazmente la iniciación o propagación de las reacciones de oxidación. Los subproductos del romero tienen propiedades antioxidantes más fuertes que algunos antioxidantes sintéticos como el BHA y BHT (Kumar *et al.*, 2015).

Erkan *et al.*, (2008) evaluaron la actividad antioxidante de 3 compuestos puros del romero (ácido carnósico, ácido rosmarínico y sesamol), extracto de romero y aceite esencial de semilla negra, obteniendo como resultado que el extracto de romero presenta mayor actividad antioxidante que los compuestos puros y que el aceite de semilla negra, este resultado es atribuido al alto contenido fenólico del romero.

Lin-Chen *et al.*, (2006) realizaron un estudio sobre la actividad antioxidante de 23 plantas comestibles sometidas a digestión, una de las plantas analizadas fue el romero. Los resultados obtenidos reflejan que la planta de romero puede ser considerada como una fuente importante de antioxidantes de origen natural, para

prevenir algunos daños causados por el estrés oxidativo tales como daños cardiovasculares y diabetes mellitus.

## **2.2 Aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)**

El uso de aceite de romero se remonta al año 1500 (Guenther, 1948). Antes de la refrigeración se inventó el aceite de romero con fines de conservación de alimentos, así como antiséptico y con fines astringentes (Bousbia *et al.*, 2009). A través de los años, el área de utilización del aceite de romero no ha cambiado mucho, este aceite esencial se constituye principalmente por compuestos fenólicos (Baser & Buchbauer, 2010), y debido a esta composición, que implica principalmente monoterpenos como 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno, alcanfor y canfeno, tiene muchos efectos terapéuticos, entre los más conocidos antioxidante, antimicrobianos y anti cancerígenos, sin embargo la incorporación de aceites esenciales a los alimentos presenta un reto tecnológico que implica su adecuada dispersión en la matriz alimentaria, el control de su interacción con otros ingredientes, así como la preservación de su actividad durante el tiempo requerido. Un posible enfoque para superar tales desafíos se basa en la encapsulación de los aceites esenciales, lo que puede contribuir a mejorar la protección de los compuestos bioactivos de la degradación química, así como a la dispersión en la parte acuosa de los alimentos y reducir el impacto de los aceites esenciales en las propiedades sensoriales y mejorar su actividad biológica mediante la promoción del transporte de masas.

## **2.3 Emulsiones**

Son sistemas heterogéneos compuestos de dos fases líquidas inmiscibles, con una de ellas dispersa como gotas pequeñas en la otra, y un radio de 100nm a 1000 nm. De acuerdo a la fase que constituye las gotas, hay dos tipos de emulsiones simples, aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O) como se observa en la figura 5. Estos son sistemas inestables desde el punto de vista termodinámico debido a la relativamente alta energía libre positiva (tensión

superficial) asociada con el contacto entre las fases de aceite y agua (McClements, 2011), pero pueden llegar a ser cinéticamente estables mediante la adición de emulsionantes o estabilizadores. Las emulsiones convencionales tienden a ser ópticamente turbias u opacas, debido a que las gotitas contienen dimensiones similares a la longitud de onda de la luz ( $r \approx \lambda$ ), por lo que la dispersan fuertemente (Rao & McClements, 2011).

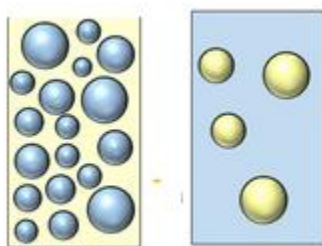


Figura 5. Emulsión W/O ● y O/W ● (Komaiko y McClements, 2016)

**Cuadro 1. Clasificación de emulsiones de acuerdo al tamaño de partícula y estabilidad termodinámica (McClements & Rao, 2011).**

Tipo de sistema	Diámetro de partícula (nm)	Estabilidad termodinámica	Propiedades ópticas
<b>Emulsión convencional</b>	100-1000	Inestable	Turbio/opaco
<b>Nano emulsión</b>	10-100	Estable	Turbio/Claro
<b>Microemulsión</b>	2-100	Estable	Turbio/Claro

Existen algunos métodos para identificar el tipo de emulsión:

- 1) Generalmente una emulsión O/W tiene una textura cremosa y las emulsiones W/O tienen un tacto graso.
- 2) La emulsión se mezcla fácilmente con líquidos que son miscibles con el medio de dispersión.

- 3) Las emulsiones se colorean con facilidad con tintes que son solubles en el medio de dispersión.
- 4) La conductividad eléctrica generalmente es mucho mayor en emulsiones O/W que en las W/O.

### **2.3.2 Constituyentes de una emulsión**

Las emulsiones contienen al menos dos fases líquidas inmiscibles y un agente tensoactivo. La estabilidad de las emulsiones se puede conseguir usando agentes tensoactivos apropiados o estabilizadores, los cuales son responsables de alterar la tensión interfacial entre la fase continua y la fase dispersa. Las emulsiones de aceite en agua (O/W) son de gran importancia en la industria alimentaria y también se utilizan para la encapsulación de componentes funcionales lipofílicos como antimicrobianos, nutracéuticos y vitaminas en la industria alimentaria (McClements, 2005).

#### *2.3.2.1 Fase acuosa.*

La proporción en que cada fase se presenta en la emulsión es de gran importancia puesto que ella condiciona normalmente el tipo de emulsión, viscosidad, estabilidad y determina además la calidad y cantidad del emulsificante a emplear. La fase acuosa utilizada para preparar una emulsión comúnmente consiste en agua pero también puede contener una variedad de otros componentes polares, incluyendo co-solventes (como alcoholes o polioles), carbohidratos, proteínas, minerales, ácidos y bases. El tipo y concentración de estos componentes determinan la polaridad, tensión interfacial, índice de refracción, reología, densidad, comportamiento de las fases, pH, y fuerza iónica de la fase acuosa que, en conjunto, impactarán la formación, estabilidad y las propiedades fisicoquímicas de la emulsión producida (McClements y Rao, 2011).

### 2.3.2.2 Fase oleosa

La fase oleosa para preparar emulsiones puede ser constituida por varios componentes no polares, incluyendo triacilglicéridos, diacilglicéridos, monoacilglicéridos, ácidos grasos libres, aceites esenciales, saborizantes y nutracéuticos lipófilicos (McClements y Rao, 2011).

### 2.3.2.3 Emulsificantes

La selección de un emulsificante apropiado es uno de los factores más importantes a considerar para el diseño apropiado de una emulsión o nanoemulsión. Un emulsificante es una molécula de superficie activa que es capaz de adsorberse en la superficie de las partículas, lo que facilitara la disrupción y protegerá contra la agregación (Kralova y Sjoblom, 2009).

Si sólo una fase oleosa y una fase líquida son homogenizadas juntas, el sistema normalmente se rompería rápidamente por una variedad de diferentes mecanismos, incluyendo floculación de gotas, coalescencia, maduración de Ostwald y separación gravitacional. Por esta razón, es a menudo necesario añadir varios tipos de estabilizadores.

Los emulsificantes se clasifican de acuerdo a sus características eléctricas en iónicos, no iónicos y bipolares (McClements, 2005). Surfactantes iónicos pueden ser usados para formar nanoemulsiones por varios métodos de baja y alta energía. Su utilización podría estar limitada en productos donde altos niveles de surfactante son requeridos porque causan irritación (Sol *et al.*, 2006). Surfactantes no iónicos han sido ampliamente usados en la formación de nanoemulsiones debido a su baja toxicidad, ausencia de irritabilidad, y capacidad para formar con facilidad nanoemulsiones por ambos métodos alta energía y baja energía. Surfactantes bipolares pueden tener carga negativa, positiva o neutra dependiendo del pH de la solución, algunos surfactantes bipolares son los fosfolípidos que poseen el estatus (GRAS) generalmente reconocido como seguro, por lo cual pueden ser utilizados en la elaboración de emulsiones alimentarias.



### 2.3.3 HLB (Balance Hidrofílico Lipofílico)

Griffin en 1949 empleó el concepto HLB que se basa en un método experimental que consiste en atribuir un número de HLB a los agentes emulsionantes a partir de datos relativos a la estabilidad de una emulsión. Este número HLB representa implícitamente varios parámetros y da el balance hidrofílico – lipofílico del sistema.

Griffin determinó que los surfactantes pueden mezclarse siguiendo una regla lineal basada en fracciones en peso.

$$HLB_M = x_1 HBL_1 + x_2 HBL_2$$

Donde  $HBL_1$  y  $HBL_2$  son los números  $HLB$  de los surfactantes 1 y 2,  $x_1$  y  $x_2$  sus fracciones en peso en la mezcla y  $HLB_M$ , el  $HLB$  de la mezcla de surfactantes,

Variando las fracciones de “x”, se puede obtener una serie continua de  $HLB$  entre los dos valores extremos. La regla de mezcla permite, igualmente, extender la escala fuera de los límites 1-20 como se observa en la figura 6 que corresponden a los dos surfactantes de referencia.



Figura 6. Escala de HLB y usos por afinidad.

**Cuadro 2. Escala de valores de balance hidrofílico lipofílico de Griffin para algunos de los surfactantes (Salaguer, 1998).**

<b>Nombre</b>	<b>Surfactante</b>	<b>HLB</b>
<b>Span 85</b>	Trioleato de sorbitol (NI)	1.8
<b>Span 65</b>	Triestearato de sorbitol (NI)	2.1
<b>Span 80</b>	Monooleato de sorbitol (NI)	4.3
<b>Span 60</b>	Monoestearato de sorbitol (NI)	4.7
<b>Span 40</b>	Monopalmitato de sorbitol (NI)	6.7
<b>Span 20</b>	Monolaurato de sorbitol (NI)	8.6
<b>Tween 81</b>	Monooleato sorbitán con poli-EO (NI)	10.0
<b>Tween 65</b>	Triestearato sorbitán con poli-EO (NI)	10.5
<b>Tween 21</b>	Monolaurato sorbitán con poli-EO (NI)	13.5
<b>Tween 60</b>	Monolaurato sorbitán con poli-EO (NI)	14.9
<b>Tween 80</b>	Monooleato sorbitán con poli-EO (NI)	15.0
<b>Tween 40</b>	Monopalmitato sorbitán con poli-EO (NI)	15.6
<b>Tween 20</b>	Monolaurato sorbitán con poli-EO (NI)	16.7
<b>Triton x-15</b>	Octil-fenol-1,5 EO (NI)	3.6
<b>Triton x-35</b>	Octil-fenol-3,5 EO (NI)	7.8
<b>Triton x-45</b>	Octil-fenol-4,5 EO (NI)	10.4
<b>Triton x-114</b>	Octil-fenol-7,5 EO (NI)	12.4
<b>Sipex SB</b>	Dodecil sulfato de sodio (AI)	40.0
<b>Sipon L-22</b>	Dodecil sulfato de amonio (AI)	31.0
<b>Sipon LT6</b>	Dodecil sulfato de trietanolamina (AI)	34.0
<b>Neodol 25-7</b>	Alcohol primario (C12-15) poli-EO (NI)	12.0

### 2.3.5 Nanoemulsiones

Una nanoemulsión se compone de una fase lipídica dispersada en una fase continua acuosa, cada gotita de aceite está rodeada de una capa delgada que consiste en moléculas interfaciales del emulsionante (Tadros *et al.*, 2004; Acosta, 2009). Usualmente, las nanoemulsiones son altamente estables a la separación gravitacional, debido al pequeño tamaño de partícula. También tienen buena estabilidad frente a la agregación de gotitas porque la distancia de fuerzas de atracción que actúan entre las ellas disminuye con la reducción del tamaño de partícula, mientras que la distancia de repulsión estérica es menos dependiente del tamaño de partícula (Tadros *et al.*, 2004). Las nanoemulsiones son más estables termodinámicamente comparadas con las emulsiones convencionales bajo un rango de condiciones diferentes. Esta estabilidad se deriva de su pequeño tamaño y monodispersidad lo que implica que se pueden diluir sin cambiar la distribución del tamaño de gota.

Las nanoemulsiones se pueden utilizar para encapsular componentes de los alimentos funcionales en la interfase aceite/agua o en toda la fase continua del sistema (Weiss *et al.*, 2008).

#### 2.3.5.1 Formulación de nanoemulsiones

Las nanoemulsiones pueden ser producidas usando diferentes de métodos, los cuales son clasificados como de alta energía o de baja energía. Los de alta energía para la preparación de nanoemulsiones se pueden clasificar en homogenización de alta presión (Quintanilla y Carvajal, 2010), el método de ultrasonido (Sanguansri y Augustin, 2006) y dispositivos de alta velocidad (Anton *et al.*, 2008).

- **Métodos de alta energía**
- **Homogenizador con válvula de alta presión**

Los homogenizadores con válvula de alta presión son probablemente el método más común de producir emulsiones convencionales con pequeños tamaños de gota en la industria alimentaria (Schubert & Behrend, 2003; Schubert & Engel, 2004).

Se produce generalmente una emulsión gruesa usando un mezclador de alto cizallamiento y después se alimenta directamente en la entrada del homogenizador de válvula de alta presión. El homogenizador tiene una válvula que empuja la emulsión gruesa dentro de una cámara sobre su espalda y luego la fuerza a pasar a través de una válvula estrecha en el extremo de la cámara hacia adelante. A medida que la emulsión pasa a través de la válvula experimenta una combinación de intensas fuerzas disruptivas que hacen que las gotas más grandes se vuelvan más pequeñas (McClements & Rao, 2011).

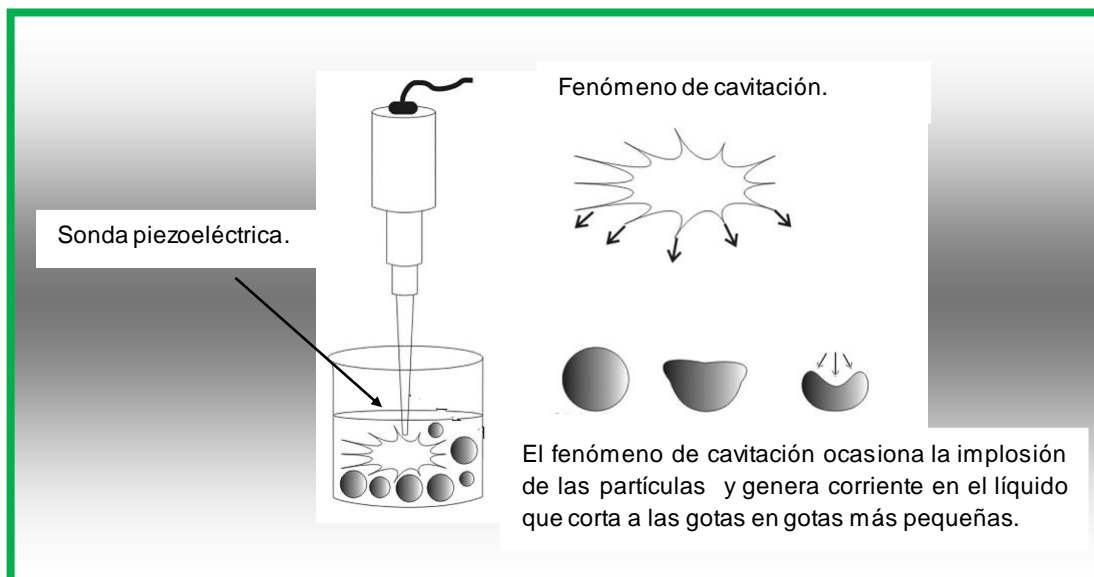
- **Microfluidizador**

Un microfluidizador es similar en diseño a un homogenizador de alta presión, ya que implica el uso de altas presiones para forzar una pre-emulsión a pasar a través de un orificio estrecho para facilitar la ruptura de las gotas. Sin embargo el diseño de los canales a través de los cuales se hace pasar la emulsión es diferente a los del homogenizador de alta presión. Los microfluidizadores utilizan una bomba de alta presión de desplazamiento positivo (500 – 20 000 psi). El producto fluye a través de los microcanales en un área de incidencia resultante en partículas muy finas de gama submicrónica. Las dos soluciones (fase acuosa y fase oleosa) se combinan entre sí para producir una emulsión convencional, la cual se introduce en un microfluidizador donde se procesa adicionalmente para obtener una nanoemulsión estable. La emulsión se hace pasar a través de la cámara de

interacción del microfluidizador varias veces hasta que se obtiene el tamaño de partícula deseado. La emulsión a granel se filtra a continuación a través de un filtro en atmósfera de nitrógeno para eliminar las gotas grandes resultantes para obtener una nanoemulsión uniforme (Lovelyn & Attama, 2011). Los microfluidizadores se han utilizado tradicionalmente en la industria farmacéutica para producir emulsiones, también se han utilizado en la industria alimentaria en productos como bebidas, emulsiones con sabor, nutracéuticos en emulsiones y leche homogenizada.

- **Homogenizadores ultrasónicos**

Los homogenizadores ultrasónicos o sonicadores utilizan ondas ultrasónicas de alta intensidad para crear fuerzas disruptivas intensas necesarias para la ruptura de fases agua y aceite en gotas muy pequeñas figura 5 (Kent *et al.*, 2006; Lin & Chen, 2006; Leong *et al.*, 2009). En estos equipos la punta del sonicador se coloca dentro del líquido a homogeneizar, donde se generan vibraciones mecánicas intensas que conducen a efectos de cavitación como se observa en la figura 7, es decir, la formación, crecimiento y colapso de pequeñas burbujas en el líquido. Para la homogenización eficaz y uniforme es importante asegurar que la emulsión pasa el tiempo suficiente dentro de la región en la que se produce la disrupción de las gotas. El tamaño de las gotas producidas utilizando un dispositivo ultrasónico tiende a disminuir a medida que aumenta la intensidad de las ondas ultrasónicas (McClements & Rao, 2011).



**Figura 7. Ultrasonido.**

- **Métodos de baja energía**

Los métodos de baja energía se clasifican en emulsión de membrana (Sanguansri & Augustin 2006), emulsificación espontánea (Anton *et al.*, 2008), desplazamiento de solvente (Yin *et al.*, 2009) y fase punto de inversión (Sadurní *et al.*, 2005).

Los métodos de baja energía son interesantes, ya que utiliza la energía almacenada del sistema para formar pequeñas gotas. Esta emulsión puede ser provocada por el cambio de los parámetros que podrían afectar el balance hidrófilo-lipófilo (HLB) del sistema como la temperatura, composición, etc. (Lovelyn y Attama, 2011). La formación de emulsiones utilizando métodos de bajo consumo energético se basa en la formación espontánea de gotas. Estos métodos suelen ser más eficaces en la producción de pequeños tamaños de gota que los enfoques de alta energía, pero son a menudo más limitados en los tipos de aceites y emulsificantes que pueden ser utilizados.

Una vez alterado el tamaño de las partículas dentro del intervalo de nanómetros, por medio de las metodologías ya descritas, hace que se comporten de manera diferente en el cuerpo humano lo que influye en su absorción,

distribución, metabolismo y excreción. En general, el destino biológico de una nanopartícula depende de sus características físico-químicas iniciales tales como composición, estructura, dimensiones, propiedades interfaciales y su estado físico (McClements, 2013).

#### 2.3.5.2 Destino de una emulsión *in vivo*: después de la ingestión oral

Las emulsiones pueden ser matrices ideales para la encapsulación y administración de compuestos bioactivos lipofílicos. El diseño y la fabricación de la matriz portadora es un paso crítico para lograr este objetivo, y esto está relacionado con el proceso fisiológico de la digestión de los lípidos en el estómago y el intestino delgado. Las partículas de aceite emulsionadas se hidrolizan por la lipasa gástrica durante la digestión gástrica y se liberan diacilgliceroles, monoacilgliceroles y ácidos grasos libres. La hidrólisis de lípidos continúa en el estómago hasta que se libera 10-30% de los ácidos grasos libres (Armand, 2007), los productos de digestión del quimo se transfieren al duodeno, donde las lipasas pancreáticas continúan el proceso de digestión de los lípidos. En presencia de lípidos digestibles, las pequeñas moléculas de lípidos se mezclan con fosfolípidos, sales biliares, colesterol y forman una compleja mezcla de nanoestructuras coloidales (micelas mixtas, vesículas y cristales líquidos) capaces de encapsular bioactivos no polares (Mullertz *et al.*, 2012). La digestión de lípidos continúa en el intestino delgado donde estas dispersiones coloidales complejas se solubilizan en el lumen, se absorben en los enterocitos por difusión pasiva y se empaquetan en quilomicrones antes de ingresar a la circulación sistémica a través del sistema linfático.

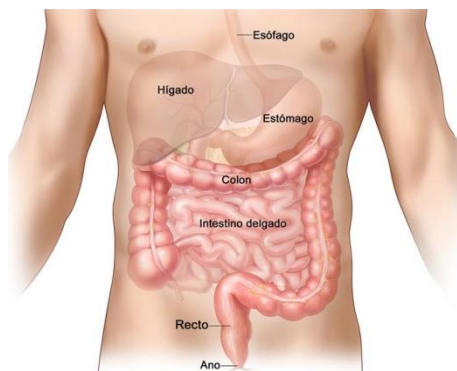
Tras la administración oral, las nanoemulsiones entran en el tracto gastrointestinal y se someten a una variedad de condiciones ambientales. Persson y colaboradores (2014) surgieron con una teoría que la respuesta post-prandial se estimula parcialmente en tales casos. La estimulación del mecanismo de detección de lípidos en el tracto gastrointestinal conduce a la secreción de lipasas gástricas que comienzan la digestión fraccionada de triacilglicéridos de cadena



larga y triacilglicéridos de cadena media que forman la nanoemulsión para producir di-glicéridos, mono-glicéridos y ácidos grasos libres más simples. A menor tamaño de partícula de la nanoemulsión se acelera la actividad de la lipasa. La digestión del componente oleoso libera el compuesto bioactivo que por lo general sufre precipitación. En otro caso el compuesto bioactivo solo puede separarse de la gotita de aceite en el entrono acuoso circundante. Presencia de aceites y productos de digestión de aceite en el tracto gastrointestinal (GI) estimulan la secreción de bilis y retrasan la motilidad del tracto GI. Los componentes de la bilis ayudan en la solubilización de nanoemulsiones actuando como tensoactivos endógenos y pueden formar estructuras coloidales conocidas como micelas mixtas. La bilis y las micelas mixtas preexistentes solubilizan adicionalmente el compuesto bioactivo libre y lo transportan a través de la capa de difusión acuosa no agitada para la absorción.

## 2.4 Morfofisiología del hígado humano

El hígado es la glándula de mayor volumen en el cuerpo humano, con un peso aproximado de 1.4 kg en un adulto promedio, siendo el órgano en segundo lugar en tamaño sólo detrás de la piel. Se localiza la parte inferior del diafragma del lado derecho en la cavidad abdominal como se muestra en la Figura 8.



**Figura 8. Ubicación del hígado humano (Pinterest, 2017)**

El hígado recibe sangre de dos fuentes, sangre oxigenada de la arteria hepática y recibe, de la vena porta hepática, sangre desoxigenada que contiene nutrientes, fármacos y, en ocasiones microorganismos y toxinas recién absorbidos del tubo digestivo.

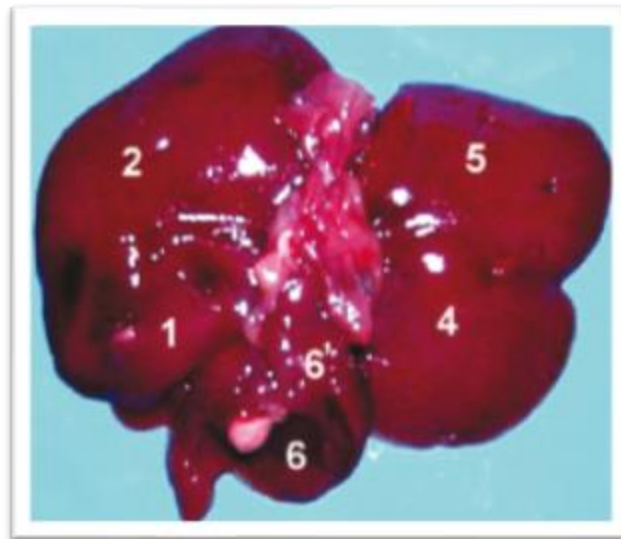
El hígado desempeña varias funciones en el organismo como son:

- Producción de bilis: este órgano sintetiza ácidos biliares que son excretados al duodeno a través de la vía biliar, siendo necesaria para la absorción de los compuestos lipídicos en el tracto intestinal.
- Metabolismo de los carbohidratos: gluconeogénesis, glucogenolisis glucogenogénesis.
- Eliminación de insulina y otras hormonas.
- Metabolismo de los lípidos: síntesis de colesterol y triglicéridos.
- Síntesis de factores de coagulación
- Detoxificación de la sangre: en este órgano los productos tóxicos llevan a cabo una serie de reacciones de transformación que los convierte en productos más hidrofílicos y por tanto más fácilmente excretables por vía urinaria.
- Transformación de amonio a urea.
- Deposito de múltiples sustancias, como glucosa (en forma de glucógeno), vitamina B 12, hierro y cobre (González, 2011).

## **2.5 Morfología del hígado de la rata Wistar.**

La rata de laboratorio (*Rattus norvegicus albinus* o rata de la cepa Wistar) ha sido utilizada como modelo para investigaciones médicas, biológicas y de diversa índole desde hace mucho tiempo, es la especie más empleada teniendo en cuenta el volumen de información existente acerca de ella (Möller y Vázquez, 2011).

El hígado se ubica sobre la cara caudal del diafragma extendiéndose a ambos lados del plano mediano desde el arco costal derecho hasta el izquierdo, presenta para su estudio las caras: parietal (cranial) de forma convexa relacionada al músculo del diafragma y una cara visceral (caudal) cóncava relacionada al estómago y parte craneal del duodeno. Está dividido como se observa en la Figura 9 en los lóbulos derechos (lateral 1 y medial 2), izquierdos (lateral 4 y medial 5), 6 cuadrado (muy pequeño) y caudado el cual presenta los procesos caudado y papilar (subdividido en parte dorsal y ventral). El proceso caudado toma contacto con el riñón derecho y el proceso papilar a cabalga sobre la curvatura menor del estómago.



**Figura 9. hígado de rata Wistar: 1. Lóbulo lateral derecho; 2. Lóbulo medial derecho; 4. Lóbulo lateral izquierdo; 5. Lóbulo medial izquierdo; 6. proceso caudado del lóbulo caudado (Möller y Vázquez, 2011).**

## **2.6 Etiología de afecciones hepáticas**

El hígado tiene una notable capacidad para regenerarse después de una lesión o inflamación y posee reservas de nutrientes a las cuales puede recurrir cuando es lesionado, sin embargo, debido a que es tan complejo, es susceptible a desarrollar una gran variedad de trastornos, algunos de los cuales son causados

por exceso en el consumo de alcohol o medicamentos, otros por infecciones como hepatitis vírica, cáncer y otros trastornos metabólicos. Cuando este órgano es afectado específicamente por hepatitis vírica, sus hepatocitos son lesionados o destruidos. Inicialmente puede tolerar y compensar el daño, debido a su capacidad regenerativa. Esta fase de la enfermedad hepática se denomina enfermedad hepática compensada, porque el hígado puede continuar todas sus funciones. Cuando el daño hepático es grave, ya no se puede regenerar el tejido hepático, y sus capacidades para filtrar y almacenar nutrientes se ven afectadas por el tejido cicatricial, esa fase terminal de la enfermedad hepática se denomina enfermedad hepática descompensada, porque el hígado no puede compensar la lesión que se está produciendo (Informe de PKID sobre la hepatitis pediátrica, 2003).

- **Toxicidad hepática:** Más de 1.000 fármacos pueden inducir toxicidad hepática, y el riesgo aumenta cuando la dosis diaria es superior a 50 mg o cuando el hígado está altamente implicado en la metabolización del fármaco. El mecanismo principal del daño hepático inducido por fármacos es el de disfunción mitocondrial y dismetabolismo lipídico, causado por el propio fármaco y / o por los metabolitos reactivos generados. La disfunción mitocondrial puede tener otras consecuencias nocivas, tales como estrés oxidativo, deficiencia energética, esteatosis por acumulación de triglicéridos y muerte celular. En asociación con la obesidad y la diabetes, los fármacos pueden inducir lesión hepática aguda, esteatosis e incluso esteatohepatitis, lo que puede conducir a la cirrosis (Vera *et al.*, 2013)

Otro tipo de toxicidad hepática es el hierro inducido. El hierro es un componente esencial del cuerpo que participa en un gran número de reacciones biológicas. Está presente en forma funcional en moléculas tales como citocromos, hemoglobina, mioglobina y enzimas dependientes del hierro, y un buen balance de hierro es necesario para evitar enfermedades. La sobrecarga de hierro puede ser causada por una amplia gama de condiciones adquiridas y hereditarias, como la hemocromatosis hereditaria, y esta condición se asocia con diversos efectos tóxicos, de los

cuales el más común es el daño hepático, con la deposición excesiva de hierro dando lugar a fibrosis y cirrosis.

La capacidad del hígado para metabolizar y ayudar a excretar xenobióticos hace que sea muy susceptible a daño, que puede ser reversible, pero también puede conducir a insuficiencia hepática fulminante y la muerte. La administración de altas dosis de tioacetamida (TAA) a ratas causa fibrosis, mientras que la cirrosis es provocada por dosis periódicas más bajas, acompañadas de altos niveles de ROS, la producción de moléculas pro inflamatorias y la activación de HSCs.

En humanos y animales, la hepatotoxicidad es el principal resultado de la exposición al tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>). Las alteraciones bioquímicas (niveles elevados de enzimas hepáticas en la sangre y pérdida de actividades enzimáticas en el hígado), o el examen histológico (degeneración grasa y necrosis de hepatocitos centrales, hematopenia, destrucción de organelos intracelulares, fibrosis y cirrosis). En ausencia de signos clínicos, niveles elevados de enzimas séricas como alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina y gamma glutamil transferasa pueden proporcionar evidencia de lesión hepatocelular (Vera *et al.*, 2013).

## **2.7 Pruebas directas de la función hepática**

### **2.7.1 Pruebas para la detección de lesiones hepatocitarias (enzimas séricas)**

Las transaminasas son enzimas que catalizan la reacción de transferencia del grupo amino (-NH<sub>2</sub>) de un aminoácido a un  $\alpha$ -cetoglutarato (un  $\alpha$ -cetoácido). Estas enzimas son importantes en la producción de varios aminoácidos, y su medición en sangre se utiliza para diagnosticar y rastrear muchas enfermedades, y en especial para evidenciar la presencia de daño hepático.

### **Aminotransferasas o transaminasas (TGO Y TGP)**

Las enzimas con actividad transaminasa se encuentran localizadas en las mitocondrias y en el citosol de las células eucariotas. En enzimología clínica, son importantes estas enzimas, la transaminasa glutámico pirúvica (TGP) o amino transferasa de alanina (ALAT), y la transaminasa glutámico oxalacética (TGO) o amino transferasa de aspartato (ASAT) (Álvarez y Amezcua, 1994).

La TPG, en orden decreciente de concentración, se encuentra en los siguientes órganos: hígado, riñón, corazón, musculo estriado y páncreas. Los niveles séricos de TGP se manifiestan considerablemente elevados en lesiones agudas del hepatocito (Álvarez y Amezcua, 1994).

Los tejidos en los cuales se encuentra la TGO son: corazón, hígado, musculo estriado, riñón y páncreas. Las cifras séricas de TGO aumentan considerablemente en lesiones agudas tanto del corazón como del hígado (Álvarez y Amezcua, 1994).

### 3. ANTECEDENTES

Las nanoemulsiones fabricadas con ingredientes de calidad grado alimenticio están siendo utilizadas cada vez más en la industria de alimentos para encapsular, proteger y suministrar componentes funcionales lipófilos, tales como lípidos biológicamente activos como ácidos grasos, vitaminas, conservadores y nutraceuticos (McClements & Rao; 2011). Los aceites esenciales se les ha adjudicado poder antioxidante y antimicrobiano, pueden ser encapsulados para proteger sus componentes activos a la oxidación y volatilización así como para mejorar su solubilidad en agua y enmascarar sabores para mejorar sus características organolépticas.

Algunos estudios se han centrado en la conservación de alimentos sólidos con aceites esenciales lo cual requiere el uso de vehículos adecuados, tales como nanoemulsiones, que son capaces no sólo para promover la dispersión de la parte acuosa de alimentos, sino también para mejorar la transferencia de masa dentro de la matriz del alimento (Donsi, *et al.*, 2014). El interés creciente hacia productos alimenticios “más verdes”, donde la seguridad está garantizada sin el uso de aditivos sintéticos, ha estimulado el estudio de los aceites esenciales como compuestos antimicrobianos. Sin embargo, con el fin de superar limitaciones relacionadas con su naturaleza lipofílica, el uso de aceites esenciales requiere su encapsulación en un vehículo adecuado (Donsi, *et al.*, 2014).

Actualmente ha crecido el interés de los productos antioxidantes naturales como tratamiento contra daño hepático, teniendo en cuenta el papel del estrés oxidativo en su patogénesis. Rašković y colaboradores (2014) utilizaron aceite esencial de romero para evaluar su efecto hepatoprotector en ratas Wistar con daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub>, ya que este aceite es uno de los más utilizados en la industria alimentaria por su poder capacidad antioxidante, y determinaron que además de tener buena capacidad antioxidante por el bloqueo de radicales libres que ejerce, también es capaz de mediar el daño hepático al activar los mecanismos de defensa fisiológica.

Al Attar *et al.*, (2014) determinaron la actividad protectora de extracto de hojas de romero sobre cirrosis hepática inducida por tioacetamida en ratas macho Wistar. Obteniendo como resultados la indicación que el extracto de romero posee propiedades hepatoprotectoras contra la cirrosis hepática y ellos adjudican esta actividad a los compuestos antioxidantes presentes en la planta de romero.



#### 4. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años ha sido reportado un alto número de pacientes con daño hepático alrededor del mundo, se estima que existen 800,000 muertes anuales en el mundo atribuidas a enfermedades por daño hepático, una de las enfermedades hepáticas considerada un problema de salud pública y de prioridad nacional es la cirrosis hepática, ya que es la tercer causa de mortalidad en hombres y la séptima en mujeres.

Por tal motivo en los últimos años el consumidor ha demandado productos alimentarios que les transmitan beneficios a la salud por medio de componentes bioactivos de origen natural, como consecuencia la necesidad de la industria de alimentos en explorar e investigar nuevas fuentes alimentarias que tengan compuestos bioactivos y así brindar salud a los consumidores. Una de estas fuentes alimentarias son las plantas como el romero y sus subproductos como el aceite esencial y extracto acuoso a los que se les han atribuido beneficios a la salud, sin embargo estos subproductos presentan ciertas limitaciones ambientales o su característica hidrofóbica en el caso del aceite esencial las cuales provocan que no sean aprovechados al máximo. Por esta razón es necesario mantener en buen estado los componentes bioactivos para que puedan llegar a su sitio de acción, lograr una mejor absorción y biodisponibilidad para aprovecharlos de mejor manera. También se deben explorar nuevas tecnologías que puedan lograr mantener, dirigir y liberar los compuestos bioactivos hasta su sitio de acción, una tecnología que ha tomado fuerza en los últimos años es la formulación de emulsiones y nanoemulsiones las cuales al reducir su tamaño de partícula se convierten en sistemas estables y pueden ser utilizadas para aprovechar algunos compuestos bioactivos.

## 5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 5.1 Objetivo general

Diseñar nanoemulsiones aceite en agua (O/W) de aceite esencial y extracto acuoso de romero, así como evaluar su efecto hepatoprotector en un modelo murino.

### 5.2 objetivos particulares

- Determinar la relación óptima surfactante-aceite esencial de romero y relación fase oleosa-fase acuosa, con base en el tamaño de partícula, PDI y potencial  $\zeta$ , para utilizar en el sistema *in vivo*.
- Evaluar actividad antioxidante de las nanoemulsiones utilizando tres métodos analíticos.
- Evaluar la actividad de transaminasas en suero de ratas sometidas a un modelo murino de daño hepático inducido químicamente.

## 6. HIPÓTESIS

Las nanoemulsiones O/W de aceite esencial de romero y extracto acuoso de romero aumentan la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos del romero y su actividad antioxidante produciendo un efecto hepatoprotector que se percibe por la actividad de las transaminasas.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

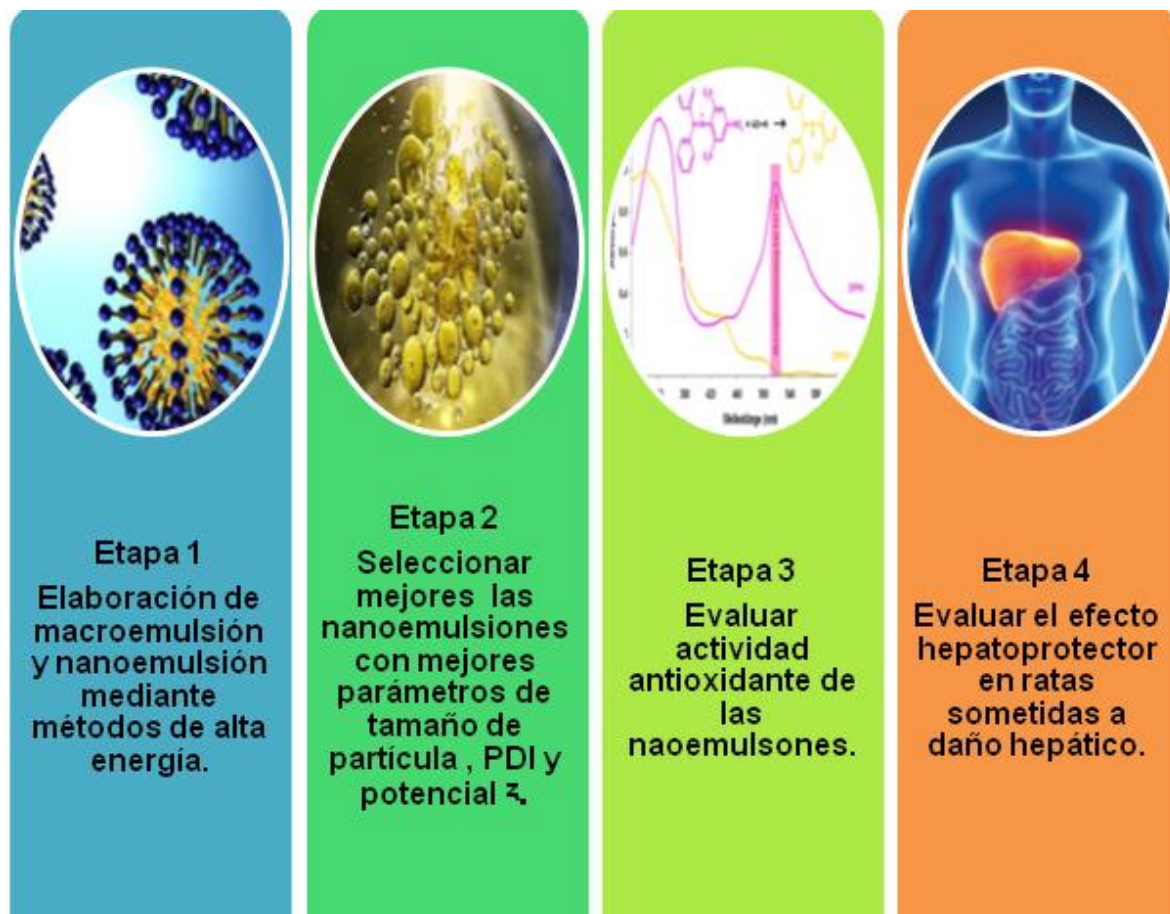
### 6.2 Materia prima.

- Para la elaboración de emulsiones aceite en agua (O/W) el aceite esencial de romero fue adquirido en AMCO INTERNACIONAL S.A DE C.V.
- Hojas de romero fueron adquiridas en Droguería Cosmopolita.
- Los surfactantes utilizados fueron Monolaurato de sorbitán (Tween 40; HLB 15.6) y Monolaurato de sorbitán (Span 20; HLB 8.6) adquiridos en sigma Aldrich.
- Los reactivos para la evaluación de la capacidad antioxidante fueron DPPH•, ABTS y FRAP.
- Tioacetamida adquirido en Sigma Aldrich.
- kit de determinación de transaminasas adquirido en Grupo MexLAB.

### 6.3 Equipos

- Homogenizador , Wigen Hauser
- Procesador Ultrasónico Cole Parmer 20KHz
- ZETASIZER Malvern, Nano-ZS
- Centrífuga de laboratorio Eppendorf 5804R
- Espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan
- Balanza analítica VELAB, LA 204
- Potenciometro HANNA, HI9811-5

## 6.4 Métodos



**Figura 10. Etapas de la investigación**

### 6.4.1 Elaboración del extracto acuoso

Se elaboró por extracción sólido-líquido a temperatura de ebullición y se mantuvo en agitación constante durante 1 h en una proporción 1:6 relación hoja seca de romero: agua, posteriormente se filtró, se centrifugó a 4750 rpm a una temperatura de 4 °C y se midieron °Brix para estandarizar la concentración de sólidos solubles. Se obtiene el sobrenadante y se almacena en refrigeración.

#### 6.4.2 Elaboración de la emulsión

La elaboración de la emulsión se llevó a cabo de acuerdo a la dosis requerida en el modelo *in vivo* 10 mg/kg de aceite esencial y 200 mg/kg de extracto acuoso de romero, para estandarizar la dosis el extracto acuoso fue liofilizado. La fase oleosa consistió en aceite esencial de romero, la fase acuosa en extracto de romero y el tensoactivo consistió en una mezcla de Tween 40 (HLB 15.6) y Span 20 (HLB 8.6) para determinar el HLB requerido se utilizaron números de HLB de 10 a 15.

$$\%(a) = \frac{(X - HLB_b)}{HLB_a - HLB_b} \times 100$$

$$\%(b) = 100 - \%(a)$$

Donde:

X= número de HLB que se requiere

HLB b= número de HLB del surfactante b (Span 20)

HLB a= número de HLB del surfactante a (Tween 40)

La fase oleosa se fijó en 0.3% para cumplir los requerimientos de la dosis de aceite esencial (10 mg/kg) reportada por (Rašković *et al.*, 2014). Una vez fijada la cantidad de fase oleosa se realizaron 4 formulaciones variando la cantidad de surfactante para obtener relaciones aceite esencial de romero: surfactante 1:1, 1:1.5, 1:2 y 1:3. La fase acuosa fue ajustada de acuerdo a cada relación. En la relación 1:1 se utilizó (99.4%), en la relación 1:1.5 (99.25%), 1:2 99.1% y 1:3 (98.8%), cumpliendo con la dosis (200mg/kg) reportada por (Al Attar *et al.*, 2014).

### 6.4.3 Producción de la nanoemulsión

30 mL de la emulsión primaria fueron sometidos a un procesador ultrasónico de 20 KHz y una potencia máxima de 750 W Cole-Parmer instruments, modelo CPX 750, EUA, las condiciones de sonicación fueron 30% de amplitud, 10 min de tiempo, temperatura de 25°C y un baño de hielo para controlar la temperatura. Estas condiciones se emplearon debido a las investigaciones anteriormente realizadas en el equipo de trabajo.

#### 6.4.3.1 Análisis de tamaño de partícula PDI y potencial Z

La medición del tamaño de partícula, potencial Z y PDI se realizó en un ZETASIZER Malvern, Nano-ZS Worcestershire, UK trabajando a 633 nm en 25°C, tomando una alícuota de 20 µL de la nanoemulsión a analizar, se agregaron 2 mL de agua inyectable y se procedió a realizar la lectura en el equipo. De la muestra se obtuvieron los 3 resultados de los parámetros a analizar.

### 6.4.5 Actividad antioxidante

#### 6.4.5.1 Ensayo DPPH.

Se utilizó el método propuesto por Duan *et al.*, (2007) con algunas modificaciones, se utilizó un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan. En este ensayo espectrofotométrico se utilizó el reactivo DPPH, se preparó una solución 0,1mM de DPPH en etanol al 96 %. Se colocaron 200 µL de la muestra diluida (100 µL de emulsión / 1 mL) en etanol al 96 % en un vial y 1.8 mL del reactivo DPPH. Esta solución se incubó por 30 min en total oscuridad. La absorbancia fue medida a 515 nm comparada con un blanco de etanol al 96 % sin la muestra. El ensayo se realizó por triplicado y para obtener el porcentaje de inhibición se obtuvo mediante la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} \times 100$$

#### 6.4.5.2 Ensayo FRAP

Se utilizó el método descrito por Pulido y colaboradores (2000) con algunas modificaciones. Se pusieron a reaccionar 25  $\mu$ L de muestra diluida (100  $\mu$ L de emulsión / 1mL) en etanol al 96 %, 375  $\mu$ L de agua destilada y 3 mL del reactivo de FRAP, durante 30 min a una temperatura de 37 °C y en ausencia de luz. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 593 nm. Como blanco de reacción se utilizó 400  $\mu$ L de agua destilada y 3 mL reactivo de FRAP. La curva patrón, se preparó a partir de concentraciones conocidas de Trolox. Los resultados de la actividad antioxidante se expresaron como  $\mu$ g equivalentes Trolox por mL de emulsión.

#### 6.4.5.3 Ensayo ABTS

El ensayo se realizó de acuerdo con la técnica de Re *et al.*, (1999) haciendo una mezcla de una solución acuosa del reactivo ABTS a una concentración de 7 mM con una solución de persulfato potásico a una concentración final de 2.45 mM, y posteriormente se mantuvo la mezcla durante 16 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Después de las horas de incubación se ajustó la absorbancia diluyendo con etanol a una longitud de onda de  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm. Enseguida se adicionaron a 3.5 mL del reactivo ABTS 50  $\mu$ L de la nanoemulsión diluida con etanol al 96 % diluida (100  $\mu$ L de emulsión / 1ml) en etanol al 96 %, luego se dejó incubar por 30 min para su posterior lectura a 734 nm.

#### 6.4.6 Sistema *in vivo*

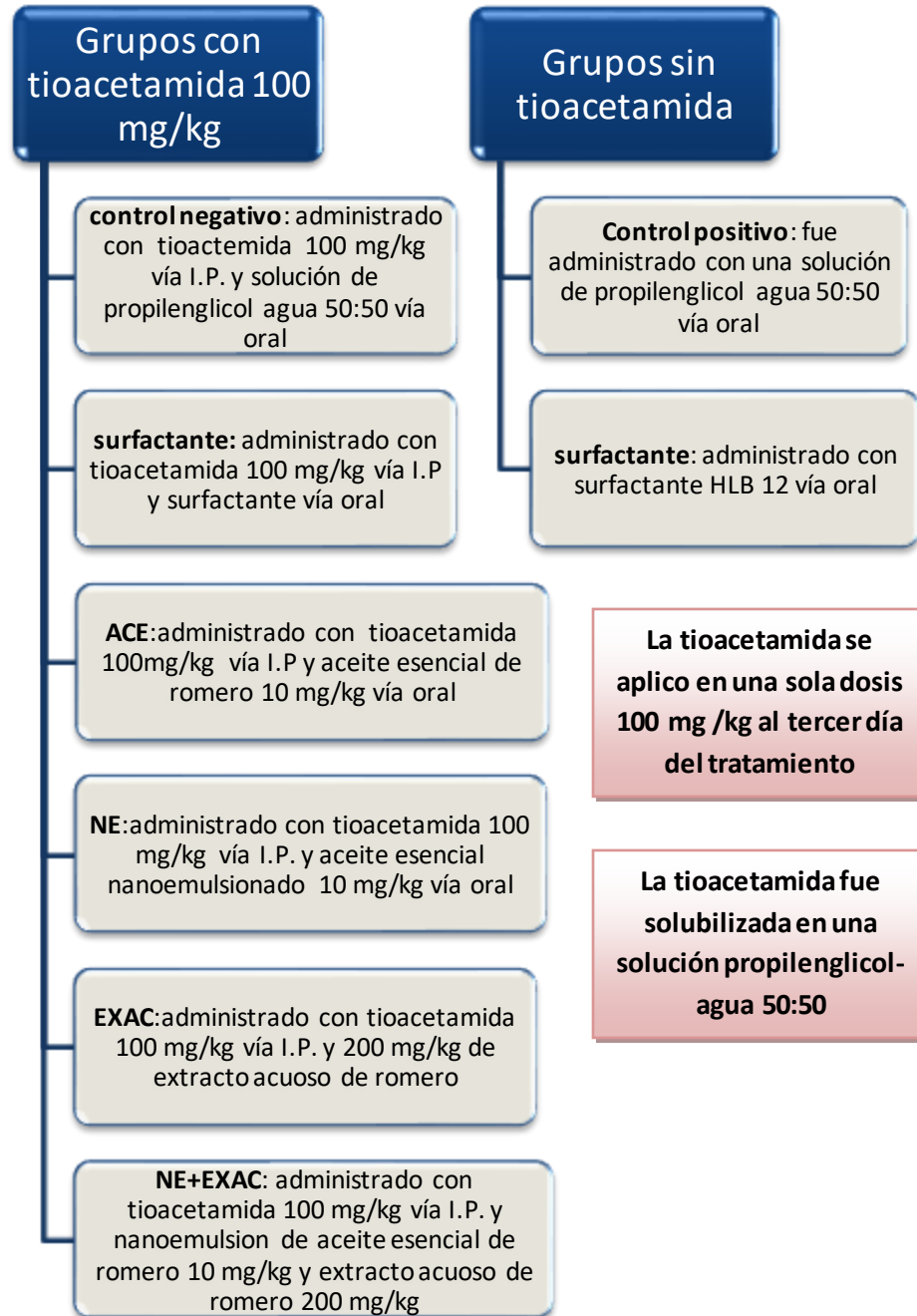
Se emplearon 8 grupos de ratas de la cepa Wistar (n=5) con peso promedio entre 200 y 300 g. Durante los experimentos se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas de la universidad Veracruzana región Xalapa Veracruz. En cajas de acrílico translucidas (43 x 50 x 20 cm), con un ciclo de luz

oscuridad de 12 x 12 horas (la luz se encendió a las 7:00 am), con libre acceso de agua y alimento.

El modelo *in vivo* se realizó de acuerdo a lo reportado por Túnez *et al.*, (2007), realizando algunas modificaciones en la dosis aplicada de tioacetamida 100 mg/kg en una sola dosis al tercer día de tratamiento.

En la Figura 11 se describe la distribución de los animales en los 8 grupos, así como las dosis empleadas en los diferentes tratamientos. El tratamiento fue durante 5 días y la dosis del tratamiento se dividió en dos aplicándola cada 12 h (8 am-8 pm). La administración de los tratamientos fue vía oral utilizando una cánula esofágica de acero inoxidable (CAT 791), la inducción del daño hepático fue vía intraperitoneal. Todos los procedimientos y manipulación de los animales se realizaron a lo establecido por la norma (NOM-062-200-1999), especificaciones y técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.





**Figura 11. Diseño del Modelo *in vivo***

#### 6.4.6.1 Eutанизación y obtención de muestras

Finalizando el tratamiento los sujetos se sometieron a 12 horas de ayuno y posteriormente fueron eutanizados con sobre dosis de anestesia (50 mg/kg) con pentobarbital sódico 6.3%. Se tomaron muestras de sangre por punción cardiaca y se colocaron en tubos de vidrio estériles para su centrifugación a 3500 rpm durante un tiempo de 5 min a 4°C en una centrífuga de laboratorio ROTOLAVIT. Se separó el suero de las muestras sanguíneas y se colocó en eppendorf estériles de 1.5 mL y se almacenaron a -20°C para el posterior análisis de enzimas transaminasas. Posteriormente se extrajeron los hígados y se realizó el análisis macroscópico y se pesaron.

#### 6.4.6.2 Determinación de Transaminasas (TGO y TGP) ó alanina aminotransferasa (ALAT) y aspartato aminotransferasa (ASAT). (Anexo 7)

Ambos reactivos se prepararon por separado, bajo las mismas indicaciones. Se preparó el reactivo de trabajo (RT) mezclando 1 mL de reactivo 1 el cual tiene la siguiente composición (Buffer pH 7.5±0.1, α-cetoglutarato, L-alanina, LDH y azida) con 200 µL de reactivo 2 que tiene la siguiente composición ( NADH y estabilizadores), este reactivo se atemperó a 37 °C para poder empezar a utilizarlo. Se colocó un mililitro de RT en un tubo de ensaye para cada sujeto de experimentación. A cada tubo se le agregó 100 µL de suero, y se incubó a 37 °C durante 60 s, al transcurrir dicho tiempo se colocó en una celda de plástico para UV y se leyó en espectrofotómetro UV/Vis a 340 nm, contra blanco de agua destilada, las lecturas se realizaron a los 60, 120 y 180 segundos. La muestra se leyó por duplicado. A partir de la absorbancia se determinó la actividad de TGO y TGP, respectivamente, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad transaminasa } \frac{UI}{L} = \frac{\Delta A}{\text{min}} * 1768$$

El factor 1768 viene de la siguiente fórmula:

$$\frac{UI}{L} = \frac{(A1 - A2) * 1.1 * 100}{1 * 6.2 * 0.1} = (A1 - A2) * 1768$$

Donde:

(A1-A2) es el cambio de absorbancias

1.1 es el volumen total de relación en mL

1000 es la conversión de IU/ mL a IU/L

1 es el espesor de la celda en cm

6.2 es la absorptividad milimolar del NADH

0.1 es el volumen de la muestra

#### **6.4.6 Análisis estadístico**

Todos los datos se expresaron como la media ± error estándar. Se realizó análisis de varianza de una vía ANOVA, seguido de una prueba de medias de mínimos cuadrados Tukey. Usando el software estadístico JMP (2013). Se determinó la significancia con un valor de  $\alpha \leq 0.05$  (véase anexos).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Caracterización de las nanoemulsiones

#### 7.1.1 Barrido de concentración de HLB y tamaño de partícula

En el siguiente cuadro 3 se pueden observar los resultados obtenidos de la relación aceite:surfactante y número de HLB en el tamaño de partícula expresado como diámetro (Dz) de partícula en (nm), se observa que existe relación del número de HLB y la concentración de surfactante con respecto al tamaño de partícula, encontrando el menor tamaño de partícula, en HLB 12 para todas las concentraciones 1:1 v/v 75.54nm, 1:1.5v/v **50.03 nm**, 1:2 v/v 71.08 nm, 1:3 v/v 73.81 nm y el mayor tamaño de partícula en HLB 14 en la concentración 1:3 v/v 437.23 nm. El menor tamaño de partícula de la emulsión aceite esencial como fase dispersa y extracto acuoso de romero como fase continua se obtuvo en la concentración 1:1.5 v/v de aceite esencial de romero-surfactante, esto difiere con lo reportado por (Walter *et al.*, 2017) quienes observaron en emulsiones de aceite de pescado que a mayor concentración de surfactante el tamaño de partícula disminuye, sin embargo (Jo *et al.*, 2014) reportan en emulsiones de cinamaldehído, que a mayor cantidad de surfactante se pueden formar micelas y obtener tamaños de diámetro de partícula elevados, lo cual concuerda con lo obtenido en esta investigación, porque el tamaño de partícula más elevado se dió en la mayor concentración de surfactante utilizada 1:3 v/v.

Sistemas coloidales con tamaños de partícula <100 nm son considerados nanoemulsiones, en la producción de la emulsión de aceite esencial de romero como fase dispersa y extracto acuoso de romero como fase continua se obtuvo un tamaño de **50.03 nm**, lo cual concuerda con lo reportado por McClements y Rao, (2011), estos autores sostienen que el tamaño de gota para que una emulsión sea considerada nanoemulsión debe estar en el intervalo de 10 – 100 nm, también han reportado que en este intervalo de tamaño de partícula las emulsiones tienden a una mayor estabilidad. Es importante destacar que el obtener una nanoemulsión con tamaño de partícula <100 nm es sumamente

valioso para ser aplicada a un modelo *in vivo*, de acuerdo a McClements y Rao, (2011) en estudios realizados *in vitro* entre menor es el tamaño de partícula se genera mayor biodisponibilidad de compuestos lipofílicos, en este caso el tamaño de gota obtenido en nanoemulsiones de aceite esencial de romero como fase dispersa puede aumentar la biodisponibilidad del aceite esencial y mejorar su absorción.

**Cuadro 3. Tamaño de partícula en relación al número de HLB. Se muestran valores de tamaño de partícula en nm  $\pm$  desviación estándar**

Relación Aceite:Surfactante HLB	Tamaño de partícula (nm)			
	1:1 v/v	1:1.5 v/v	1:2 v/v	1:3 v/v
15	125.47 $\pm$ 53.65	387.0 $\pm$ 41.47	270.77 $\pm$ 29.63	338.87 $\pm$ 40.68
14	319.67 $\pm$ 33.86	478.3 $\pm$ 64.41	138.13 $\pm$ 21.15	437.23 $\pm$ 72.35
13	79.987 $\pm$ 4.27	131.70 $\pm$ 2.57	140.80 $\pm$ 57.85	218.37 $\pm$ 16.89
12	75.547 $\pm$ 1.11	50.037 $\pm$ 1.46	71.087 $\pm$ 2.92	73.817 $\pm$ 0.41
11	195.43 $\pm$ 0.92	137.4 $\pm$ 2.20	107.23 $\pm$ 0.80	117.07 $\pm$ 3.60
10	298.03 $\pm$ 2.79	235.9 $\pm$ 4.91	127.70 $\pm$ 0.7	135.80 $\pm$ 1.21

### 7.1.2 Índice de polidispersión

En el cuadro 4 se pueden observar los resultados obtenidos del índice de polidispersión el cual indica que tan homogéneo es el tamaño de partícula en las emulsiones formuladas a diferentes HLB y a diferentes concentraciones (1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3 v/v aceite esencial de romero-surfactante). Podemos observar que la formulación con HLB 12 en concentración de 1:1.5 es donde se obtiene un PDI menor **0.204**, valores de polidispersión mayores a 0.5 indican amplia distribución del tamaño de partícula en una emulsión (Wu *et al.*, 2011; salvia *et al.*, 2013), el índice de polidispersión más elevado se obtuvo en HLB 13 en la concentración 1:2, PDI 0.725. Este es un parámetro importante en la caracterización de emulsiones, ya que el tener un índice de polidispersión en un rango entre 0.2-0.5 es sinónimo de estabilidad, sí se tiene un PDI mayor a 0.5 pueden presentarse

fenómenos de inestabilidad como floculación, maduración de Ostwald, sedimentación o cremado.

De acuerdo a los resultados obtenidos la mejor nanoemulsión fue en HLB de 12 en una relación aceite: surfactante 1:1.5, obteniendo **50.03 nm** y **0.204** de tamaño de partícula y PDI respectivamente, estos resultados son similares a los obtenidos por Mostafa *et al.*, (2015), en los que se obtuvo para nanoemulsiones de aceite esencial de comino elaboradas con HLB 16.7 un tamaño de partícula de 69 nm y un PDI de 0.23, y afirman que estos parámetros le confieren estabilidad a sus emulsiones.

**Tabla 4. Índice de polidispersión en relación al HLB. Se muestran valores de PDI  $\pm$  desviación estándar**

Relación Aceite:Surfactante HLB	Índice de polidispersión (PDI)			
	1:1 v/v	1:1.5 v/v	1:2 v/v	1:3 v/v
15	0.536 $\pm$ 0.010	0.584 $\pm$ 0.145	0.52567 $\pm$ 0.057	0.45667 $\pm$ 0.064
14	0.407 $\pm$ 0.025	0.566 $\pm$ 0.125	0.30800 $\pm$ 0.049	0.48067 $\pm$ 0.045
13	0.449 $\pm$ 0.016	0.27100 $\pm$ 0.010	0.72500 $\pm$ 0.016	0.30967 $\pm$ 0.015
12	0.320 $\pm$ 0.013	0.20400 $\pm$ 0.001	0.42400 $\pm$ 0.058	0.28100 $\pm$ 0.015
11	0.211 $\pm$ 0.006	0.248 $\pm$ 0.004	0.33833 $\pm$ 0.003	0.37133 $\pm$ 0.027
10	0.333 $\pm$ 0.007	0.271 $\pm$ 0.024	0.26033 $\pm$ 0.000	0.24133 $\pm$ 0.005

### 7.1.3 Potencial $\zeta$

En el cuadro 5, se muestra que a menor HLB se presentan los mayores valores absolutos de potencial  $\zeta$  y que en HLB intermedio disminuye su valor, sin embargo de acuerdo a los parámetros de tamaño de partícula y PDI la emulsión de mayor interés es la elaborada con HLB 12 relación 1:1.5 v/v que obtuvo un Potencial de -26.70 mV. El potencial  $\zeta$  es una medida electrostática que puede dar información de que tan estable es fisicoquímicamente una nanoemulsión, es un indicador de estabilidad porque determina que tanta repulsión hay entre las partículas del sistema coloidal, esto es importante debido a que en algunos

sistemas como las nanoemulsiones se busca que exista cierta repulsión entre las partículas para evitar fenómenos de agregación que desestabilicen el sistema. Se ha reportado que el valor óptimo para la estabilización electrostática del sistema coloidal es un potencial  $\zeta$  entre 30 y 60 mV, potenciales entre 5 y 15mV, indican una floculación limitada y entre 3 y 5 mV se encuentra la máxima floculación (Heurtault *et al.*, 2003), de acuerdo a los valores obtenidos, el HLB de 12 con una relación de 1:1.5 Aceite:Surfactante, presentó un potencial  $\zeta$  aceptable, el cual puede conferir buena estabilidad a la nano emulsión. Mostafa *et al.*, (2015) obtuvieron potenciales en un rango entre -8 y -33 mV en nanoemulsiones de aceite esencial de comino con HLB 16.7 y de acuerdo al potencial obtenido las definen como estables.

**Tabla 5. Potencial  $\zeta$  en relación al HLB. Se muestran valores de potencial  $\zeta \pm$  desviación estándar**

Aceite:Surfactante HLB	Potencial $\zeta$ (mV)			
	1:1 v/v	1:1.5 v/v	1:2 v/v	1:3 v/v
15	-18.533±0.351	-24.028±0.379	-20.867±0.838	-20.900±0.458
14	-15.133±0.602	-33.367±2.660	-22.200±1.153	-24.000±2.338
13	-23.267±1.3316	-19.867±1.235	-23.800±4.422	-22.667±1.331
12	-17.667±2.602	-26.700±1.129	-23.133±1.150	-23.133±0.709
11	-19.233±0.808	-32.183±2.510	-28.067±2.315	-27.733±1.950
10	-26.333±0.288	-28.184±0.503	-30.733±0.950	-30.033±0.208

## 7.2 Actividad antioxidante

### 7.2.1 Porcentaje de inhibición del radical DPPH, FRAP Y ABTS

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de la determinación de actividad antioxidante por medio de las técnicas % de inhibición del radical DPPH, FRAP y ABTS. La evaluación antioxidante se realizó a las nanoemulsiones con las mejores características de tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial  $\zeta$ , a HLB de 12 a diferentes relaciones Aceite:Surfactante

Los resultados obtenidos para el porcentaje de inhibición del radical DPPH muestran que las diferentes concentraciones de surfactante no tienen efecto sobre el porcentaje de inhibición del radical DPPH, el tamaño de partícula tampoco influye en el porcentaje de inhibición, en cuanto a la actividad antioxidante determinada por el ensayo *FRAP* no existe relación entre la disminución del tamaño de partícula y la cantidad de  $\mu\text{g}$  de equivalentes de Trolox/mL, sin embargo el contenido de surfactante si presenta un efecto sobre la actividad antioxidante, ya que al aumentar la concentración del tensoactivo, la cantidad de  $\mu\text{g}$  equivalentes de Trolox/mL disminuye, la mayor actividad antioxidante se presenta en la formulación con la concentración más baja de tensoactivo HLB 12 1:1 v/v **247.66 $\pm$ 11.92  $\mu\text{m}$  Eq-Trolox/mL**, y la menor actividad antioxidante se obtuvo en la formulación con mayor concentración de tensoactivo HLB 12 1:3 v/v(**160.83 $\pm$ 14.93  $\mu\text{m}$  Eq-Trolox/mL**). Choe y Min en 2006 reportaron que algunas veces los tensoactivos pueden ser pro oxidantes, debido a la interacción con los componentes de la fase acuosa (extracto acuoso de romero) ya que los extractos acuosos de plantas tienen un alto contenido de minerales, esto podría ser la causa del porque a mayor concentración de tensoactivo las nanoemulsiones presentan menor actividad antioxidante. En la tabla también se muestran los resultados del ensayo ABTS, en esta prueba de actividad antioxidante se mantiene la tendencia de que el tamaño y la concentración del tensoactivo no alteran la actividad antioxidante ya que en todas las formulaciones el número de  $\mu\text{g}$  Eq-Trolox/mL se mantiene similar.

Mostafa *et al.*, (2015) evaluaron el porcentaje de inhibición de nanoemulsiones de aceite esencial de comino, y obtuvieron un porcentaje de inhibición del radical DPPH de 81%, y lo compararon con un antioxidante sintético BHT, obteniendo un porcentaje de inhibición de 52% y concluyeron que el aceite esencial de comino tiene una actividad antioxidante aceptable, las nanoemulsiones de romero presentaron un rango de porcentaje de inhibición de **69.59-73.85 %**, este intervalo se encuentra entre el porcentaje de inhibición del aceite esencial de comino y el antioxidante sintético BHT, por lo tanto nanoemulsiones de aceite esencial y extracto acuoso de romero muestran alto



potencial antioxidante. Wang *et al.*, (2008) realizaron una comparación de la actividad antioxidante del aceite esencial de romero encontrando que su porcentaje de inhibición es de 62.45%, y también realizaron el porcentaje de inhibición para algunos de sus componentes bioactivos en los que obtuvieron como resultado para  $\alpha$ -pineno 45.61%,  $\beta$ -pineno 46.21% y 1,8-cineol 42.7%, las nanoemulsiones de romero elaboradas en esta investigación tienen mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH que los compuestos y el aceite esencial reportado por Wang y colaboradores (2008), ya que las nanoemulsiones tienen compuestos hidrofílicos por parte de la fase acuosa (extracto acuoso de romero) y compuestos lipofílicos de la fase oleosa (aceite esencial de romero), esto podría ocasionar un efecto sinérgico entre ambas fases y potenciar la actividad antioxidante.

Chen *et al.*, (2015) evaluaron la actividad antioxidante de un extracto acuoso de romero por medio de las técnicas FRAP y ABTS, para el ensayo FRAP obtuvieron **226  $\mu\text{m Eq-Trolox/mL}$** , este valor es menor al obtenido por las nanoemulsiones de aceite esencial y extracto acuoso de romero **247.66  $\mu\text{m Eq-Trolox/mL}$** , este resultado sigue la tendencia de lo obtenido en el ensayo de % de inhibición del radical DPPH, ya que Chen y colaboradores (2015) solo analizaron la actividad antioxidante de los compuestos hidrofílicos del romero, y en las nanoemulsiones se analizan compuestos hidrofílicos y lipofílicos. Resultados similares se obtuvieron para el ensayo ABTS, ya que (Chen *et al.*, 2015) obtuvieron en su extracto acuoso de romero **273.75  $\mu\text{m Eq-Trolox/mL}$** , en comparación con nuestro estudio, en el que se obtuvieron **349.80  $\mu\text{m Eq-Trolox/mL}$** , se obtiene una mayor cantidad de  $\mu\text{m Eq-Trolox/mL}$  en las nanoemulsiones de romero ya que podría existir un efecto sinérgico de ambas fases del sistema coloidal.

Los resultados de estas pruebas antioxidantes son prometedores y de suma importancia porque el estrés oxidativo surge en sistemas biológicos después de una larga exposición a oxidantes, o una disminución de la capacidad antioxidante del sistema endógeno, o ambos y esta frecuentemente asociado a la generación

de radicales libres como las especies reactivas oxigenadas, las cuales normalmente están implicadas en la patología de algunas enfermedades como daño hepático y cáncer.

Cuando se forma un exceso de radicales libres, pueden causar la inhibición del sistema endógeno antioxidante que está compuesto por un sistema enzimático (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasas), estos generan efectos letales en las células por la oxidación de lípidos, proteínas y enzimas, ocasionalmente reacciones en cadena que permiten la producción de radicales libres y aumento del daño de tejidos, sin embargo es posible disminuir o atenuar el riesgo de enfermedades ocasionadas por estrés oxidativo, una manera de hacerlo es la ingesta de antioxidantes de origen exógeno, para retardar o inhibir estas reacciones.

**Cuadro 6. Actividad antioxidante. porcentaje de inhibición de radical DPPH, FRAP Y ABTS± desviación estándar**

Concentración surfactante-fase oleosa	Tamaño de partícula (nm)	% Inhibición (DPPH)	FRAP ( $\mu$ m de equivalente de Trolox/mL)	ABTS ( $\mu$ m Eq. de Trolox/ mL)
HLB 12 1:1	75.54±1.11	73.85±0.821	247.66±11.92	349.80 ± 1.3
HLB 12 1:1.5	50.03±1.46	73.20±0.669	223.73±12.47	349.64 ± 0.9
HLB 12 1:2	71.08±2.92	73.21±4.385	174.05±13.34	349.43 ± 1.6
HLB 12 1:3	73.8±0.41	69.59±1.883	160.83±14.93	349.19 ± 0.9

### **7.3 Modelo *in vivo***

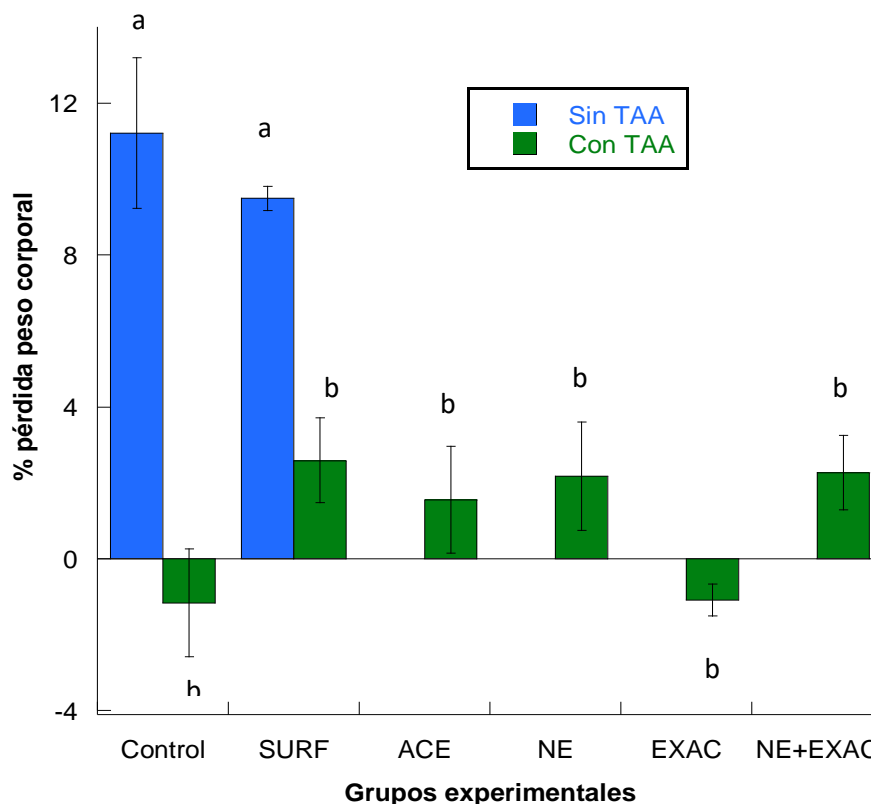
Después del diseño de las nanoemulsiones, su caracterización (tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial) y la determinación de la actividad antioxidante por los ensayos (% de inhibición del radical DPPH, FRAP y ABTS) se determinó que la mejor nanoemulsión para llevar al modelo *in vivo* fue la HLB 12 concentración 1:1.5 v/v, ya que es en la que se obtiene menor tamaño de partícula, mejor índice de polidispersión, potencial y también presenta buena actividad antioxidante

#### **7.3.1 Pérdida de peso corporal**

En la siguiente Figura 12 se muestran los resultados del porcentaje de pérdida de peso corporal después de 5 días de tratamiento. Se observa que el grupo control positivo fue el que tuvo un mayor incremento en el peso corporal 11.21%, seguido del grupo surfactante que ganó 9.49%, entre estos grupos no se muestran diferencias significativas (anexo 1).

Los siguientes grupos muestran diferencias significativas contra los grupos control positivo y surfactante, pero no muestran diferencias significativas entre ellos (anexo1). El grupo control negativo el cual fue administrado vía intraperitoneal con tioacetamida tuvo una pérdida de peso corporal de 1.16%, el grupo surfactante con tioacetamida ganó 2.58% de peso corporal, el grupo tratado con nanoemulsión de aceite esencial de romero y extracto acuoso de romero con TAA (NE+EXAC) tuvo un incremento del 2.26% de peso corporal, el grupo con el tratamiento de aceite esencial nanoemulsionado (NE) con tioacetamida incrementó su peso corporal 2.17%, el grupo que recibió el tratamiento con aceite esencial (ACE) con tioacetamida aumentó su peso corporal 1.24%, el grupo tratado con extracto acuoso de romero y tioacetamida (EXAC) tuvo un decremento en el porcentaje de peso corporal de 1.03%. El aumento o decremento del % de peso corporal es mínimo, ya que el tiempo del modelo murino es corto y no se alcanza a notar una diferencia importante en cuanto a este parámetro. Sin embargo la tendencia obtenida es normal, ya que los grupos que no fueron

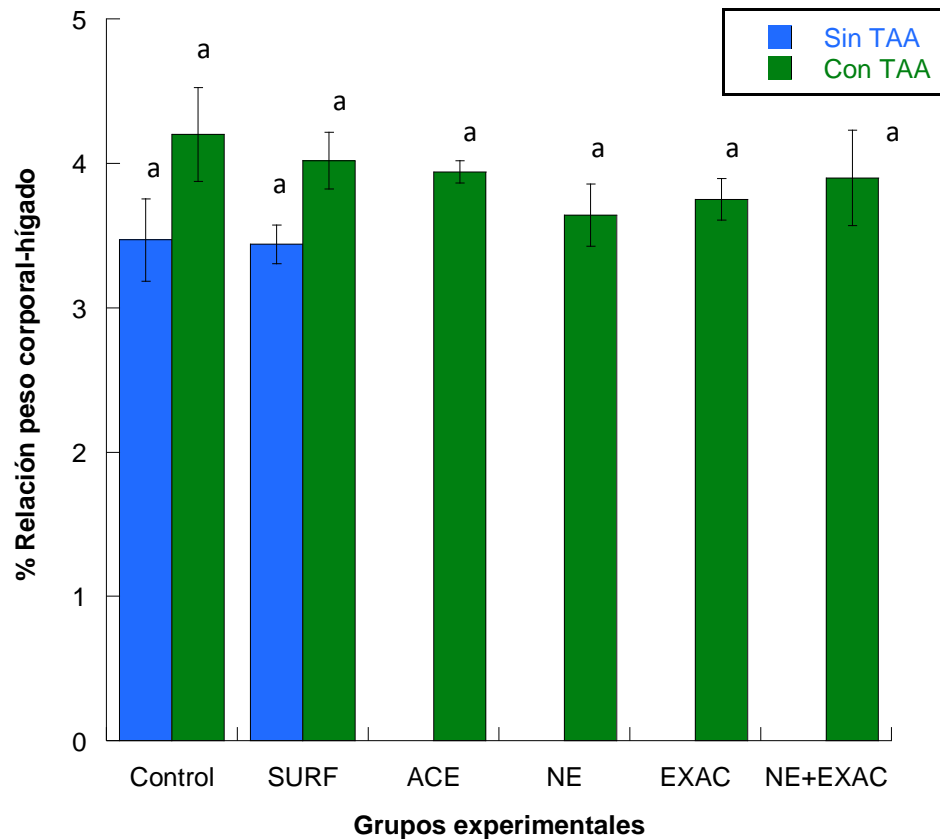
administrados con tioacetamida son los que tuvieron un mayor incremento en el % de peso corporal, los grupos tratados con (NE+ EXAC), (NE), (ACE) y (Surfactante con TAA) tuvieron un ligero aumento y los grupos, (EXAC) y (control negativo) presentaron decremento en % de peso corporal. Este es un parámetro importante ya que la pérdida de peso corporal puede ser un indicador de daño hepático, Méndez y colaboradores (2003) reportan que una reducción de peso pronunciada y acelerada desarrolla fibrosis o inflamación portal, también puede causar un incremento en los niveles circulantes de ácidos grasos libres derivados de la movilización del tejido adiposo, incrementando sus niveles intrahepáticos favoreciendo el stress oxidativo, peroxidación de lípidos e inducción de citocinas; que en conjunto empeoran el daño hepático.



**Figura 12. Pérdida de peso corporal. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $P < 0.001$ ).**

### 7.3.2 Relación peso corporal-hígado

Se puede observar en la siguiente Figura 13 la relación peso corporal-hígado expresado en porcentaje, comparando los grupos no existen diferencias significativas, sin embargo si existe un cambio en la relación peso corporal-hígado obteniendo un mayor % de peso corporal-hígado en el grupo control negativo, este dato concuerda con lo publicado por (Olave *et al.*, 2014), quienes reportan que el aumento en el peso de los órganos puede ser signo de una enfermedad o anomalía patológica. El grupo tratado con surfactante más tioacetamida es el segundo grupo con mayor % de peso corporal-hígado, los grupos con tratamiento (ACE,NE,EXAC,NE+EXAC) están por abajo del grupo control negativo (TAA), esto podría indicar que todos los grupos con tratamiento a pesar de que su relación peso corporal-hígado es mayor que la del grupo control positivo tienen un efecto benéfico contra la hepatotoxicidad inducida por TAA, el grupo con el tratamiento de aceite esencial nanoemulsionado (NE) fue el que obtuvo mejores resultados, ya que la relación peso corporal-hígado fue la que más se acercó al grupo control positivo, esta tendencia es similar a la obtenida por Al-Attar y Al-Rethea en 2017, ellos obtuvieron en un modelo de fibrosis hepática inducida por TAA, un mayor peso corporal-hígado en el grupo control negativo que fue administrado sólo con TAA y la tendencia fue la misma a los resultados obtenidos en los grupos con tratamiento en este modelo murino. Al-Attar y Al-Rethea en 2017 observaron menor peso corporal-hígado en el grupo tratado con omega-3. También Al-Attar y Shawush, (2015) obtuvieron resultados similares en un modelo de cirrosis hepática inducida por TAA, ellos obtuvieron una ganancia de peso corporal-hígado estadísticamente significativa en el grupo tratado con TAA y el grupo tratado con TAA+extracto de romero aumentó con respecto al grupo control positivo pero se mantuvo por abajo del grupo control negativo (TAA).



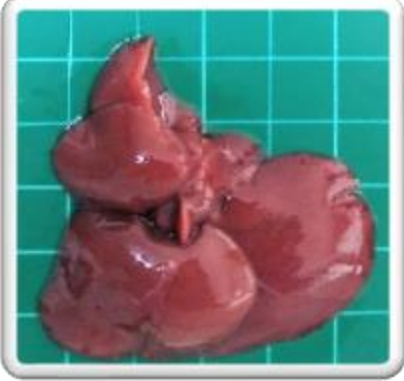
**Figura 13. % relación peso corporal-hígado. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa. (Anexo 2).**

### 7.3.2 Fotografías de hígados a nivel macroscópico

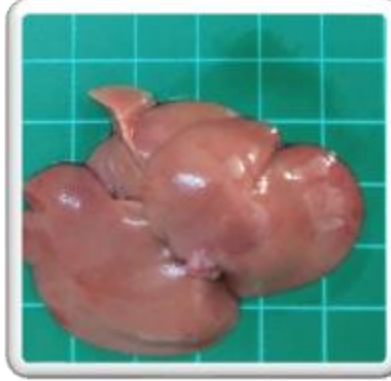
En las siguientes imágenes se pueden observar fotografías de los hígados de los grupos experimentales, se seleccionó una sola foto por grupo, ya que no presentaban diferencias entre los sujetos de un mismo grupo, en la Figura 14A control positivo se puede notar como es un hígado completamente sano en el cual el color es rojo intenso con tendencia a marrón, la superficie es totalmente lisa y su textura es suave. En la Figura 14B grupo control negativo (TAA) se puede

observar que el color del hígado ha cambiado lo cual es un indicador de daño hepático este cambio es considerado como ictericia, el color del hígado de este grupo tiende a un color pálido amarillento, también se alcanza a notar el comienzo de fibrosis por la formación de nódulos. El hígado del grupo NE+EXAC con TAA Figura 14C muestra un color similar al hígado del grupo control positivo, presenta un color rojo intenso y superficie lisa, por esta razón a nivel macroscópico no se aprecia algún tipo de daño, comparándolo con el hígado del grupo control negativo (TAA) Figura 14B, se observa que a nivel macroscópico el tratamiento NE+EXAC con TAA Figura 14C protege la estructura del hígado. El hígado del grupo tratado con aceite esencial de romero (ACE) y TAA Figura 14D tampoco muestra indicadores de daño a nivel macroscópico, presenta una tonalidad roja intensa y la superficie es totalmente lisa. El hígado del grupo tratado con EXAC Figura 14E muestra un ligero color pálido, pero se mantiene totalmente lisa y blanda su estructura, por lo cual podemos decir que no existe daño a nivel macroscópico, uno de los tratamientos en el cual se observó un buen resultado a nivel macroscópico fue el tratamiento con aceite esencial nanoemulsionado (NE) Figura 14F porque el hígado mantiene un color rojo intenso, superficie completamente lisa y una estructura íntegra, el hígado del grupo tratado con tioacetamida y surfactante Figura 14G presenta un color pálido, similar al grupo control negativo, es decir que el surfactante no tiene un efecto hepatoprotector, y por último se muestra la fotografía de grupo administrado con surfactante sin tioacetamida Figura 14H, en esta fotografía podemos observar que el hígado presenta un color similar al grupo control positivo, a nivel macroscópico podemos decir que el surfactante no promueve un efecto adverso contra el hígado.

**Figura 14 A Control positivo**



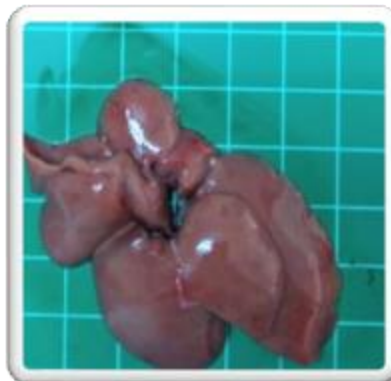
**Figura 14 B Control negativo (TAA)**



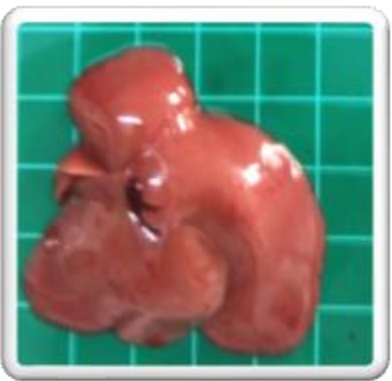
**Figura 14 C NE+EXAC con TAA**



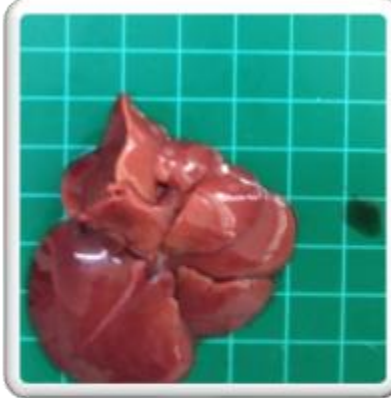
**Figura 14 D ACE con TAA**



**Figura 14 E EXAC con TAA**



**Figura 14 F NE con TAA**



**Figura 14. Fotografías macroscópicas de hígados de los diferentes tratamientos.**



**Figura 14 G Surfactante con TAA**



**Figura 14 H Surfactante**



**Figura 14. Fotografías macroscópicas de hígados de los diferentes tratamientos (continuación)**

### **7.3.3 Evaluación de transaminasas (ALAT Y ASAT)**

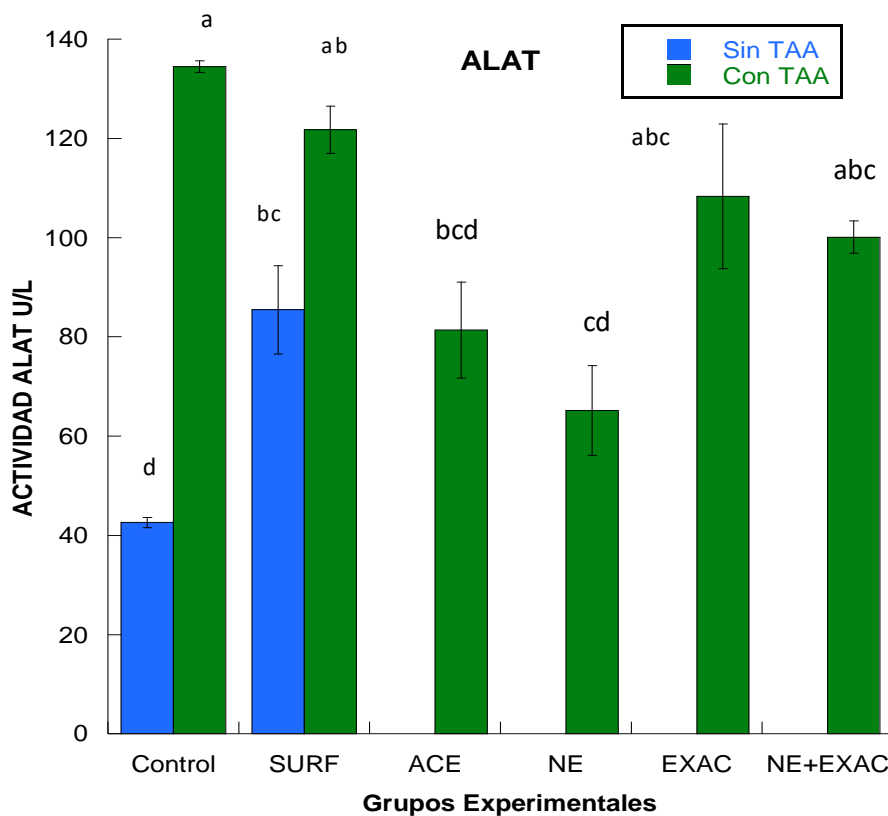
En la siguiente Figura 15, se reportan los resultados de la evaluación de alanina aminotransferasa (ALAT) (Anexo 3), el nivel más bajo de esta enzima se obtuvo en el grupo control positivo **43.24 U/L** este nivel es considerado normal, el nivel más alto reportado fue para el grupo control negativo (TAA) **134.47 U/L**, entre estos dos grupos existe diferencia significativa, este resultado indica que el grupo control negativo (TAA) presenta una hepatopatía. El grupo surfactante sin TAA presentó un nivel de actividad de la enzima de **85.42 U/L** por lo cual muestra diferencia significativa con los grupos control negativo (TAA) y control positivo, el aumento del nivel de ALAT que presenta el grupo surfactante en comparación con el grupo control positivo es un marcador que indica daño hepático causado por el surfactante. El grupo administrado con surfactante y TAA también aumentó el nivel de alanina aminotransferasa **120.18 U/L** y muestra diferencias significativas control en grupo control positivo, pero no muestra diferencia significativa con el grupo surfactante y el grupo control negativo (TAA), este resultado confirma la tendencia de que el surfactante ocasiona daño hepático, y su uso es negativo para

el hígado. El siguiente grupo que se muestra en la Figura 15 es el administrado vía oral con aceite esencial de romero y tioacetamida (ACE), este reportó un nivel de **81.36 U/L**, y no muestra diferencias significativas con el grupo control positivo, pero muestra diferencias significativas con el grupo control negativo (TAA), por lo tanto el aceite esencial de romero podría tener efecto hepatoprotector. El grupo administrado con aceite esencial de romero nanoemulsionado y tioacetamida (NE) es el que tuvo un mejor efecto hepatoprotector, ya que el nivel que se reportó para este grupo fue **73.98 U/L** y no se observan diferencias significativas con el grupo control positivo. Esto concuerda con lo establecido por McClements y Rao, (2011) en estudios realizados *in vitro* cuando el tamaño de partícula se encuentra en intervalos menores a 100 nm podría haber mayor biodisponibilidad de compuestos lipofílicos, se puede destacar que los resultados obtenidos muestran que el aceite esencial de romero nanoemulsionado podría tener mayor biodisponibilidad y mejorar la absorción de componentes bioactivos. Rašković *et al.*, (2014) realizaron un análisis de la actividad antioxidante del aceite esencial de romero (*Rosmarinus Officinalis L.*) y evaluaron su efecto hepatoprotector en ratas macho wistar, observando diferencia significativa en el nivel de actividad de ALAT entre el grupo control negativo CCl<sub>4</sub> 3185.0 U/L y el grupo tratado con aceite esencial de romero+CCl<sub>4</sub> 1648.6U/L, y reportaron que el aceite esencial de romero puede promover efectos benéficos en la intoxicación hepática inducida por CCl<sub>4</sub> en ratas macho, debido a la eliminación de radicales libres y a que puede retardar la peroxidación lipídica evitando lesiones en el tejido hepático.

El siguiente nivel de ALAT mostrado en la Figura 15 es el de la nanoemulsión de extracto acuoso y aceite esencial de romero (NE+EXAC) **100.08 U/L**, debido al nivel de actividad de esta enzima, no se muestra diferencia significativa con el grupo control negativo (TAA), este efecto podría deberse a que los extractos acuosos de algunas plantas como el romero tienen un alto contenido en minerales y estos podrían oxidar los compuestos bioactivos de la nanoemulsión y no darse un efecto sinérgico entre la fase oleosa y fase acuosa. Se ha reportado que los surfactantes pueden llegar a actuar como pro oxidantes de las emulsiones al interactuar con algunos componentes de la fase acuosa, como pueden ser

proteínas, azúcares, ácidos, bases, buffers, metales y polisacáridos. Estos factores podrían limitar el poder antioxidante del sistema disminuyendo la protección o bloqueo contra radicales libres, pero la formulación de una nanoemulsión podría ser una buena alternativa para aumentar la estabilidad del aceite esencial de romero y aumentar su vida de anaquel.

Para el grupo administrado con extracto acuoso y tioacetamida (EXAC) **109.19 U/L** no se obtuvieron diferencias significativas con el grupo control negativo.

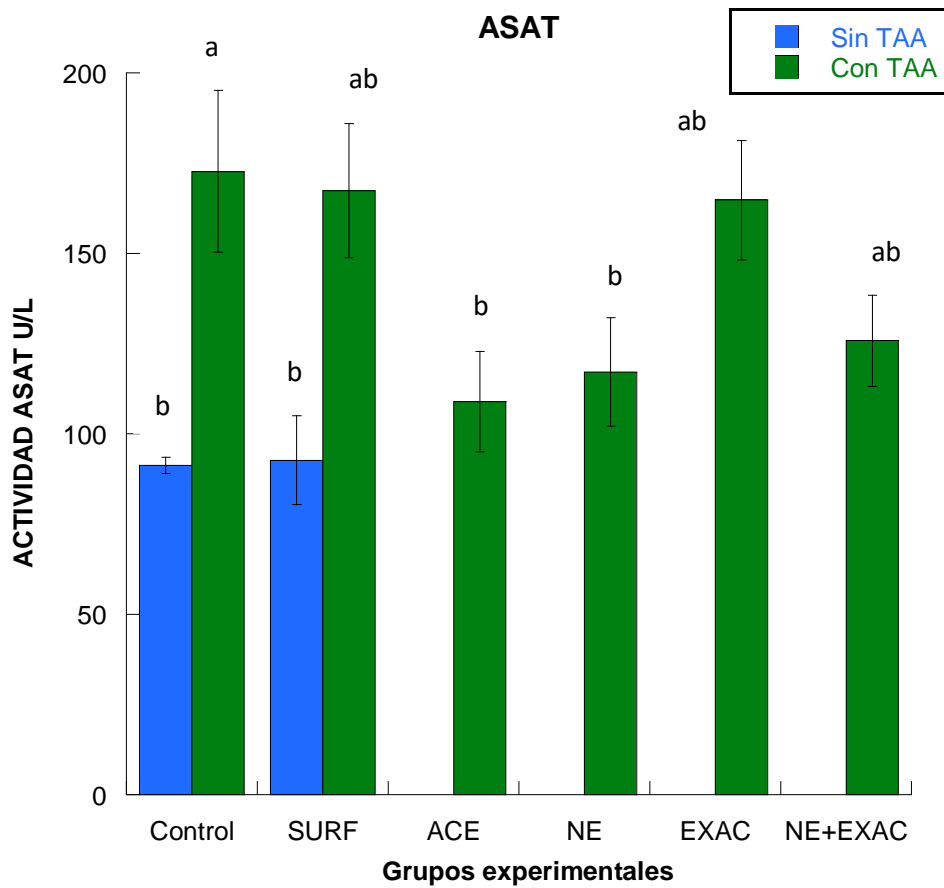


**Figura 15. Actividad de alanina aminotransferasa (ALAT). Letras diferentes en las barras indican que hay diferencia significativa ( $P < 0.001$ ). (Anexo 3).**

En la figura 16 (anexo 4) se muestran los resultados obtenidos de la actividad de aspartato aminotransferasa (ASAT), y se puede observar que el tratamiento que ofrece mayor protección al hígado es el de aceite esencial de romero no nanoencapsulado (ACE) **109.017 U/L**, sin embargo el grupo experimental tratado con nanoemulsión de aceite esencial de romero también brindó protección al hígado (NE) **117.117 U/L**, ambos grupos muestran diferencias significativas en comparación con el grupo control negativo (TAA) **190.4420 U/L** y no existen diferencias significativas con el grupo control positivo **89.474 U/L**, la tendencia en comparación con los resultados obtenidos por ALAT es la misma los grupos con mejores resultados son los tratados con aceite esencial nanoencapsulado y sin nano encapsular, en el análisis de esta transaminasa el resultado para el grupo tratado con surfactante **92.686 U/L** no tuvo diferencias significativas con el grupo control positivo, sin embargo esta enzima es más específica para determinar daño en corazón esto es importante porque se puede notar que el surfactante no causa daño al corazón pero si al hígado (García y Zurita, 2010).

El grupo tratado con NE+EXAC **125.99 U/L** también tuvo un efecto benéfico para el hígado ya que disminuyó el nivel de actividad de ASAT en comparación con el nivel obtenido para el grupo TAA, pero no presentó diferencias significativas contra este grupo (TAA), el grupo tratado con surfactante más tioacetamida **145.70 U/L** no tuvo diferencias significativas comparado con el grupo control negativo (TAA), el nivel más elevados de ASAT en los grupos con tratamiento en comparación con el grupo control positivo fue el tratado sólo con extracto acuoso (EXAC) **156.723 U/L**.

Estos resultados concuerdan con la tendencia observada en estudios reportados por Al-Attar & Shawush, (2015), Rašković *et al.*,(2014) en los cuales el tratamiento con *Rosmarinus officinalis L.* confiere un efecto hepatoprotector, este efecto podría deberse a algunos compuestos antioxidantes que contiene el romero como ácido carnosico, ácido rosmarínico, carnosol y ácido cafeico.



**Figura 16. Actividad de aspartato aminotransferasa (ASAT). Letras diferentes en las barras indican que hay diferencia significativa ( $P < 0.001$ ). (Anexo 4).**

## 9. CONCLUSIONES.

- Las nanoemulsiones con mejores condiciones de tamaño de partícula, PDI y potencial  $\zeta$  son las de HLB 12.
- Las nanoemulsiones HLB 12 en concentraciones 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3 presentan un buen porcentaje de inhibición del radical DPPH y actividad antioxidante en los ensayos FRAP Y ABTS por lo cual tienen potencial como antioxidantes.
- La nanoemulsión HLB 12 concentración 1:1.5 fue llevada al modelo *in vivo* ya que fue la que presentó mejores parámetros de estabilidad.
- En el modelo *in vivo* se pudo observar a nivel macroscópico de acuerdo al color y textura de los hígados que los tratamientos que ejercen un efecto hepatoprotector son: NE, ACE y NE+EXAC.
- En el análisis de transaminasas se obtuvo el mayor efecto hepatoprotector en el grupo tratado con aceite esencial de romero nanoencapsulado (NE), seguido por el tratamiento de aceite esencial sin nano encapsular (ACE).
- El tratamiento por la nanoemulsión aceite esencial de romero y extracto acuoso de romero (NE+EXAC), no tuvo diferencias significativas con el grupo control negativo (TAA), este resultado podría deberse a la oxidación de los compuestos bioactivos de la fase acuosa, cuando interactúa con el surfactante.
- Se considera que el surfactante podría ser un factor que promueva la oxidación de la fase acuosa cuando interactúa con algunos componentes de esta, y así elevar los niveles de ALAT y ASAT.
- Las nanoemulsiones de aceite esencial de romero con tamaño de partícula menor a 100 nm tuvieron mayor efecto hepatoprotector por lo tanto

reafirmamos que sistemas con tamaños de partícula menores a 100 nm pueden aumentar la biodisponibilidad de los compuestos lipófilicos.

## 10. BILIOGRAFIA

- Acosta E. 2009.** Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 14(1):3–15
- Aeschbach R. & G. Phillipossian. 1990.** Process for obtaining carnosic acid and its utilization for its anticarcinogenic and antiviral properties. *Eur. Pat.* 480-077.
- Al-Attar A & H. Al-Rethea. 2017.** Chemoprotective effect of omega-3 fatty acids on thioacetamide induced hepatic fibrosis in male rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(4). Pp. 956-965.
- Al-Attar A. & N. Shawush. 2014.** Physiological investigations on the effect of olive and rosemary leaves extracts in male rats exposed to thioacetamide. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(5): pp.473-480.
- Altinier G., S. Sosa., R.P. Aquino., T.Mencherini., R.DellaLoggia and A. Tubaro.2007.** Characterization of topical anti-inflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12): 1718-1723.
- Álvarez & Amezcua MC.1994.** Modificaciones del curso de la cirrosis experimental con extractos totales de Romero (*Rosmarinus officinalis*). (Tesis de Maestría). Universidad de Colima, Colima, México. PP. 23-32.
- Anton N., J.P. Benoit & P. Saulnier.2008.** Design and production of nanoparticles formulated from nanoemulsion templates: A review. *Journal of Controlled Release* 128:185–199.



- Ávalos A. & C.E. Pérez.2009.** Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-145.
- Baemner A. 2004.**Nanosensors identify pathogens in food. Food Technology.58:51-55
- Bakkali F., S. Averbeck., D. Averbeck & M. Idaomar. 2008.** Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology.46 (2): pp.446-475.
- Baser K & G. Buchbauer, 2010.** Handbook of essential oils.Boca Raton: CRC press Taylor & Francis Group.
- Benzie I.F. & J.I. Strain.1996.** The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY.237 (292): 70-76.
- Brody A.L.2003.**Nano, nano food packing technology. Food Technology.57: 52-54.
- Bousbia N., M. Abert Vian, M. Ferhat., E. Petitcolas., B. Meklati & F. Chemat, 2009.** Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity.Food Chemistry, 114(1), 335-362.
- Buchbauer G. 2010.** Biological activities of essential oils. In: Bas, er, K.H.C.,Buchbauer, G. (Eds.), Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications.CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 235–280.
- Chen G., S.Chen, Y. Xie, F. Chen, Y. Zhao, C. Luo & Y. Gao, 2015.** Total Phenolic, Flavonoid and antioxidant activity of 23 edible flower subjected to in vitro digestion.Journal of functional foods, 17:243-259.

- Chiang C., H. Kadouh, & K. Zhou, 2013.** Phenolic compounds and antioxidant properties of gooseberry as affected by in vitro digestion, *LWT-Food Science and technology*, 51(2), 417-422.
- Choe E., D. Min, 2006.** Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 5(4):169-186
- Croteau R., T.M. Kutchan & N.G Lewis.2000.** Natural products secondary metabolites. In: Buchanan, B., Grisse, W., Jones, R.(Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.
- Culiver M., H. Richard & C. Berset.1996.** Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 645–652.
- Das K.P. & J.E. Kinsella.1993.** Droplet size and coalescence stability of whey protein stabilized milkfat peanut oil emulsions. *Journal Food Science* 58:39-44.
- De Rivera D. & C. Obón 1995.** Las plantas, las esencias y los perfumes. Editora ayuntamiento de murcia.78-79.
- Donsi F., A. Cuomo., E. Marchese & G. Ferrari. 2014.** Infusion of essential oils for food stabilization: Unraveling the role of nanoemulsion-based delivery systems on mass transfer and antimicrobial activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 22: pp.212-220
- Dorrie J., K. Sapala. & S-J. Zunino.2001.** Carnosol-induced apoptosis and down regulation of Bcl-2 in B-lineage leukemia cells, *Cancer Lett.* 170: 33–39.

- Duan S. & K.D. Moller.2001.** Anodic coupling reactions: probing the stereochemistry of tetrahydrofuran formation. A short, convenient synthesis of linalool oxide. *Organic Lett.* 3: 2685-2688.
- Erkan N., E. Ayranci & E. Ayranci. 2008.** Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) extract (Blackseed (*Nigella Sativa L.*) essential oil, carnosic acid, rosmarínico acid and sesamol *Food chemistry*, vol. 110:76-82.
- Font Quer P.1999.**Plantas medicinales. El dioscorides renovado. Península.
- Franz C. & J. Novak. 2010.** Sources of essential oils. In: Bas, er, K.H.C., Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 39–82.
- García M. & A. Zurita. 2010.** Transaminasas: Valoración y significación clínica. Hospital universitario virgen Macarena, Hospital universitario Ntra. Sra. De la candelaria, PP. 267-275.
- González -Ojeda R. 2011.** Intervenciones antioxidantes para el tratamiento del estrés oxidativo y muerte celular en hepatocitos humanos en cultivo. Tesis de doctorado. Universidad de Córdoba. Córdoba, España.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E. y Benoit, J.P. 2003.** Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 24:4283-4300.
- Huang Q., H. Yu & Q. Ru. 2010.** Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals Using Nanotechnology. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*, 50-57.
- Huang S.C., C.T. Ho., S.Y.Lin-Shiau & J.K. Lin.2005.** Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear.

**Informe de PKID sobre la hepatitis Pediátrica. 2013.** El hígado: Evaluación de la silenciosa evolución de la enfermedad hepática. pp. 145-162.

**Jo, Y.J., Chun, J.Y., Kwon, Y.J., Min, S.G., Hong, G.P. y Choi, M.J. 2015.** Physical and antimicrobial properties of trans-cinnamaldehyde nanoemulsions in water melon juice. *LWT - Food Science and Technology*, 60:444-451.

**Kralova I. & J. Sjoblom.2009.** Surfactants used in food industry: a review. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30(9):1363-383.

**Kumar N & V. Balamuruga, 2015.** In vitro antioxidant activity.Total phenolic and total flavonoid contents of flower extract of calotropis gigantean.Reaserch Journal oh phytochemistry, 9(3), 137-143.

**Lin, C. Y. y Chen, L. W. 2006.** Emulsification characteristics of three and two phase emulsions prepared by the ultrasonic emulsification method. *Fuel Processing Technology*, 87:309-317.

**Linde H.1964.** A new diterpene from salvia officinalis L. and a note on the constitution of pikrosalvin Helv. *Chim.*47 pp.: 1234–1239.

**Loliger J., J.C Allen, R.J Hamilton. 1983.** Natural antioxidants. In *Rancidity in Foods* (Eds.). Ed. Elsevier Applied Science: London; Chapter 6.

**Lovelyn C. & A. A. Attama.2011.** Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. *Biomateriales and Nanobiotechnology* 2(5ª): 626-639.

**Masottei V., F. Juteau., J.M. Bessie & J. Viano. 2003.** Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species

Artemisia molinieri and its biological activities. J. Agric. Food Chem. 51: 7115–7121.

**McClements D. J. 2005.** Food emulsions: principles, practice, and techniques. 2nd Ed. Boca Raton: CRC Press.

**McClements D. J. & J. Rao. 2011.** Food-grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 51: 285–330.

**McClements D.J.2011.** Edible nanoemulsions: Fabrication, properties, and functional performance. Soft Matter 7(6): 2297–2316.

**McClements D.J.2013.** Edible lipid nanoparticles: Digestion, absorption, and potential toxicity. Progress in Lipid Research, 52(4): 409-423.

**Méndez N, Chávez N & Uribe M. 2003.**Higado graso no alcohólico. Nuevos. Departamento de Investigación Biomédica, Gastroenterología & Unidad de Hígado conceptos.

**Moller R. & N. Vázquez. 2011.** Anatomía del Hígado de la Rata Wistar (Rattus norvegicus). Int J Morphol, 29(01): 76-7

**Monahan F.J., D.J. McClements & J.B. German.1996.**Disulfide mediated polymerization reactions and physical properties of heated WPI-stabilized emulsions. Journal Food Science. 61; 504-508.

**Morales R. 2014.** En flora ibérica. Plantas vasculares de la península ibérica e Islas Baleares. Real jardín botánico,CSCIC, Madrid. pp. 327-331.

- Mostafa D., A. Kassem., M. Asfour., S. Al Okbi., D. Mohamed & T. Hamed.2015.** Transdermal cumin essential oil nanoemulsions with potent antioxidant and hepatoprotective activities: In vitro and in vivo evaluation. *Journal of Molecular liquids.*212:pp. 6-15.
- Olave E., Torres, J. Riquelme., N. Ibacache & O. Binvignat. 2014.** Órganosabdominales: Peso del hígado, Bazo y riñones en relación al sexo, grupo étnico, edad e índice de masa corporal 32(4): pp.1311-1315
- Paulson A.T. & M.A. Tung.1988.**Emulsification properties of succinylated canola protein isolate. *Journal Science.* 53: 817-820.
- Persson K., Blute, I., I. Mira & J. Guastafsson, 2014.** Creation of well-defined particle stabilized oil-in-water nanoemulsions.*Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects,* 459:48-57.
- Pineda L.A. 2010.** Caracterización de nanoestructuras con diferente geometría: uso potencial en alimentos. México, D.F., México: Instituto Politécnico Nacional.
- Porter & Spurgeon, 1981; Schiest et al., 2000; Iguchi et al., 2002;** Biosynthesis of Isoprenoid Compounds. Wiley- Interscience Publication. Vol. I, New York. Real Farmacopea Española. 1ª Edición, Apartado II 2.8.12. 1997. Boletín Oficial del Estado (B.O.E.) Ministerio de la Presidencia. Ministerio de Sanidad y Consumo de Madrid.
- Pulido R., L. Bravo & Saura- Calixto F. 2000.** Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *Agricultural and Food Chemistry,* 3396–3402.

- Quintanilla M.X., B.H. Camacho., L.S. Meraz., J.J. Chanona., L.Jiménez., A. Aparicio & G.F. Gutierrez.2010.** Nanoencapsulation: a new trend in food engineering processing. *Food Eng Rev* 2(1):39–50.
- Raskovic A ., I. Milianovic., N. Pavlovic., T. Cebovic., S. Vukmirovic & M. Mikov, 2014.** Antioxidant activity of rosemary ( *Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential.*BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1).
- Re R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and Rice –Evans C. 1999.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9/10):1231–1237.
- Sadumi N., C. Solans., N. Azemar., M.J. García-Celma .2005.** Studies on the formation of O/W nanoemulsions, by low energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci* 26(5):438–445.
- Sadtler V., M. Rondon-Gonzalez, A. Acrement, L.Chopilin and E. Marie.2010. -** covered nanoparticles by emulsion inversion point (Eip) method. *Macromolecular Rapid Communications*. 31 (11):998-1002.
- Sánchez M.1980.**Diccionario de plantas Agrícolas. Ministerio de Agricultura. Madrid.pp:468.
- Sanguansri P. and M. Agustin. 2006.** Nanoscale materials development – a food industry perspective. *Trends Food Sci Tech*. **17**(10):547–556.
- Salager-Jean Louis. 1998.,** formulación HLB, PIT, R de Winsor, Universidad de los Andes, Escuela de Ingeniería Química, Mérida-Venezuela, versión No. 2.

- Schubert H. and R. Engel. 2004.** Product and formulation engineering of emulsions. *Chemical Engineering Research & Design*, **82**(A9):1137–1143.
- Sol I., A. Maestro., C. Pey., C. González., C. Solans & Gutiérrez. 2006.** Nanoemulsions preparation by low-energy methods in an ionic surfactant system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 288(1–3):138–143.
- Sole I., A. Maestro., C. González. C. Solans & J. Gutierrez.2006.** Optimization of nano-emulsion preparation by low-energy methods in an ionic surfactant system. *Langmuir*. 22(20):8326–8332.
- Souza L.C., MG. Goes., A.T.R. Del Fabro., L. Filho., C.B. Boeira & S.P. Jessie. 2012.** Evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the antidepressant-like effect caused by hesperidin in mice Q13. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, vol. 40:103-109.
- Tadros T., P Izquierdo, J. Esquena and C. Solans.2004.** Formation and Stability of Nanoemulsions, *Advances in Colloids and Interface Science*. Vol. 108-109.
- Thorsen M. and K. Hildebrandt 2003.** Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts. Aspects of accurate quantification. *Journal of Chromatography A*, 995:119–125.
- Torres L.M.E., A. Velasco., A. Pérez & M.J Gil. 1997.** Volatile constituents of two *Salvia* species grown wild in Spain. *J Ess Oil Res*.9: 27-33.
- Túnez I., M.C. Muñoz., J.F. Medina., M. Salcedo., M. Feijóo & P. Montilla.2007.** Comparison of melatonin, vitamin E and L-carnitine in the treatment of neuro-and hepatotoxicity induced by thioacetamide, *Cell, Biochemistry and Function*, 25(2).pp.119-127.



- Turasan H., S.Sahin & Sumu, 2015.** Encapsulation of Rosemary essential oil. *LWT-Food Science and Technology*, 64(1), 112-119.
- Vera L., P. Perez., A. Varela., M. Ramirez., M. Battino & J.L. Quiles. 2013.** Review Article Curcumin and Liver Disease. *International union of Biochemistry and Molecular Biology*, 39 (1): 88-100.
- Vergara P., S. Simeone., A. Bettini., L. Tineli., C. Valli & Storelli. 2014.** Antitumor activity of the dietary diterpene carnosol against a panel of human cancer cell lines, *Food Func.* 5:1261–1269.
- Villera, E. 2002.** *Diccionarios amuletos y supersticiones.* Editorial Obelisco.
- Wang W., N. Wu., Y. Zu & Y. FU, 2008.** Antioxidative activity of *rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*, 108(3), 1019-1022.
- Walker R., C. Gumus., E. Decker & D. McClements, 2017.** Improvements in the formation and stability of fish oil-in water nanoemulsions using carrier oils; MCT, thyme oil, & lemon oil, *Journal of Food Engineering*, 211, 60-68.
- Waynforth H.B. & P.A. Flecknell.1992.** *Experimental and surgical technique in the rat.* 2a. Ed. Academic Press. Gran Bretaña. pp. 241-248.
- Wenkert E., A. Fuchs & J. McChensey. 1965.** Artefacts from the Family Labiatae, *J. org. chem.* 30:2931-2934.

**Weiss J., E.A. Decker., D.J. McClements., K. Kristbergsson., T. Helgason and T. Awad.2008.** Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophysics*, **3**(2):146–154.

**Weiss J., P. Takhistov., D.J. McClements. 2006.** Functional materials in food nanotechnology. *J Food Sci* 71(9):107–116.

**Wu, L., Zhang, J., y Watanabe, W. 2011.** Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63:456-469.

**Yin L., B. Chu., I. Kobayashi & M. Nakajima. 2009.** Performance of selected emulsifiers and their combinations in the preparation of Beta-carotene nanodispersions. *Food Hydrocolloids*, 23(6):1617–1622.

**Young., I. 2001.** Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54(3): 176-186.

## 11. ANEXOS

**ANEXO 1.** Análisis estadístico (análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de medias de mínimos cuadrados (Tukey). % decremento o incremento del peso corporal.

TRATAMIENTO	(%) decremento o incremento del peso corporal
TAA	-1.16±0.32b
SURF con TAA	2.58±1.11b
EXAC	-1.08±0.41b
NE+EXAC	2.26±0.97b
SURFACTANTE	9.49±0.32a
ACE	1.24±1.80b
NE	2.17±1.42b
CONTROL	11.21±1.98a

**ANEXO 2.** Análisis estadístico (análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de medias de mínimos cuadrados (Tukey). Relación peso corporal hígado.

TRATAMIENTO	RELACIÓN PESO CORPORAL/ HÍGADO (%)
TAA	4.2074±0.729a
SURF con TAA	4.0254±0.44a
EXAC	3.8261±0.334a
NE+EXAC	3.9051±0.738a
SURFACTANTE	3.4494±0.299a
ACE	3.9402±0.175a
NE	3.6484±0.481a
CONTROL	3.4705±0.631a

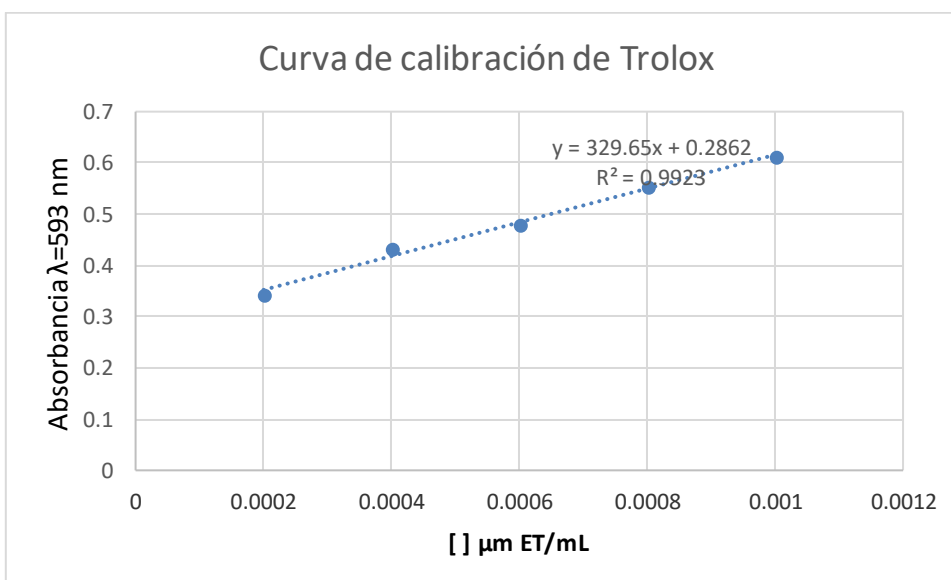
**ANEXO 3.** Análisis estadístico (análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de medias de mínimos cuadrados (Tukey). Actividad de la enzima alanina aminotransferasa (ALAT).

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD ALAT
TAA	134.4740±2.998a
SURF con TAA	120.1837±31.212ab
EXAC	109.1970±37.968abc
NE+EXAC	100.0840±10.32abc
SURFACTANTE	85.4290±19.454bc
ACE	81.3630±21.103bcd
NE	73.9860±25.749cd
CONTROL	43.2499±3.605d

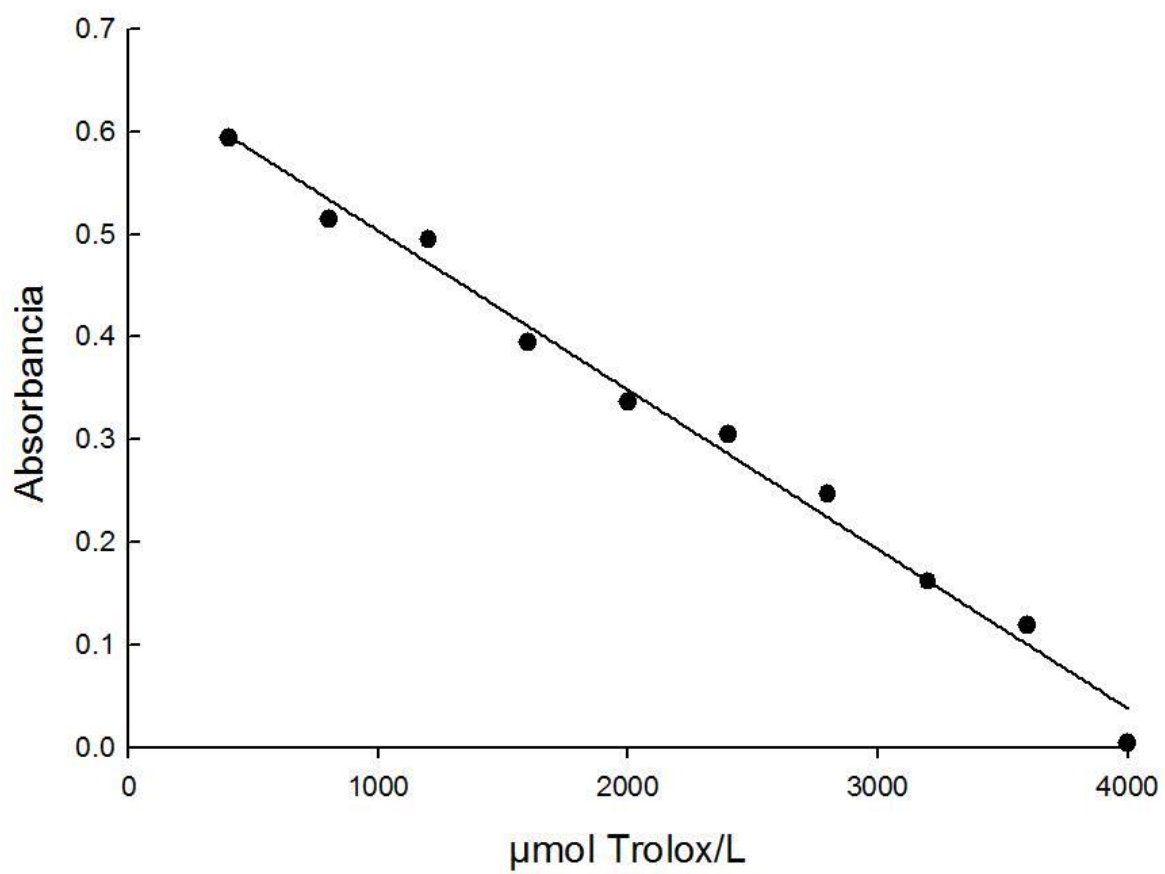
**ANEXO 4.** Análisis estadístico (análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de medias de mínimos cuadrados (Tukey). Actividad de la enzima aspartato aminotransferasa (ASAT).

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD ASAT
TAA	190.4420±54.499a
SURF con TAA	145.8076±45.489ab
EXAC	156.7234±44.124ab
NE+EXAC	125.9998±26.631ab
SURFACTANTE	92.6860±26.334b
ACE	109.0170±30.222b
NE	117.1170±32.350b
CONTROL	89.4749±15.271b

**Anexo 5.** Curva de calibración FRAP



**Anexo 6.** Curva de calibración ABTS



## ANEXO 7. Técnica de la determinación de transaminasas ALAT Y ASAT.



### ALAT/ALT/GPT (IFCC)

Reactivo líquido para la determinación fotométrica de la enzima Transaminasa Glutámico Pirúvica (Alanina Aminotransferasa) en suero.

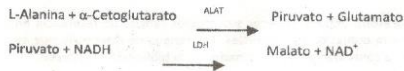
Para uso en el diagnóstico *in Vitro*. Apto para usar en autoanalizador.

#### SIGNIFICANCIA CLINICA

La ALAT se encuentra en altas concentraciones en el hígado, riñón, corazón y tejido muscular esquelético. Su nivel se encuentra aumentado en enfermedades que involucran el hígado (cirrosis, hepatitis viral, entre otras). Niveles bajos se detectan en pacientes dializados o con deficiencia de vitamina B6.

#### FUNDAMENTOS DEL METODO

La determinación de ALAT se realiza acoplado su acción transaminasa a la acción de la enzima LDH en presencia de NADH. Este método se basa en el método de Wroblewski y La Due, siguiendo las recomendaciones de IFCC y SSCC.



La L-alanina en presencia de ALAT formándose Piruvato y Glutamato. El Piruvato producido es reducido por la enzima LDH con la consiguiente oxidación del NADH a NAD.

La actividad de la ALAT se mide determinando la disminución de absorbancia a 340 nm. según el NADH sea oxidado a NAD.

#### REACTIVOS

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

Composición Reactivo 1:

Buffer pH 7.5 ± 0.1	120 mM
α-Cetoglutarato	18 mM
L-Alanina	600 mM
LDH	≥2500 U/L
Azida	0.3%

Composición Reactivo 2:

NADH	1.5 mM
Estabilizadores	c.s.

Preparación del Reactivo de Trabajo:

Mezclar 1 mL de Reactivo 1 con 0.2 mL de Reactivo 2 o preparar el volumen requerido manteniendo la proporción.

Estabilidad del reactivo de trabajo: 10 días entre 2° y 8°C.

Descartar el reactivo si su absorbancia es menor de 0.8 OD a 340 nm. contra blanco de agua.

#### MUESTRA

De preferencia utilizar suero libre de hemólisis. Descartar muestras con hemólisis visible ya que se pueden obtener valores falsamente elevados. Se recomienda hacer la determinación tan pronto sea posible. La ALAT es estable a lo menos 3 días entre 2° y 8°C. y 30 días a -20°C.

#### MATERIAL NECESARIO NO INCLUIDO

Espectrofotómetro manual o automático o fotocolorímetro de filtros con cubeta termoestable, capaz de medir absorbancia a 340 nm., baño termoregulado, cronómetro, pipetas, calibrador y sueros controles.

#### TECNICA

Llevar el reactivo a la temperatura de reacción (30° o 37°C.). Ajustar el espectrofotómetro a cero con blanco de agua destilada.

Reactivo de trabajo	(mL)	1.0
Volumen de muestra	(mL)	0.1

Mezclar y transferir a la cubeta del espectrofotómetro. Incubar 60 segundos a la temperatura de reacción. Leer la absorbancia inicial (A1) a 340 nm. Repetir la lectura a intervalos de 60 segundos exactos, hasta por tres minutos.

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

#### CALIBRACION

- En la calibración se recomienda utilizar calibrador sérico VALTROL-C (código 8002103), proceder de igual forma que con las muestras.
- Se recomienda recalibrar en cualquier momento que se evidencie alguno de estos acontecimientos:
  - El lote de reactivo cambia
  - Se realiza un mantenimiento preventivo del equipo
  - Los valores de control han cambiado o se encuentran fuera de escala.

#### CALCULOS

Determine el cambio de Absorbancia por minuto ( $\Delta A/\text{min}$ ) tanto para el calibrador como para las muestras.

Factor = $\frac{\text{Concentración Calibrador}}{\Delta A/\text{min Calibrador}}$
Actividad ALAT (U/L) = Factor x $\Delta A/\text{min}$ . muestra

O bien se puede utilizar el siguiente factor:

Actividad ALAT desconocido (U/L) = $\Delta A/\text{min} \times 1768$
--

$$\text{Factor } 1768 = \frac{V_t \times 1000}{\Sigma \text{NADH } 340 \times P \times V_m}$$

$V_t$  = Volumen total de reacción  
 $\Sigma \text{NADH } 340$  = Coef. de extinción milimolar del NADH a 340 nm.  
 $P$  = Espesor del paso de luz en la cubeta  
 $V_m$  = Volumen de muestra utilizado

Grupo Industrial Mexlab Sa de CV. Susana Gomez Palafox #5486, Paseos del sol, zapopan jalisco. Tel. (33)36342361 / 01800111 4343 / 018001117788 / www.grupomexlab.com



## ASAT/AST/GOT (IFCC)

Reactivo líquido para la determinación fotométrica de la enzima Transaminasa Glutámico Oxalacética (Aspartato Aminotransferasa) en suero.

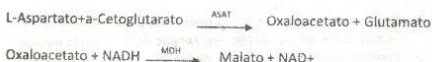
Para uso en el diagnóstico *In Vitro*. Apto para usar en autoanalizador.

### SIGNIFICANCIA CLINICA

La ASAT se encuentra presente en todos los tejidos, pero en altas concentraciones en el hígado, músculo, riñón y corazón. Su aumento se asocia a enfermedades que afectan dichos tejidos tales como hepatitis, infarto del miocardio, entre otras.

### FUNDAMENTOS DEL METODO

La determinación de ASAT se realiza acoplado su acción transaminasa a la acción de la enzima MDH en presencia de NADH. Este método se basa en el método de Henry et al., siguiendo las recomendaciones de IFCC



El L-Aspartato reacciona con el  $\alpha$ -Cetoglutarato en presencia de ASAT formándose Oxaloacetato y Glutamato. El Oxaloacetato producido es reducido por la enzima MDH con la consiguiente oxidación del NADH a NAD.

La actividad de la ASAT se mide determinando la disminución de absorbancia a 340 nm. según el NADH sea oxidado a NAD.

### REACTIVOS

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

#### Composición Reactivo 1:

Buffer pH 7.8 ± 0.1	cs
$\alpha$ -Cetoglutarato	15 mM
L-Aspartato	>240 mM
LDH	>1200 U/L
MDH	>960 U/L
Azida	0.3%

#### Composición Reactivo 2:

NADH	1,08 mM
Estabilizadores	cs

#### Preparación del Reactivo de Trabajo:

Mezclar 1 mL. de Reactivo 1 con 200  $\mu$ l. de Reactivo 2 o preparar el volumen requerido manteniendo la proporción.

Estabilidad del reactivo de trabajo: 10 días entre 2° y 8°C.

Descartar el reactivo si su absorbancia es menor de 0.8 a 340 nm. contra blanco de agua, y paso de luz de 1 cm o presenta turbidez.

### MUESTRA

De preferencia utilizar suero libre de hemólisis. Descartar muestras con hemólisis visible ya que se pueden obtener valores falsamente elevados. La ASAT es estable a lo menos 7 días entre 2° y 8°C. y 15 días a -20°C.

### MATERIAL NECESARIO NO INCLUIDO

Espectrofotómetro manual o automático o fotocolorímetro de filtros con cubeta termoestable, capaz de medir absorbancia a 340 nm., baño termoregulado, cronómetro, pipetas, calibrador y sueros controles.

### TECNICA

Llevar el reactivo a la temperatura de reacción (30°C o 37°C.).  
Ajustar el espectrofotómetro a cero con blanco de agua destilada.

Reactivo de trabajo	(mL)	1.0
Muestra o calibrador	(mL)	0.1

Mezclar y transferir a la cubeta del espectrofotómetro. Incubar 60 segundos a la temperatura de reacción. Leer la absorbancia inicial (A1) a 340 nm. Repetir la lectura a intervalos de 60 segundos exactos, hasta por tres minutos.

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

### CALIBRACION

- En la calibración se recomienda utilizar calibrador sérico VALTROL-C (código 8002103), proceder de igual forma que con las muestras.
- Se recomienda recalibrar en cualquier momento que se evidencie alguno de estos acontecimientos:
  - El lote de reactivo cambia
  - Se realiza un mantenimiento preventivo del equipo
  - Los valores de control han cambiado o se encuentran fuera de escala.

### CALCULOS

Determine el cambio de Absorbancia por minuto ( $\Delta A/\text{min}$ ) tanto para el calibrador como para las muestras.

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

O bien se puede utilizar el siguiente factor:

Actividad ASAT desconocido (UI/L) = $\Delta A/\text{min} \times 1768$
---

$$\text{Factor } 1768 = \frac{V_t \times 1000}{\sum \text{NADH } 340 \times P \times V_m}$$

$V_t$  = Volumen total de reacción

$\sum \text{NADH } 340$  = Coef. de extinción milimolar del NADH a 340 nm.

P = Espesor del paso de luz en la cubeta

$V_m$  = Volumen de muestra utilizado

Grupo Industrial Mexlab Sa de CV. Susana Gomez Palafox #5486, Paseos del sol, zapopan jalisco. Tel. (33)36342361 / 01800111 4343 / 018001117788 / www.grupomexlab.com