

T  
615.42  
C 49

NO SALE A  
DOMICILIO

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**

**“EVALUACION DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LOS  
EXTRACTOS ACUOSOS LIOFILIZADOS DE LAS HOJAS DE  
TRES ECOTIPOS DE *Bixa orellana* L. (Achiote), EN RATAS  
ALBINAS *Rattus norvegicus*”.**

**TESIS**

**Para optar el Titulo Profesional de:**

**QUIMICO FARMACÉUTICO**



**Presentado por:**

**Bach. Edilberto Cienfuegos García.**

**Bach. Liliana Cueva Piña.**

**Asesores:**

**Blgo. Felipe Rios Isern.**

**Q.F. Ernesto Anselmo Nina Chora.**

**Iquitos – Perú**

**2009**



# Universidad Nacional de la Amazonia Peruana Facultad de Farmacia y Bioquímica

Carretera Zungarococha - Nina Rumi  
San Juan - Loreto - Perú



"Año de la Unión Nacional Frente a la Crisis Externa"

## ACTA DE SUSTENTACION

En el caserío de Nina Rumi, Distrito de San Juan Bautista, Departamento de Loreto, a los 10 días del mes de Julio del dos mil nueve, siendo las 12:00 horas, el Jurado de Tesis designado según Resolución de Coordinación N° 071-2008-FFB-UNAP, integrado por los señores docentes que a continuación se indica:

- Q.F. Luis Domingo Nonato Ramírez - Presidente
- Q.F. Hugo Miguel Pinto Guerra - Miembro
- Q.F. Carlos Enrique Calloapaza Valladares - Miembro

Se constituyeron en las instalaciones del Laboratorio N° 4 de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulada "**Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos acuosos liofilizados de las hojas de tres ecotipos de *Bixa orellana L. (Achiote)* en ratas albinas *Rattus norvegicus***", presentado por los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica **Edilberto CIENFUEGOS GARCÍA** y **Liliana CUEVA PIÑA**, para optar el **TITULO PROFESIONAL DE QUIMICO FARMACEUTICO**, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA, de acuerdo a Ley Universitaria N° 23733 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

Luego de haber escuchado con atención la exposición de los sustentantes y habiéndose formulado las preguntas necesarias, las cuales fueron respondidas: \_\_\_\_\_

Satisfactoriamente

El Jurado llegó a la siguiente conclusión:

1. La tesis ha sido a probada con el grado de Muy Bueno
2. Observaciones: el primer miembro asumió accidentalmente la Presidencia del Jurado en ausencia del titular, calificándose la sustentación por Mayoría.

Siendo las 13:30, se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándose a los sustentantes por su Exposición.

.....  
Q.F. Luis Domingo Nonato Ramírez  
Presidente

.....  
Q.F. Hugo Miguel Pinto Guerra  
Miembro

.....  
Q.F. Carlos Enrique Calloapaza Valladares  
Miembro

---

**“EVALUACION DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LOS  
EXTRACTOS ACUOSOS LIOFILIZADOS DE LAS HOJAS DE  
TRES ECOTIPOS DE *Bixa orellana* L. (Achiote), EN RATAS  
ALBINAS *Rattus norvegicus*”.**

---

***Bach. Edilberto Cienfuegos García***

***Bach. Liliana Cueva Piña***

**RESUMEN**

**Antecedentes:** En la amazonia peruana existe una gama de plantas medicinales con diferentes propiedades biológicas, con frecuencia la propiedad antiinflamatoria es la de mayor consideración y objeto de estudio para la población amazónica por ser la inflamación una de las manifestaciones clínicas mas frecuentes, que a su vez puede ser verificada con el conocimiento de estudios que evalúen y validen el potencial antiinflamatorio de la planta en estudio. **Objetivo:** Nuestro propósito fue determinar el efecto antinflamatorio de los extractos acuosos liofilizados de las hojas de tres ecotipos de *Bixa orellana* L. "Achiote" codificadas como E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub> a dosis de 100 y 200 mg/kg. **Método:** Como modelo biológico se utilizo ratas albinas cepa Holtzmann, sexo machos, el método empleado fue "Granuloma inducido por pellets de algodón", la vía utilizada fue la vía oral y como medicamento de referencia la Indometacina USP (2.5 mg/kg). **Resultados:** Los datos fueron analizados mediante el test estadístico ANOVA, obteniendo un porcentaje de inhibición de la inflamación (E<sub>1-100</sub> = 32.53%, E<sub>1-200</sub> = 14.37%; E<sub>2-100</sub> = 14.06%, E<sub>2-200</sub> = 6.25%; E<sub>3-100</sub> = 21.68%, E<sub>3-200</sub> = 10.04%). **Conclusiones:** Los extractos acuosos de los ecotipos E<sub>1</sub> y E<sub>3</sub> a dosis de 100 mg/kg disminuyeron significativamente el efecto inflamatorio ( $P \leq 0.05$ ), siendo el ecotipo E<sub>1</sub> a dosis de 100 mg/kg el que presento mayor efecto antiinflamatorio que el ecotipo E<sub>3</sub> a la misma dosis.

**Palabras claves:** Ecotipos, *Bixa orellana* L., efecto antiinflamatorio, granuloma inducido por pellets de algodón.

---

**“EVALUATION OF THE EFFECT ANTIINFLAMMATORY OF THE  
AQUEOUS EXTRACTS LYOPHYLIZED OF THE LEAVES OF  
THREE ECOTIPOS DE *Bixa orellana* L. (Achiote), IN ALBINO RATS  
*Rattus norvegicus*”.**

---

***Bach. Edilberto Cienfuegos García***

***Bach. Liliana Cueva Piña***

**ABSTRACT**

***Antecedents:*** In the Peruvian Amazonia a range of medicinal plants exists with different biological properties, frequently the property antiinflammatory is that of more consideration and study object for the amazon population to be the inflammation one of the clinical but frequent manifestations that in turn it can be verified with the knowledge of studies that you/they evaluate and validate the potential antiinflammatory of the plant in study. ***Objective:*** Our purpose was to determine the effect antiinflammatory of the extracts aqueous lyophilized of the leaves of three ecotipos of *Bixa orellana* L. “Achiote” coded as E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> and E<sub>3</sub> to dose of 100 and 200 mg/kg. ***Method:*** As biological model you uses rats albino stump Holtzmann, sex males, the used method was “Granuloma induced by cotton pellets”, the used road was the oral road and I eat reference medication the Indometacina USP (2.5 mg/kg). ***Results:*** The data were analyzed by means of the statistical test ANOVA, obtaining a percentage of inhibition of the inflammation (E<sub>1-100</sub> = 32.53%, E<sub>1-200</sub> = 14.37%; E<sub>2-100</sub> = 14.06%, E<sub>2-200</sub> = 6.25%; E<sub>3-100</sub> = 21.68%, E<sub>3-200</sub> = 10.04%). ***Conclusions:*** The aqueous extracts of the ecotipos E<sub>1</sub> and E<sub>3</sub> to dose of 100 mg/kg diminished the inflammatory effect significantly (P ≤ 0.05), being the ecotipo E<sub>3</sub> to dose of 100 mg/kg the one that I present bigger effect antiinflammatory that the ecotipo E<sub>1</sub> to the same dose.

**Key words:** Ecotipos, *Bixa orellana* L., effect antiinflammatory, granuloma induced by cotton pellets.

**Dedicatoria:**

El presente trabajo de tesis esta dedicado a nuestros padres, por darnos la vida y por ser los principales influyentes en la culminación de un largo proceso de formación profesional, por estar en cada momento con su incansable apoyo moral, el cual ha sido necesario para cumplir cada una de nuestras metas profesionales; así como también para nuestros familiares, docentes, compañeros y personas que de alguna manera contribuyeron en nuestra formación y realización como personas y como profesionales para servir a la sociedad.

***Bach. Edilberto Cienfuegos García***

***Bach. Liliana Cueva Piña***

## **Agradecimiento**

El agradecimiento es grato e interminable para todos aquellos que nos han apoyado directa e indirectamente en la realización del presente trabajo de tesis.

En primer lugar al Instituto de Medicina Tradicional IMET-ESSALUD, por brindarnos las instalaciones y recursos necesarios que permitieron desarrollar con normalidad de principio a fin los objetivos y procedimientos planteados en esta evaluación.

A nuestros asesores:

Al Biólogo Felipe Ríos Isern, por su apoyo incondicional con sus conocimientos y experiencia en el área de farmacología y toxicología.

Al Químico Farmacéutico Ernesto A. Nina Chora, por su permanente orientación y apoyo incondicional en el área de fitoquímica durante todo el proceso y desarrollo del trabajo de tesis.

Al Ingeniero Jorge Villacrez, por su colaboración en la identificación y selección del material vegetal requerido para nuestro estudio.

A los químicos farmacéuticos Edgar Novoa Cardenas y Deysi Luz Ríos Torres, por su apoyo incondicional con su conocimiento e ideas valiosas para la realización de nuestro trabajo de tesis.

Y un agradecimiento muy especial a nuestros padres y familiares, por el apoyo constante a lo largo de nuestra carrera profesional y todos aquellos que de alguna manera influyeron en la complementación de una meta tan ansiada por cada estudiante.

## LISTA DE ACRÓNIMOS

AINEs	:	Antiinflamatorios no esteroideos
COX	:	Ciclooxigenasa
COX-2	:	Ciclooxigenasa 2
DL <sub>50</sub>	:	Dosis letal 50
E <sub>1</sub>	:	Ecotipo 1
E <sub>2</sub>	:	Ecotipo 2
E <sub>3</sub>	:	Ecotipo 3
EROs	:	Especies reactivas de oxígeno
g	:	Gramo
g/Kg	:	Gramo/kilogramo
IL-2	:	Interleucina 2
IL-6	:	Interleucina 6
TNF- $\alpha$	:	Factor de necrosis tumoral
i.p.	:	Intraperitoneal
LTB <sub>4</sub>	:	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LOX	:	Lipooxigenasa
ml	:	mililitro
MPO	:	Mieloperoxidasa
NO	:	Oxido nítrico
OMS	:	Organización Mundial de la Salud
PAF	:	Factor activador de proteínas
p.c.	:	Peso corporal
PGE <sub>1</sub>	:	Prostaglandinas E-1
PGI <sub>2</sub>	:	Prostaglandinas I-2
TXA <sub>2</sub>	:	Tromboxanos A-2
Q.P.	:	Químicamente puro
USP	:	United States Pharmacopea
v.o.	:	Vía oral
XO	:	Xantino oxidasa

## INDICE DEL CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>CAPITULO I</b>	
<b>1. Introducción</b>	02
<b>2. Problema de investigación</b>	05
<b>3. Objetivos</b>	06
3.1. General	06
3.2. Específicos	06
<b>CAPITULO II</b>	
<b>1. Marco teórico</b>	08
1.1. Antecedentes	09
1.2. Consideraciones teóricas	10
1.2.1. La inflamación	10
1.2.2. Modelos animales para el estudio de la inflamación y de la actividad antiinflamatoria	12
1.2.2.1. Modelos de inflamación aguda	13
1.2.2.2. Modelos de inflamación crónica	16
1.2.3. <i>Bixa orellana</i> L. "Achiote"	19
1.2.3.1. Clasificación taxonómica	19
1.2.3.2. Descripción botánica	20
1.2.3.3. Información etnomédica	24
1.2.3.4. Componentes químicos de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. "Achiote".	26
1.2.3.5. Estudios fitoquímicos	27
1.2.3.6. Estudios farmacológicos	29
1.2.3.7. Estudios toxicológicos	34
<b>2. Definiciones operacionales</b>	
2.1. Variable Independiente	36
2.2. Variable Dependiente	36
2.3. Operacionalización de variables	37
2.4. Operacionalización de variables (continuación)	38



<b>3. Hipótesis</b>	39
---------------------	----

## **CAPITULO III**

### **1. Metodología**

1.1 Tipo de estudio	41
1.1.1 Experimental	41
1.1.2 Prospectivo	41
1.1.3 Longitudinal	41
1.2 Diseño de investigación	41
1.3. Diseño del Modelo utilizado: Granuloma inducido por pellets de algodón	42

### **2. Población y muestra**

2.1. Población vegetal	43
2.2. Muestra vegetal	43
2.2.1. Criterios de inclusión del material vegetal	43
2.3. Población animal	43
2.4. Muestra animal	43
2.4.1. Criterios de inclusión de los animales	44

### **3. Instrumentos y materiales**

3.1. Instrumentos	44
3.2. Material vegetal	44
3.3. Material biológico	44
3.4. Materiales de laboratorio	45
3.5. Equipos	45
3.6. Drogas e insumos químicos	46

### **4. Procedimiento para la recolección de datos**

4.1. Recolección de muestras vegetales	47
4.2. Identificación de las muestras vegetales	47
4.3. Obtención de los extractos acuosos liofilizados	48
4.4. Preparación de las soluciones de los extractos liofilizados	49
4.5. Etapa de cuarentena y procedimiento de identificación de los modelos biológicos (ratas)	50
4.5.1. Etapa de cuarentena	50
4.5.2 . Sistema de identificación (Marcaje / pesaje)	50

4.6. Recolección de datos para la evaluación antiinflamatoria	50
4.7. Método de granuloma inducido por pellets de algodón (método crónico)	50
4.7.1. Técnica operatoria	50
<b>5. Análisis e interpretación de datos</b>	<b>52</b>
<b>6. Protección de los derechos de los animales en experimentación</b>	<b>52</b>
<b>CAPITULO IV</b>	
<b>1. Resultados</b>	<b>55</b>
<b>2. Discusión</b>	<b>66</b>
<b>3. Conclusiones</b>	<b>70</b>
<b>4. Recomendaciones</b>	<b>71</b>
<b>5. Referencias bibliográficas</b>	<b>72</b>

## INDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 01. Flujograma del proceso de recolección y análisis de datos.	82
ANEXO N° 02. Tamizaje fitoquímico realizado en el laboratorio de Fitoquímica del IMET de los tres ecotipos de <i>Bixa orellana</i> L. "Achiote".	83
ANEXO N° 03. Ficha de recolección de datos para la evaluación antiinflamatoria.	84
ANEXO N° 04. Ficha de recolección de los resultados del efecto inflamatorio.	85
ANEXO N° 05. Tabla de Dosificación.	86
ANEXO N° 06. Identificación taxonómica de <i>Bixa orellana</i> L. "Achiote" realizada en el Herbarium Amazonense de la Universidad de la Amazonia Peruana.	87

## INDICE DE TABLAS

Tabla N° 01. Promedio del contenido fibrogranuloso de la evaluación del ecotipo E <sub>1</sub> de <i>Bixa orellana</i> L. "Achiote" a dosis de 100mg/kg en ratas albinas.	55
Tabla N° 02. Promedio del contenido fibrogranuloso de la evaluación del ecotipo E <sub>1</sub> de <i>Bixa orellana</i> L. "Achiote" a dosis de 200mg/kg en ratas albinas.	56
Tabla N° 03. Promedio del contenido fibrogranuloso de la evaluación del ecotipo E <sub>2</sub> de <i>Bixa orellana</i> L. "Achiote" a dosis de 100mg/kg en ratas albinas.	57
Tabla N° 04. Promedio del contenido fibrogranuloso de la evaluación del ecotipo E <sub>2</sub> de <i>Bixa orellana</i> L. "Achiote" a dosis de 200mg/kg en ratas albinas.	58
Tabla N° 05. Promedio del contenido fibrogranuloso de la evaluación del ecotipo E <sub>3</sub> de <i>Bixa orellana</i> L. "Achiote" a dosis de 100mg/kg en ratas albinas.	59
Tabla N° 06. Promedio del contenido fibrogranuloso de la evaluación del ecotipo E <sub>3</sub> de <i>Bixa orellana</i> L. "Achiote" a dosis de 200mg/kg en ratas albinas.	60
Tabla N° 07. Promedio del contenido fibrogranuloso de la evaluación de la Indometacina a dosis de 2.5 mg/kg en ratas albinas.	61
Tabla N° 08. Promedio del contenido fibrogranuloso de la evaluación de la solución salina al 0.9% en ratas albinas.	62

Tabla N° 09. Porcentaje de inhibición de la inflamación en los diferentes ecotipos de *Bixa orellana* L. "Achiote" por el modelo de granuloma inducido por pellets de algodón. 63

Tabla N° 10. Promedio del contenido acuoso y fibrogranuloso de los diferentes ecotipos de *Bixa orellana* L. "Achiote" mediante el modelo de granuloma inducido por pellets de algodón. 64

## INDICE DE CUADROS

Cuadro N° 01. Características de ocho ecotipos de <i>Bixa orellana</i> L. "Achiote".	23
Cuadro N° 02. Operacionalización de variables.	37
Cuadro N° 03. Operacionalización de variables.	38
Cuadro N° 04. Esquema de tratamiento en la investigación	42

## INDICE DE FIGURAS

Figura N° 01. Ecotipo 1 - <i>Bixa orellana</i> L. " Achiote".	88
Figura N° 02. Ecotipo 2 - <i>Bixa orellana</i> L. " Achiote".	89
Figura N° 03. Ecotipo 3 - <i>Bixa orellana</i> L. " Achiote".	90
Figura N° 04. Ecotipo 1, 2 y 3 - <i>Bixa orellana</i> L. " Achiote"	91
Figura N° 05. Extractos acuosos liofilizados de los tres Ecotipos de <i>Bixa orellana</i> L. "Achiote".	92
Figura N° 06. Indometacina USP. C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub> CL.	93

## INDICE DE GRAFICOS

GRAFICO N° 01. Porcentaje de inhibición de la inflamación de los diferentes ecotipos de <i>Bixa orellana</i> L. "Achiote" mediante el modelo de granuloma inducido por pellets de algodón.	65
--	----

# Capitulo I

## 1. INTRODUCCION

La inflamación es el término empleado para describir la esperada respuesta normal a las lesiones en los tejidos sanos. Es por consiguiente, un precursor esencial para la restauración de las lesiones. Debe considerarse como un mecanismo de defensa no específico y muy efectivo, sin el cual no podríamos sobrevivir. La inflamación constituye parte de las manifestaciones de numerosas enfermedades, tratándose de una respuesta inespecífica frente a las agresiones del medio y está generada por los agentes inflamatorios.<sup>01</sup>

Aproximadamente 25% de los consumidores crónicos de AINES presentan reacciones adversas al medicamento, siendo este grupo de medicamentos la primera causa de presentación de gastritis erosiva. Del 10 al 30% desarrollan úlcera péptica en seis meses de tratamiento continuo con AINES, precedidas en su mayoría por una gastritis erosiva, además; el riesgo de sangrado digestivo se cuadruplica con relación a la población general. Dada la frecuencia con que acuden a las consultas médicas los pacientes con diversas afecciones de relación inflamatoria debido a la patología que presenta es considerada de suma importancia para contrarrestar dicha manifestación; y sea controlada.<sup>02</sup>

Los antiinflamatorios constituyen uno de los grupos terapéuticos de más amplia utilización en nuestro país y en el mundo, por lo que son fármacos de una gran aceptación y demanda, tanto por parte de los prescriptores como de los consumidores, que a su vez constituye un verdadero reto en la investigación de plantas medicinales alternativas que pueda establecer los perfiles de seguridad de estos medicamentos y lograr menores efectos secundarios durante el tratamiento.

Desde la antigüedad las plantas han constituido un recurso para el ser humano tanto para su alimento, como también para curar sus enfermedades. Entre estas plantas se encuentran las medicinales, a las cuales se les atribuyen propiedades



farmacológicas. Muchas plantas nativas se comercializan por las propiedades atribuidas para curar enfermedades, pero no siempre estas propiedades están validadas científicamente.<sup>03</sup>

Este uso popular ha orientado los estudios de validación farmacológica, los que han demostrado que las plantas de uso medicinal realmente presentan las propiedades atribuidas, pero la mayoría de las veces no se tienen las características específicas de los extractos de las plantas, por lo que es difícil su estandarización y es baja su reproducibilidad.<sup>03</sup>

La caracterización de extractos que se obtiene de las investigaciones, se basa fundamentalmente en definir los rangos que se presentan en sus variables físicas y químicas y elaborar un estándar de los mismos para que los extractos puedan cumplir con las exigencias farmacéuticas que garantizan su acción y puedan así ser utilizadas como materia prima para la elaboración de medicamentos.<sup>03</sup>

Ante esto se suma la Organización Mundial de la Salud que con su contribución constante en la validación de plantas medicinales ha permitido el reconocimiento de algunas plantas de uso terapéutico como el de *Bixa orellana* L. “Achiote” considerado que su toxicidad es nula y la Comisión de las Comunidades Europeas ha autorizado su empleo. La diversidad genética de esta especie es muy amplia. En la selva peruana el achiote presenta una heterogeneidad de sus características botánicas tales como tamaño y forma de la planta, así como forma y color de sus hojas, flores y frutos.<sup>04</sup>

La información morfológica que consta en la presente evaluación, tiene un aporte importante en la variabilidad de dicha especie, para el diseño de estrategias de conservación y siembra de dichos ecotipos ante fines agro rural con expectativas medicinales.

Existen especies medicinales de gran potencial económico por sus principios activos y su capacidad de prosperar en condiciones ambientales consideradas agrícolamente adversas; atribuidas a estas bondades esta la *Bixa orellana* L. “Achiote” que tiene conocimientos en la etnomedicina con propiedades diuréticas y antigonorréicas, eritema, erisipela, estomacal, vómito de sangre, hemorroides, dolor de cabeza y garganta, purgante, desinflamatoria, hipoglicemiante.<sup>05</sup>

Considerando la información empírica y algunos estudios de investigación que motivan principalmente la evaluación de los tres ecotipos de *Bixa orellana* L. “Achiote” para ser validadas y diferenciadas entre sí, que nos permita proponerlas como un potencial antiinflamatorio reflejada en el efecto obtenido durante el ensayo para ser recomendada en posteriores estudios en humanos como alternativa medicinal eficaz y con menores efectos indeseables que contribuyan a nuevas investigaciones.

## 2. PROBLEMA DE INVESTIGACION

- ¿Los extractos acuosos liofilizados de las hojas de tres ecotipos de *Bixa orellana* L “Achiote” codificados como E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub> a dosis de 100 y 200 mg/kg tienen efecto antiinflamatorio, que nos permita proponerlos como alternativa terapéutica en casos de una exposición crónica?
- ¿El efecto antiinflamatorio de los extractos acuosos liofilizados de los tres ecotipos de *Bixa orellana* L. “Achiote” será igual o mayor a los antiinflamatorios usados en el tratamiento sintomático de la inflamación?

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 General:

- Evaluar el efecto antiinflamatorio de los extractos acuosos liofilizados de las hojas de los tres ecotipos E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub> de *Bixa orellana* L. “Achiote” administradas por vía oral en ratas albinas *Rattus norvegicus* cepa Holtzmann.

#### 3.2. Específicos:

- Determinar el efecto antiinflamatorio de los extractos acuosos liofilizados de las hojas de los tres ecotipos de *Bixa orellana* L “Achiote” a dosis de 100 y 200 mg/kg p,c administrada por vía oral, mediante el modelo de Granuloma inducido por pellets de algodón.
- Determinar la dosis y efecto de cada uno de los extractos vegetales.
- Comparar el efecto antiinflamatorio de los extractos acuosos liofilizados de las hojas de los tres ecotipos de *Bixa orellana* L. “Achiote”.
- Comparar el efecto antiinflamatorio de los extractos vegetales en relación al estándar de Indometacina USP (2.5 mg/kg).

# Capítulo II

## 1.- MARCO TEÓRICO

### 1.1. ANTECEDENTES

Los aborígenes de América poseían el conocimiento de muchas plantas medicinales, y transmitieron su sabiduría a los viajeros y misioneros españoles que llegaron a sus tierras, quienes recopilaron información y publicaron importantes obras. Gonzalo Fernández de Oviedo en 1535, publica la obra “De la Natural Historia de las Indias e Islas y Tierra firme del Mar Océano”, donde hace referencia del “Achiote” *Bixa orellana* L. como planta medicinal.<sup>06</sup>

En 1648 se publica en Amsterdam la “Historia Naturalis Brasiliae”, que reúne los trabajos de Guilheme Piso y Georg Marggaf, donde hacen mención a 460 descripciones vegetales del Noreste del Brasil y de otras regiones del interior, destacando la “amoreira blanca” o “urucú” *Bixa orellana* L., la que utilizaba como planta medicinal y también como colorante.<sup>07</sup>

Dodson, C.H., Gentry A.H. y Valverde, F. M. (1985). En La flora de Jauneche, Flórulas de las zonas de vida del Ecuador reportan que el uso más difundido del “Achiote” *Bixa orellana* L., es como colorante de las comidas, en cosméticos y en una diversidad de productos de consumo masivo.<sup>08</sup>

El Ministerio de Salud Pública (MINSAP) de Cuba, a través del bicentenario de Ciencias y Técnica, elabora un documento destinado al estudio de plantas medicinales que emplean tradicionalmente, con las finalidad de brindar una información científica y propiciar el uso racional de tan importante recurso terapéutico publicado en 1993; los autores del mismo, Rosa Menéndez Castillo y Colaboradores, describen al “Achiote” o “Bija” *Bixa orellana* L., como emoliente, refrescante y antiinflamatorio, utilizados las hojas en cataplasma.<sup>09</sup>

La Agencia Española de Cooperación Internacional y el Gobierno Regional de Loreto, publicado en 1994, editan los cuadernos divulgatorios sobre el uso de 105 Plantas Medicinales, en el tratamiento de enfermedades frecuentes de la región, dirigidos a las poblaciones y comunidades asentados en la carretera Iquitos – Nauta. En dicho documento, mencionan al “Achiote” *Bixa orellana L.*, para uso local en lavados, sobre úlceras en la piel, boca, nariz y vagina (piel y mucosas), y con fines cicatrizantes de heridas superficiales y quemaduras.<sup>09</sup>

El Instituto Peruano de Seguridad Social, publica en 1995, Plantas Medicinales de la Amazonia Peruana, donde mencionan al “Achiote” *Bixa orellana L.*, como antálgico, antiinflamatorio dérmico, conjuntival, vaginal y antihipertensivo.<sup>10</sup>

## **1.2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS**

### **1.2.1. INFLAMACION**

La inflamación representa un proceso fisiopatológico fundamental para eliminar estímulos lesivos al organismo vivo. Este proceso es característicamente independiente de la naturaleza del estímulo causante de la lesión (físico, químico o biológico). Se observa inicialmente, dilatación y engorgamiento de los vasos del área afectada, principalmente capilares y arteriolas, con aumento del flujo sanguíneo. Estos fenómenos determinan la aparición de eritema localizado y del aumento de la temperatura en el área. Por lo que después, ocurre rebosamiento de plasma y proteínas plasmáticas hacia el tejido intersticial, con consecuencia formación de edema. Fenómenos subsecuentes constituyen la migración leucocitaria y la actividad fagocitaria por células competentes. Todas estas alteraciones son acompañadas de dolor en el área afectada. Ese carácter estereotipado originó el concepto de mediación química de la respuesta inflamatoria, según el cual las alteraciones fisiopatológicas desencadenantes por el estímulo lesivo son la expresión de las acciones farmacológicas de sustancias endógenas liberadas o activadas, en el transcurso del proceso. Dentro de los mediadores del proceso inflamatorio se han identificado: aminas vasoactivas (histamina), eicosanoides (metabolitos del ácido araquidónico - prostglandinas y leucotrienos), factor activador de plaquetas (PAF), citocinas (interleuquinas), cininas plasmáticas (bradicidina), sistema de complemento y radicales libres, entre otros. Es sabido que una única señal inflamatoria pueda ser producida por un conjunto de mediadores actuando independiente y sinérgicamente, y que un mismo mediador puede ser activo en diferentes etapas de la respuesta inflamatoria. Es importante recordar que las acciones de los mediadores inflamatorios son esencialmente locales.<sup>11</sup>



➤ **Patrones de la inflamación**

- ❖ **Inflamación aguda.**- Es una respuesta rápida ante un agente agresor que sirve para liberar mediadores de defensa del huésped – leucocitos y proteínas plasmáticas en el sitio de lesión. La inflamación aguda tiene tres componentes mayoritarios: 1). Alteraciones en el calibre vascular que dan lugar a un aumento en el flujo sanguíneo; 2). Cambios estructurales en la microvasculatura que permiten que las proteínas plasmáticas y los leucocitos abandonen la circulación y, 3). Migración de los leucocitos desde la microvasculatura, su acumulación en el foco de la lesión y su activación para la eliminar el agente ofensor. <sup>12</sup>
  
- ❖ **Inflamación crónica.**- Es una respuesta de duración prolongada (semanas o meses) en la cual la inflamación es activa, hay destrucción tisular e intento de reparación que suceden simultáneamente. Aunque puede seguir la inflamación aguda, con frecuencia la inflamación crónica empieza insidiosamente, con bajo grado, progresando solapadamente, a veces como respuesta asintomática. <sup>12</sup>
  
- ❖ **Inflamación granulomatosa.**- Es un patrón distintivo de reacción inflamatoria crónica caracterizada por acumulación focal de macrófagos activados que con frecuencia desarrollan una apariencia semejante al epitelio (epitelioides). Un granuloma es un foco de inflamación crónica que consiste en la agregación microscópica de macrófagos que se transforman en células semejantes a las epiteliales rodeadas por un collar de leucocitos mononucleares, principalmente linfocitos y ocasionalmente células plasmáticas. Los granulomas más antiguos se desarrollan dentro de un anillo de fibroblastos y tejido conectivo. Frecuentemente, las células epitelioides se funden para formar células gigantes en la periferia o a veces en el centro de los granulomas.

Existen dos tipos de granulomas que difieren en su patogenia, que son los granulomas de cuerpo extraño, relativamente inertes y los granulomas

inmunitarios que están producidos por partículas insolubles, típicamente microbios, capaces de producir una respuesta inmunitaria celular.<sup>12</sup>

### **1.2.2. MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA INFLAMACION Y LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA**

Para caracterizar los efectos inflamatorios de un producto se aplican las metodologías adecuadas a valorar los principales aspectos del proceso de la inflamación: Tumor (mediante modelos de edema: subplantar, pulmonar, auricular); Color (intensidad de eritema cutáneo); Dolor (contracciones abdominales, repuesta a la presión); Calor (piresis); Aumento de Permeabilidad Capilar (extravasación de colorante); Formación de Exudado (pleuritis experimental); Migración Leucocitaria (pleuritis, fagocitosis); Proliferación celular (fibroma, granuloma); Disfunción de Miembros (artritis aguda y crónica); Efecto Antiagregante Plaquetario (embolia pulmonar); así como algunas de las características del mecanismo de acción: Directa o Indirecta (en animales supra renalectomizados); Preventiva, Curativa o Inmunosupresora (artritis crónica); Inhibición de Mediadores (valoración en exudados); Acción Tópica o Sistémica (edema auricular); Mecanismo Central o Periférico (administración intra-cerebro-ventricular).<sup>13</sup>

Existen varios modelos "in vivo" que son utilizados para los ensayos de compuestos con efecto antiinflamatoria. Dentro de los parámetros normalmente validados esta el modelo de edema, alteraciones de permeabilidad capilar, migración leucocitaria. Estas técnicas de screening son generalmente independientes del compuesto a ser ensayado, también esta el modelo crónico de la formación de granuloma subcutáneo en la rata provocado por la implantación de pellets de algodón en la región interescapular. A pesar de que la mayoría de las veces no se llega a determinar un mecanismo de acción definitivo del extracto de prueba, estos modelos experimentales son de gran importancia y representan el

punto de partida para la caracterización farmacológica de nuevas drogas capaces de inferir con el curso de la inflamación.<sup>11, 14</sup>

El efecto antiinflamatorio que probablemente pueda ejercer una sustancia va a depender específicamente de la influencia que pueda ocasionar sobre los fenómenos desencadenantes del proceso inflamatorio que intervienen en los diferentes modelos de inflamación.

### ***1.2.2.1. Modelos de inflamación aguda.***

La respuesta inflamatoria aguda es un mecanismo de defensa innato y como tal debe ser enfocado, es necesario conocer la interrelación de cada uno de los factores tisulares y mediadores químicos que intervienen para ser manipulados; y tener en cuenta el carácter redundante de los mecanismos inmunológicos que intervienen<sup>16</sup>. Estos modelos de inflamación aguda son adaptados a la respuesta inmediata que se produce consecuentemente de la inducción de la inflamación y esta respuesta es generalmente breve y de acción farmacológica momentánea.

***Los modelos de inflamación aguda son:***

- ❖ **El ensayo de edema plantar inducido por Carragenina.-** Consiste en la administración subcutánea de una pseudosolución de  $\lambda$ - carragenina, un mucopolisacárido sulfatado extraído del alga marina *Chondrus crispus*, a nivel de la aponeurosis plantar de cobayo, rata o ratón, provocando una reacción de carácter inflamatorio mediada por liberación de diversos autacoides (histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, etc.); además, diversos factores del complemento están implicados en la amplificación de la respuesta. El producto a ensayar (de origen natural o sintético) se puede administrar por diferentes vías: intraperitoneal, oral, etc. Una hora después de la administración, la histamina y la serotonina tienen un papel principal como mediadores.

Aproximadamente de una hora y media a dos y media horas después de la inyección de carragenina, intervienen las cininas como mediadores. La última fase está mediada por prostaglandinas, fundamentalmente PGE1, PGE2 y PGF2 $\alpha$ . La respuesta vascular máxima ocurre aproximadamente a las 4 horas de la administración de la carragenina y coincide con la fase mediada por las prostaglandinas. La extravasación de proteínas ocurre durante toda la respuesta al agente edematógeno. La migración celular, fundamentalmente leucocitos polimorfonucleares, comienza a las dos horas de haber inyectado el agente.

Es muy importante la estandarización del ensayo: hora, temperatura, etc. Se prefiere la carragenina ante otros irritantes porque el edema que se produce está menos modificado por factores ajenos a los propiamente característicos de la inflamación y además, porque la actividad antiinflamatoria de este ensayo guarda una buena correlación con la actividad antiinflamatoria en clínica.<sup>13</sup>

- ❖ **El ensayo de edema auricular inducido por ésteres de forbol o ácido araquidónico.**- Se basa en la aplicación de un agente irritante en la oreja del ratón. Los agentes más usados son los ésteres de forbol: PMA (acetato de forbol miristato, por sus siglas en inglés) o TPA (acetato de tetradecanoil forbol, por sus siglas en inglés). Este último es uno de los componentes responsables de la acción irritante del aceite de croton, en el pabellón auditivo del ratón.

La respuesta inflamatoria que se origina por acción de estos agentes consiste en eritema, edema e infiltración por leucocitos polimorfonucleares. También, se liberan mediadores de tipo eicosanoides y se induce la desgranulación de mastocitos; en consecuencia, las sustancias inhibitoras de la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos son evaluables por este modelo. El TPA posee notable actividad protumoral bien relacionada con su acción irritante, como ocurre con otros ésteres de forbol. El parámetro que mejor determina este efecto es el aumento de la liberación de ornitina descarboxilasa epidérmica. Una de las ventajas de este método, en el ámbito de los productos naturales, reside en la

pequeña cantidad de muestra que requiere, debido a la acción local del agente flebógeno. En este modelo también se usa como agente irritante el ácido araquidónico (0,5 mg/oreja).<sup>13</sup>

- ❖ **El ensayo de pleuresía inducida por carragenina.-** La cavidad pleural es un sitio anatómico favorable para la cuantificación de mediadores inflamatorios, medición de la migración de leucocitos, etc., debido a la acumulación de fluidos en el sitio de la inflamación. Se han empleado diferentes agentes irritantes para producir reacciones en la cavidad pleural. Dentro de ellos el agente más usado es la carragenina, ya que produce una reacción intensa y reproducible. Este compuesto es un polisacárido de origen marino que induce respuestas inflamatorias muy por debajo de los niveles tóxicos, y la actividad de los fármacos en este modelo se correlaciona muy bien con la actividad antiinflamatoria que se produce en el hombre.

En las primeras horas de la inyección de carragenina hay una acumulación de fluido, proteínas plasmáticas y entrada de leucocitos a la cavidad. Mediadores tales como la histamina, serotonina, bradiquinina y prostaglandinas son liberados en el fluido pleural. La concentración de histamina, aunque es un mediador importante, no cambia durante la reacción. Sin embargo, hay un incremento de la PGE2 durante las primeras horas y la concentración de PGI2 y TxA2 se incrementa después de 3 horas. El LTB4 está presente en el exudado pleural, ya que los neutrófilos sintetizan este metabolito. En este método se mide la inhibición del edema inducido por la acumulación de fluido que producen los agentes antiinflamatorios que se investiguen. También se cuantifican los principales parámetros de dicho exudado como pueden ser proteínas totales, enzimas lisosomales y mediadores de la inflamación.<sup>13</sup>

- ❖ **El ensayo de permeabilidad vascular.-** En la inflamación se produce un incremento del flujo sanguíneo y de la presión microvascular hidrostática, la cual actúa sinérgicamente con un aumento de la permeabilidad a grandes moléculas,

hecho que potencia la extravasación. Los microvasos normalmente tienen una baja permeabilidad a las proteínas plasmáticas, pero en la inflamación la permeabilidad se incrementa, con la salida de proteínas plasmáticas (albúmina, fibrinógeno, globulinas) al espacio extravascular, contribuyendo este fenómeno al edema tisular. Los cambios estructurales en la pared vascular que son responsables del aumento de la permeabilidad vascular inducida por agentes proinflamatorios causan aperturas transientes en las uniones entre células endoteliales adyacentes de 0,1 a 0,4µm de ancho que no representan un daño al citoplasma de la célula endotelial. Cuando se forman las aberturas el plasma y las partículas circulantes pasan a través de ellas como mediadores de la reacción contra el daño.

El Azul de Evans es un colorante que al ser administrado antes del agente irritante va a permitir el empleo de un método colorimétrico para medir la mayor o menor exudación. En el caso de la permeabilidad vascular medida *in vitro* se procede a utilizar la detección de actividad enzimática de la proteína IgG-peroxidasa como medida del flujo de sustancias inducido entre los dos compartimentos.<sup>13</sup>

#### **1.2.2.2. Modelos de inflamación crónica.**

La recurrencia y amplificación de los procesos fisiopatológicos de esta conduce a la cronicidad, por la pérdida del equilibrio funcional entre los múltiples factores que intervienen. Por esto los modelos de inducción de inflamación crónica se basan de acuerdo a la duración mayor o prolongada del modelo específico, que se relacionan con el factor determinante de su acción farmacológica.

Entre los métodos de inducción crónica están: el modelo de involución del timo por adenolectomía, el modelo de granuloma inducido por implantes de discos de algodón en ratas y modelo de artritis reumatoide por inducción experimental.

- ❖ **El ensayo de involución del timo por adenolectomía.**- Tiene por finalidad de evaluar agentes antiinflamatorios con actividad glucocorticoide en una droga

vegetal. La insuficiencia adrenocortical parece ser ejercida debido a la falta de glucocorticoides, afecta la inhibición del desarrollo de los ganglios linfáticos y disminución del tamaño y peso del timo en ratas y ratones.<sup>15</sup>

❖ **El ensayo de granuloma inducido por disco de algodón.-** Consiste en evaluar la acción antiinflamatoria que involucran el uso de granulomas por cuerpos extraños. La implantación subcutánea de un disco de algodón en ratas resulta en la formación de un granuloma en el sitio del implante. Los primeros eventos ocurren en la vecindad del disco de algodón y resultan en la generación de sustancias quimiotácticas para neutrófilos y monocitos, las cuales pueden ser productos del sistema de complemento, el sistema de cinina o la generación de productos de la oxidación del ácido araquidónico. Esta primera fase comprende una acumulación de fluido y material proteico junto con una infiltración de neutrófilos. El granuloma formado por 6 días es caracterizado por la formación de una cápsula fibrosa vascularizada que contiene fibroblastos y células mononucleares las cuales son ricas en N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG), marcador de enzimas lisosomales. Una activa infiltración de células polimorfonucleares (PMN) también caracteriza esta fase del proceso inflamatorio.<sup>13</sup>

❖ **El ensayo de artritis reumatoide por inducción experimental.-** La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria de carácter simétrico. Afecta predominantemente a las mujeres en una proporción de 3 a 1 con mayor frecuencia durante sus años de vida reproductiva. La artritis afecta articulaciones de gran y pequeño tamaño. Los objetivos del tratamiento son la reducción de la inflamación y la prevención de las lesiones estructurales.<sup>13</sup>

En la actualidad la artritis ha sido asociada con bajos niveles de antioxidantes como tocoferoles, beta-carotenos y retinol, por esta razón también se han incorporado al tratamiento diversos antioxidantes. Entre las inducciones de artritis reumatoide están:

- ❖ **El ensayo de Artritis inducida por el zimosan.-** Se induce una inflamación en la articulación la cual se caracteriza por la infiltración de células mononucleares, signos de vasculitis, hipertrofia de la membrana sinovial y formación de pannus, la cual es seguida por degradación del cartílago. Además, este agente activa el complemento por la vía clásica o alternativa por medio de la ruptura del producto C3-B induciendo la secreción de enzimas lisosomales del macrófago. Recientemente, se ha demostrado que mediadores proinflamatorios como el óxido nítrico y la interleucina 1(IL- 1) están presentes en el fluido sinovial de animales con artritis inducida por zimosan, mientras el factor de necrosis tumoral desempeña un papel insignificante.<sup>13</sup>
  
- ❖ **El ensayo de Artritis inducida por adyuvante de Freund en ratas.-** La artritis por adyuvante es inducida cuando una mezcla de microbacterias muertas en aceite mineral (adyuvante completo de Freund) se administra a algunas ratas a través de una simple inyección subcutánea en el dorso de la cola o en una pata trasera. Hasta el presente, este ha sido el modelo experimental de poliartritis más ampliamente utilizado para la investigación farmacológica de productos naturales y sintéticos con actividad antiartrítica potencial y se caracteriza por el desarrollo de una inflamación poliarticular y una resorción ósea marcada, acompañada de una proliferación ósea periosteal. También se produce destrucción del cartílago pero este efecto es comparativamente menor que la inflamación y la destrucción ósea. Actualmente se le considera una enfermedad dependiente de las células T ya que estas son activadas inicialmente por el adyuvante y estimulan a su vez a los macrófagos y a las células sinoviales para producir citocinas proinflamatorias y metaloproteinasas. Entre las citocinas se ha demostrado que el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina 1 (IL-1) desempeñan un papel protagónico en el desencadenamiento de la reacción inflamatoria y la destrucción tisular que se produce en este modelo, aunque otras citocinas como la IL-6 también desempeñan un papel secundario en estos procesos.<sup>13</sup>



### 1.2.3. *Bixa orellana* L. “Achiote”

#### 1.2.3.1. Clasificación taxonómica <sup>(16)</sup>

División	:	Embriofita
Sección	:	Espermatofita (Fanerógamas).
Sub-sección	:	Angiosperma.
Clase	:	Dicotiledonea
Sub-Clase	:	Archiclamidea
Orden	:	Pariales
Familia	:	Bixacea
Genero	:	<i>Bixa</i>
Especie	:	<i>Bixa orellana</i> L.sin <i>Bixa odorota</i> R. y P. <i>Bixa orellana</i> L. forma <i>leiocarpa</i> Kuntze sin. <i>Orellana americana</i> var. <i>Leiocarpa</i> Kuntze. <i>Bixa excelsa</i> Gleasson y Drukoff. <i>Bixa sphaenocarpa</i> Triana. <i>Bixa platicarpa</i> R. Y P. <i>Bixa upatensis</i> Grosscerdy. <i>Bixa arbórea</i> Huber. <i>Bixa urucurana</i> Willd. <i>Bixa azara</i> R. y P. <i>Bixa fosilia</i> Duarte.

Sinonimia : *Bixa acuminata* Bijer; *Bixa americana* Poir

Nombres comunes:

Abujo, Abujo-majaricke, Acosi (V. andoki), Aciote, Acafran, Achiote, Achote, Achi- huiti, Achiotillo, aisiri (V. chontaquiroy), Anate, Anatto (ingles), Anotto,

Apijiri (V. ese piro), Ipiaco (V. Jibaro), Masce (V. conibo), Maxe (V. cashibo), Ñoñoonva (V. ocaina), Potsote (V. campa), Rucu (V. cocama), Shambu Huayo, Urucu, Uxta (V. Ticuna), Yetsop (V. Amuesha)<sup>17</sup>

**La especie *Bixa orellana* L. "Achiote" es cultivada en otros países y se conoce indistintamente con los siguientes nombres vulgares:**

- achiote (México, Perú, Cuba, Puerto Rico, Argentina).
- bixa, bija (Antillas, Panamá, Colombia).
- urucú (Bolivia, Paraguay).
- urucum, achote, rocú, onoto (Venezuela y Guayana).
- guajachote (El Salvador).
- analto (Honduras).
- arnotto, color ipiacu (Guatemala).
- urucú, urucum, achiote (Portugués)
- annatto (Ingles)
- bija, el bijol, el foucou (Caribe)
- latkhan, el sendri (Indio)
- achuete, el atsuwete, (Philipines)

Otros: annatto (Italiano), rocouyer (Francés), Orleansbaum (Alemania), diteque (Angola), ósun (África).<sup>18</sup>

### 1.2.3.2. Descripción botánica

Generalmente se describe como un árbol pequeño o arbusto grande, que alcanza una altura de 3-5m, pudiendo llegar excepcionalmente entre 8-10m, tiene una corteza parda grisácea o anaranjada, de ramas delgadas, bien leñosas, cuya coloración varía desde verde hasta moradas, el follaje es denso y no excesivamente ramificado; la ramificación que se inicia desde la base del tronco es dicotómica. El

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA – UNAP**

diámetro en las base del tallo puede alcanzar de 20 a 30cm, sus raíces bien desarrolladas se muestran pivotante. <sup>17</sup>

Las hojas son simples, alternas, ovadas o acorazonadas, pecioladas y glabras en ambas caras, de ápice acuminado, generalmente puntiagudas de 10 - 20cm de largo y 5 - 10cm de ancho, disminuyendo gradualmente, haciéndose en la base truncada algo acorazonada, su color es verde en ambas caras, mostrando algunas veces discreta coloración rosada o purpúrea en el envés de las nervaduras, especialmente cuando maduras se tornan algo coriáceas. <sup>17</sup>

Las flores se presentan en panojas, son rosadas o blancas; la floración es escalonada, la apertura de las flores ocurre primero en la parte superior, siguiendo con la parte inferior. Con cáliz de 5 sépalos, caducos, rojizos o blancos, de forma oval y alcanzan 2.4 a 2.8cm de largo en el ápice. Tienen 5 pétalos redondos a ovalados de 1 a 2cm. de largo, sus estambres son pequeños con pedúnculos muy cortos y numerosos, dispuestos alrededor del pistilo; la antera contiene 8 sacos embrionarios que producen abundante polen. El pistilo con un estigma en forma de boca abierta, el estilo es alargado y erecto. <sup>17</sup>

El fruto es una cápsula dehiscente, ovoide, puntiaguda, elipsoidal o cónica, de 3 a 5cm de largo suele presentarse en racimos, cubiertos por espinas largas y suaves, de colores rojo, café verdoso o amarillo al alcanzar la madurez. <sup>17</sup>

Las semillas son poliédricas, generalmente piramidales, cubiertas por una membrana (arilo) pulposa, pegajosa, resinosa de color rojo o anaranjado <sup>17, 10</sup>

Esta especie en la selva peruana son plantas de hábitos arbustivos y arbóreos; según Cevallos 1978, es una planta de porte bajo 3-4 m. (arbustivo), mientras León 1968, es una planta que puede llegar excepcionalmente hasta 10 m (arbóreos).<sup>19</sup> Sin embargo existe un gran variabilidad genética de la especie *Bixa orellana* L. “Achiote”, esta información se fundamenta en las 58 colecciones que se han



realizado en diferentes lugares de la Selva Peruana, en las cuales se pueden observar una gran diversidad en relación al hábito de crecimiento (arbustos y árboles); coloración del tallo (gris, anaranjado y marrón); color de las hojas (verdes con diferentes tonalidades y violetas); color de las flores (blancas y violetas con diferentes tonalidades); color de los frutos (verdes con diferentes tonalidades; amarillo con diferentes tonalidades, anaranjado, rojo con diferentes tonalidades, marrón y negro); forma de los frutos (ovoide, redondo elíptico y cónico ); espinosidad de los frutos (sin espinas, muy baja, baja, alta y muy alta espinosidad); longitud de las espinas (muy cortas, cortas, largas y muy largas); número de semillas por fruto, etc.<sup>19</sup>

La diversidad genética de la especie es muy amplia, referida a características fenotípicas. Hernández 1988.<sup>19</sup> Taxonómicamente pertenece al género *Bixa* y a la familia BIXACEAE el género consta de 5 especies para el Perú según Brako y Zarucchi (1993) y a nivel del Noroeste de Sud América 5 especies.<sup>20</sup> Según Vásquez y Rojas (2000) la familia BIXACEAE presenta 2 géneros amazónicos, 6 especies amazónicas, 3 géneros para el Perú y 8 especies para el Perú.

En la selva peruana el achiote presenta una heterogeneidad de sus características botánicas tales como tamaño y forma de la planta, así como forma y color de sus hojas, flores y frutos. Esto permite la existencia de un gran potencial de desarrollo del cultivo del achiote en la selva baja, por ser una especie adaptada a las condiciones agroecológicas de la zona.<sup>19</sup>

De acuerdo a la caracterización realizada en el departamento de etnobotánica del Instituto de Medicina Tradicional (IMET- ESSALUD), se seleccionan ocho ecotipos de *Bixa orellana* L. “Achiote”, los cuales se encuentran ubicadas en el Fundo Zungarococha en la carretera de Puerto Almendra al margen derecho de la Facultad de Agronomía, en el distrito de San Juan Bautista.

CUADRO N° 01.- CARACTERISTICAS DE OCHO ECOTIPOS DE *Bixa orellana*  
L. "Achiote"

Ecotipos	Características del color de las flores	Características de los frutos: color, forma, pubescencia y otros
E <sub>1</sub>	Blancas	Verdes, cónica, abundante pubescencia verduzca
E <sub>2</sub>	Blancas	Verde intenso, escasa pubescencia
E <sub>3</sub>	Blancas	Verde, con escasa pubescencia y pequeños restos en la parte basal del fruto de forma curvada hacia el pedúnculo
E <sub>4</sub>	Blancas	Verdes, globosas, con abundante pubescencia cortas verduzcas
E <sub>5</sub>	Rosadas	Verde-rojizas, globosas achatadas a los costados, abundante pubescencia corta rojizas.
E <sub>6</sub>	Rosadas	Rojas, globosas achatadas en los costados, abundante pubescencia de color rojo intenso.
E <sub>7</sub>	Rosadas	Verde-rojizas, globosas abundante pubescencia cortas rojizas.
E <sub>8</sub>	Blancas	Verdes, globosas, con abundante pubescencia largas verduzcas.

**\*Departamento de Etnobotánica IMET- ESSALUD.**

**Caracterización de ocho ecotipos de *Bixa orellana* L. "Achiote"-  
Zungarococha - 2008**

### 1.2.3.3. Información etnomédica

*Bixa orellana* L. "Achiote" es una de las especies vegetales con mayor acreditación y de espectro terapéutico popular, fama que le llega de más de cuatro siglos de uso por las comunidades indígenas sudamericanas, por las que se les atribuye las siguientes propiedades medicinales:

En la medicina tradicional se suele emplear las hojas de Achiote como antiinflamatorio vaginal, conjuntival, cicatrizante dérmico. La goma de las hojas molidas se toma como diurético, purgante y en casos de gonorrea.

La decocción de hojas se aplica contra la disentería, diarrea y en quemaduras.<sup>21,22</sup> También esta forma de decocción se emplea en gargarismos, se emplea como desinflamatorio en las inflamaciones de boca y garganta y como emenagogo, hepatotrope, diurético, purgativo, antivenéreo, antiemético y reanimante después de las fiebres intermitentes.<sup>23</sup>

También de uso popular como antigonorreica.<sup>21</sup> El cataplasma de las hojas o semillas se aplica localmente en micosis.<sup>22</sup> El mucílago de las hojas se aplica en conjuntivitis.<sup>24</sup>

Las hojas tienen propiedades diuréticas y antigonorreicas, eritema, erisipela, estomacal, vómito de sangre, hemorroides, dolor de cabeza y garganta, purgante, desinflamatoria, hipoglicemiante. El té preparado con pequeños vástagos y hojas es usado como antidisentérico, afrodisíaco, astringente y para tratar infecciones de la piel, fiebre y hepatitis.<sup>25</sup>

La infusión de las hojas y semillas posee acción antidiarreico. Se usa para combatir los vómitos, la hipertensión arterial, es antiinflamatorio en casos de

conjuntivitis. Se utiliza también para estimular la digestión, en casos de hepatitis y otras afecciones hepáticas.

Esta planta se recomienda también como desinflamante en afecciones de las vías urogenitales de las mujeres. Las investigaciones realizadas demuestran que esta planta posee acción antiinflamatoria y cicatrizante, por lo que la utiliza en el tratamiento de la hiperplasia de próstata<sup>26</sup>

Las hojas frescas se aplican en fricción sobre el cuero cabelludo contra la caspa y para estimular el crecimiento del cabello.<sup>27</sup>

***Formas de uso etnomédico para otros países:***

- *En Bolivia:* Las hojas se emplean en forma de cataplasma para aliviar cefaleas. La decocción de las mismas se emplea en forma de gargarismos en afecciones de garganta.
- *En Colombia:* contra enfermedades hepáticas.
- *En Brasil:* diurético, enfermedades cardíacas, afrodisíaco y expectorante.
- *En Honduras:* para combatir diarreas, fiebres, sarampión y disenterías.
- *En Guatemala:* El jugo obtenido de las hojas machacadas se utiliza como antiemético y antidiarreico.<sup>18</sup>

#### 1.2.3.4. Componentes químicos de las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote”

Las hojas contienen; flavonoides (apigenina, hipoaletina, cosmosiina), diterpenos (farnesilacetona, garanil geraniol, geranio formato) y un derivado sesquiterpénico, alcaloides, esteroides, fenoles, taninos pirogálicos, antraquinonas, cumarinas fijas, aceites esenciales y ácido gálico.<sup>28</sup>

Existen presencia también de metabolitos como la quercetina fue identificada en las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote”. No es solo la presencia de quercetina, sino también de taninos carotenoides como la bixina y la norbixina presentes en *Bixa orellana* L. que justificarían su actividad citoprotectora, al inducir la producción de prostaglandinas y GS- NP (Niveles de grupos sulfidrilos no proteicos).<sup>29</sup>

El laboratorio naturalista CODEPLAM S.R.LTDA. “LINDA VIDA” presume que la especie de *Bixa orellana* L. “Achiote” presenta esteroides en las hojas y sugiere que ellos son responsables de las propiedades antiinflamatorias que la medicina popular le atribuye para usarlas como antirreumáticos. De otro lado, los flavonoides son vasodilatadores coronarios, lo que justifica su utilización en el tratamiento de afecciones al corazón, como son las carditis, endocarditis y pericarditis. Asimismo, debido a la presencia de los flavonoides se utiliza como un efectivo diurético, actuando sobre el sistema urogenital y regulando la función renal. La existencia de antraquinonas explica su utilización, en forma de porciones, como purgante. También esta recomendado para renovar las fuerzas digestivas después de las fiebres intermitentes y de las fiebres mucosas.<sup>30</sup>

En el tamizaje fitoquímico de las hojas de los tres ecotipos en estudio de *Bixa orellana* L. “Achiote” realizado en el Instituto de Medicina Tradicional (IMET)-ESSALUD, se encontraron componentes como flavonoides en mayor concentración para los tres ecotipos, alcaloides, azúcares reductores, glicosidos



cardiotonicos, principios amargos y otros mediante la extracción con éter etílico, alcohol etílico y agua (ANEXO N° 02)

### 1.2.3.5. Estudios fitoquímicos

Los primeros estudios de las hojas de *Bixa orellana* L. "Achiote" reportan que estas contenían leucocianidina, ácido elálgico y dos flavonoides no identificados. La presencia de ácido elálgico fue confirmada más tarde por Lebreton y Bouchez.<sup>31</sup>

**M. Chaco, et al. (1969).** Describen el procedimiento para la obtención de un sesquiterpeno a partir de las hojas de *Bixa orellana* L. "Achiote", para el cual sugirieron el nombre de bixaganeno. Las características físicas y la composición elemental encontrada y los trabajos realizados para obtener la fórmula estructural, sugirieron un sesquiterpeno tricíclico que contiene un doble enlace oleofínico tetrasustituido y tres grupos metílicos, con una fórmula molecular  $C_{18}H_{24}$ .

**Lawrence BM y Hogg JW. (1973).** Menciona que sus propiedades están directamente relacionadas con la composición química de las hojas, pues se han aislado flavonoides (apigenina, luteolina, hipolaetina e isoscutelareína), algunos de sus heterósidos (cosmosiína), derivados bisulfatados (apigenina, luteolina-7-bisulfato e hipolaetina-8-bisulfato), diterpenos (farnesilacetona, geranil-geraniol, geranilformiato), ácido gálico, pirogalol y aceite esencial, caracterizado por la presencia de un hidrocarburo sesquiterpénico inusual, el bixaganeno o ishwarano.<sup>32</sup>

**J. Harbone (1975).** Indica que tres nuevos flavonas bisulfato fueron aisladas de las hojas de *Bixa orellana* L. "Achiote", las que fueron identificadas como 7 – bisulfato de apigenina, 7 – bisulfato de luteolina y B – bisulfato de hipolaetina.<sup>33</sup>

**E. Pinto. (1980).** Realizó un análisis químico cualitativo del extracto metanólico al 80% de tallo, hojas y semillas de *Bixa orellana* L. "Achiote" encontrando alcaloides cuaternarios, alcaloides no cuaternarios, saponinas, esteroides

insaturados, cardenólicos, bufadienólicos, flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles, antraquinonas, glicósidos cianogenéticos.<sup>34</sup>

**Atal & Kapur (1982).** Reporta la presencia de leucocianidina y ácido elágico.<sup>35</sup>

**Terashima et al (1991).** Reportan que las hojas contienen al flavonoide isocuteralin y los benzenoides: ácido gálico y pirogalol.<sup>36</sup>

**Garro et al. (1993).** Aíslan 3 fracciones por TLC preparativa con respuesta positiva a Shinoda, UV y reacciones de color características para flavonoides, obteniendo cristales de rutina.<sup>37</sup>

**En el IMET, (1996).** Se realizó un screening fitoquímico en las hojas de *Bixa orellana* L. "Achiote" encontrándose: alcaloides, esteroides, fenoles, taninos pirogálicos, quinonas, antraquinonas, cumarinas fijas y flavonoides.<sup>17</sup>

**Roersch C (1994). y Silva H (1997).** Encontraron en las hojas presencia de flavonoides (apigenina, hipoaletina, cosmosiina), diterpenos (farnesilacetona, garanil geraniol, garanil formato) y un derivado sesquiterpenico, alcaloides, esteroides, fenoles, taninos pirogálicos, antraquinonas, cumarinas fijas, aceites esenciales y ácido gálico.<sup>38 y 39</sup>

**Alonso. (1998).** Aísla los diterpenos: farnesilcetona, geranio geraniol, geranio formiato y ácido gálico.<sup>40</sup>

### 1.2.3.6. Estudios farmacológicos

**Carbajal D. et al., 1991.** Demostró que la decocción de la semilla y hojas en dosis de 320 mg/ml no presenta actividad cardiotónica en tejido cardíaco de cobayo y Weniger B. et al., 1993; determino que tanto el extracto acuoso como el etanólico inhiben la proliferación de células de linfoma Molt4.<sup>18</sup>

**Caceres, A. 1995.** Reporta que la tintura de corteza y hojas tienen actividad contra *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. Typha* y *S. flexneri*; la tintura de las hojas tienen actividad contra *N. gonorrhoeae* y la infusión de las hojas tiene acción sobre *T. vaginalis*.<sup>21</sup>

**Gupta MP. 1995.** Los extractos etanólicos de frutos y hojas han mostrado tener actividad antimicrobiana “*in vitro*” actividad en contra de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.<sup>22</sup>

**Silva H y col. 1998.** Estudios realizados en el IMET – IPSS, reportan que el extracto liofilizado de hojas frescas de *Bixa orellana* L. “Achiote” poseen efecto antifúngico “*in vitro*”, sobre la *Candida albicans*, a las concentraciones de 250, 300, 400, y 500mg/kg; a dosis de 0,41 y 0,82 g/kg se observo efecto antalgico en *Mus musculus* L.; a dosis de 1mg/ml, 5mg/ml y 10mg/ml administrado en el musculo liso de intestino de *Rattus norvegicus*, produjo relajación que se incremento con las dosis respectivas. No se encontró actividad inmunoestimulante.<sup>41</sup>

**En el IMET – IPSS 1998.** Se evaluó el extracto liofilizado de las hojas de *Bixa orellana* L. administrado por vía intraperitoneal en el diseño experimental “*in vivo*”, utilizando 50 especímenes de *Mus musculus* L., encontrándose que a dosis de 0,651 g/kg/p.c., inhibe la inflamación inducida con formol al 10%, en un 63,9%; además se determino el efecto antiinflamatorio del extracto liofilizado de

hojas frescas de *Bixa orellana* L. “Achiote” administrado por vía oral y su comparación con Ibuprofeno, concluyendo que a dosis de 10g/kg/p.c., inhibe la inflamación inducida, con formol al 10%, en un 54% , mientras que el Ibuprofeno a dosis de 0,08g/kg (dosis calculada a partir de la utilizada en humanos) inhibe la inflamación en un 17,9%.<sup>41</sup>

**Shilpi J. 1999.** Encontró que el extracto metanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote” presentó actividad captadora de radicales libres, igualmente mostró actividad analgésica y antidiarreico en ratones.<sup>51</sup>

**Baelmans R. et al. 2000.** Desarrollo estudios encaminados a determinar los compuestos activos responsables de la actividad antimicrobiana y antimalarica de esta especie; finalmente sobre un total de 178 especies empleadas por la etnia Tacana (Bolivia) testeadas, sólo cinco extractos (entre ellos el de *Bixa orellana* L.) demostraron una fuerte actividad antimalárica in vitro al realizar el test de inhibición de la polimerización hematógena, reportando un 70 % de actividad a dosis de 2,5 mg/ml.<sup>18</sup>

**Otero R. et al., 2000.** En sus estudios, evidencio que el extracto etanólico de las hojas y ramas de *Bixa orellana* L. “Achiote” presentan actividad antiofidica.<sup>42</sup> Doce de 74 extractos etanólicos de plantas utilizadas por los curanderos tradicionales de serpientes en la región noroeste de Colombia, se activan contra el efecto letal de veneno de *Bothrops atrox* ip cuando fueron inyectados en ratones (18-20 g). Después de la preincubación de dosis subletales de cada extracto (0.5-4.0 mg / ratón) con 1,5 ip dosis letal 50% (DL50) (99,3 microg) de veneno.<sup>43</sup>

**Martínez C. M.2000.** *Bixa orellana* visto como un bactericida en el cultivo de cebollas, en condiciones de laboratorio, debido a la baja eficacia de los productos químicos en el control de la enfermedad, se evaluaron extractos vegetales de plantas con propiedades bactericida, antiséptica, antiinflamatoria y desinfectante.<sup>44</sup>

**Inchaustegui R. et al, 2001.** Realizó estudios clínicos de la Fase I de *Bixa orellana* L. en forma de óvulos vaginales revelan que no alteran los niveles hematológicos y bioquímicos y la constitución de la mucosa vaginal de las voluntarias, determinando la ausencia de reacciones adversas. Los estudios de Fase II sobre *Bixa orellana* L. demuestran mayor actividad a dosis única. Los óvulos de *Bixa orellana* L. “Achiote” mostraron actividad antimicrobiana sobre *Cocobacilos*, *Candida albicans*, en tanto el Clotrimazol actuó solamente sobre *Candida albicans* y *Cocobacilos*. *Bixa orellana* L. “Achiote” mostro mayor actividad antiinflamatoria comparativamente con los óvulos de clotrimazol.<sup>45</sup>

**Nonato R. L. 2003.** Realizo ensayos clínicos (fase preclínica) para evaluar el efecto antiinflamatorio (en procesos crónicos), analgésico (periférico), transito intestinal y performance motora del extracto atomizado de hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote” elaborado por el laboratorio de HERSIL S.A. – Lima; en ratas Holtzman y ratones albinos Balb/c procedentes del CNPB- MINSA, en iguales condiciones de alimentación y hábitat. En el modelo de contorsiones abdominales aplicado, los resultados obtenidos con el extracto atomizado a la dosis de 100 y 500 mgkg<sup>-1</sup> disminuyeron de forma altamente significativa en relación con los obtenidos con la solución salina utilizada como control. Se demostró la presencia del efecto analgésico del atomizado a dosis de 100 y 500 mgkg<sup>-1</sup>, pero no efecto antiinflamatorio en procesos de inflamación crónica intestinal. El atomizado de *Bixa orellana* L. “Achiote” administrado por vía oral a la dosis de 500 mgkg<sup>-1</sup>, manifestó reducción del tránsito intestinal; pero no altero la actividad y performance motora de ratones albinos hembras.<sup>46</sup>

**Alvarado D, et al. 2004.** Demostró efecto antioxidante en los diferentes extractos de las hojas de *Bixa orellana* en hígados de ratones (14 a 16g), sometidos a estrés y distribuidos aleatoriamente en 6 grupos (n=5): grupo I basal (suero fisiológico); grupo II control; grupo III extracto hidroalcohólico 200 mg/kg; grupo IV extracto acuoso 200 mg/kg; grupo V vitamina E 10 UI/kg. Concluye la existencia de una reducción en los niveles de lipoperoxidación en hígado, en aquellos animales que

recibieron los extractos y la vitamina E; también se observó que los niveles de lipoperoxidación en hígado aumentan cuando los ratones son sometidos a nado forzado.<sup>47</sup>

**Rojas R., Caviedes L., Gilman R.H. y Lock O. 2004.** Probaron catorce extractos etanolicos de planta del Perú para actividad de anti-*Mycobacterium tuberculosis* contra el H37Rv sensible a *Mycobacterium tuberculosis* de prueba rápida y las pruebas de colorimetría en la que se ensayan TEMA (el Ensayo Microplate Tetrazolium). Se seleccionaron las Plantas basado en su uso tradicional para el tratamiento de tuberculosis, lepra o hemoptysis entre esta *Bixa orellana* L. “Achiote”.<sup>48</sup>

**Incio V. N. y Álvarez P. 2006.** Realizaron pruebas in Vitro en el extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote” para un modelo experimental en el estudio de posibles principios activos antipalúdicos y obtuvieron que no afectaba los cultivos de eritrocitos no parasitados en cambio en los cultivos de eritrocitos parasitados de *P. falciparum* produjo lisis de tales eritrocitos a partir de las 24 horas aproximadamente, a diferencia del sulfato de quinina se observo lisis de los eritrocitos parasitados alrededor de las 30 horas , sin afectar a los no parasitados y en las que se aplico una muestra de 0,1mL de extracto de *Bixa orellana* L. Su observación duro cinco días.<sup>49</sup>

**Huamán O., y otros. 2007.** El extracto hidroalcohólico de hojas de *Bixa orellana* L. incrementó los GS-NP en 133 y 168% ( $p < 0,01$ ), a las dosis de 100 y 200 mg/kg, y la producción de moco, en 39,4% y 44,9 %, respectivamente, a las dosis de 200 y 400 mg/kg ( $p < 0,01$ ). Sin embargo, solo en el grupo que recibió la dosis de 400 mg/kg de peso se produjo un descenso de pH de forma significativa ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, la acidez total a la dosis de extracto 100, 200 y 400 mg/kg presentaron un incremento de 62,3%, 58,2% y 166,6%, respectivamente ( $p < 0,01$ ). El tratamiento con extracto hidroalcohólico de *Bixa orellana* incrementa la producción de GS-NP y moco gástrico, sin inhibición de la acidez total. Bajo las

condiciones experimentales de este ensayo, se puede concluir que el tratamiento con extracto hidroalcohólico de *Bixa orellana* vía orogástrica tiene un rol citoprotector de la mucosa gástrica, evidenciado por la inducción a la producción de GS-NP y moco en la región glandular del estómago de las ratas a pesar del incremento de la acidez total en la secreción gástrica.<sup>50</sup>

**Instituto de Medicina Tradicional – IMET. 2008.** Se realizó evaluaciones para determinar actividad antimicrobiana de los extractos acuosos liofilizados de las hojas de ocho ecotipos de *Bixa orellana* L., a una concentración de 50mg/mL, en la que presentaron moderada actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*. Los ecotipos 3 y 6 son moderadamente activos, mientras que los ecotipos 1, 2, 4, 7 y 8 presentan baja actividad antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis*. En los extractos hidroalcohólicos liofilizados a 50mg/mL de los ocho ecotipos de *B. orellana* L, la actividad antimicrobiana fue moderada frente a *Staphylococcus aureus* y baja frente a *Enterococcus faecalis*; con *Escherichia coli* la actividad fue moderada en el ecotipo 3 y en los ecotipos restantes la actividad antimicrobiana fue baja.<sup>53</sup>

En el **Instituto de Medicina Tradicional – IMET. 2008.** Se realizó ensayos de evaluación antiinflamatoria con modelo preliminar mediante el método de inflamación crónica de granuloma inducido por pellets de algodón, se utilizo ratas albinas machos cepa Holtzmann en número de tres animales por grupo experimental con dosis de 200 mg/kg por vía oral, las muestras en estudio fueron los ocho ecotipos de *Bixa orellana* L. “Achiote” diferenciadas entre si por sus características en frutos y flores a manera de determinar cual de los ecotipos codificados como E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>, E<sub>4</sub>, E<sub>5</sub>, E<sub>6</sub>, E<sub>7</sub> y E<sub>8</sub> tienen mayor actividad antiinflamatoria, que concluyo con los resultados de mayor actividad solo los tres primeros ecotipos de *Bixa orellana* L. “Achiote”. Los resultados fueron E<sub>1</sub> (34 %), E<sub>2</sub> (29.7 %) y E<sub>3</sub> (33 %) en la inhibición de la inflamación y se comparo con el control positivo de Indometacina a dosis de 2.5 mg/kg por vía oral que inhibió la inflamación en un 43 %.<sup>54</sup>

Otros estudios farmacológicos y clínicos indican que el tratamiento en asociación de forma de capsulas de 100mg de extracto atomizado de las hojas de *Bixa orellana L* y 90mg de extracto atomizado de corteza de *Uncaria tomentosa Wild DC*, administrados por vía oral, influye sobre el diámetro prostático en pacientes con HBP. Los resultados indican que a mayor dosificación de 3 capsulas cada 8 horas se observa disminución en un 10.5% de los niveles del PSA, pero dentro de los valores normales; asimismo, en cuanto al tamaño del adenoma prostático, se aprecia una disminución de 7.5%, 10.3% y 8.0% del diámetro longitudinal, transversal y antero posterior respectivamente; con los diferentes niveles de dosificación, no se observaron reacciones adversas, ni cambios significativos en los valores hematológicos y bioquímicos, hubo disminución de leucocitos ( $p<0.0001$ ), monocitos ( $p<0.0001$ ), linfocitos ( $p<0.079$ ), velocidad de sedimentación ( $p<0.011$ ), y el incremento de la fosfatasa alcalina, TGO y TGP ( $p<0.0001$ ) se produce dentro de los límites normales. Asimismo disminuye significativamente el colesterol ( $p<0.041$ ); glucosa ( $p<0.007$ ). Que concluye en la mejoría de la sintomatología prostática y disminución del adenoma prostático con dosis de tres capsulas de la asociación administrada vía oral, 3 veces al día; y no se ha evidenciado efectos adversos.<sup>52</sup>

#### 1.2.3.7. Estudios toxicológicos

**Shilpi J. A, Uddin S. J, Alam M. S, et al.** En ensayos de toxicidad aguda en ratones, el extracto metanolico de las hojas en dosis de 4000 mg/kg no produjo efectos tóxicos dentro del tiempo de evaluación.<sup>51</sup>

**Arroyo J. & Li E., 1999.** La determinación de la  $DL_{50}$  de la combinación (2:1) del extracto acuoso de hojas de *Bixa orellana* y corteza de *Uncaria tomentosa* demostró muy baja toxicidad, del orden de 28.000:14.000 mg/k. La administración subcrónica de dicha combinación no provocó alteraciones en los parámetros de proteínas totales, albúmina, globulinas y transaminasas<sup>18</sup>



**Rios I. F et al, 2001.** Realizaron estudios de toxicidad del extracto liofilizado de la *Bixa orellana* L. "Achiote" encontrándose que no es toxico en modelos experimentales, presentando una DL<sub>50</sub> de 0.393 g/k por vía intraperitoneal y 14.58 g/k por vía oral. En el estudio de toxicidad sub-crónica del extracto liofilizado de la *Bixa orellana* L. "Achiote", los exámenes anatómo-patológico no han revelado anomalías histopatológicas, manteniendo una estructura celular normal.<sup>45</sup>

**Nonato R. L. 2003.** Evaluó la toxicidad aguda del extracto acuoso liofilizado y extracto estrujado liofilizado de las hojas de *Bixa orellana* L. "Achiote", además realizó el ensayo a dosis repetida de ambos extractos liofilizado por vía oral en ratas albinas cepa Holtzmann se administró dosis de 5.0 g/kg durante 30 días. La DL<sub>50</sub> del extracto acuoso liofilizado de *Bixa orellana* L. "Achiote" en ratones fue de 0.875 g/kg por vía intraperitoneal y de 17.0 g/kg por vía per-oral. La DL<sub>50</sub> del extracto estrujado administrado en ratas albinas fue mayor de 10.0 g/kg por vía oral. La administración en ratas albinas de 5.0 g/kg de *Bixa orellana* L. "Achiote" a los 30 días, incrementó los niveles de fosfatasa alcalina, los animales disminuyeron de peso y se mantienen dentro de los rangos normales los valores de TGP, urea, bilirrubina total y de creatinina. Concluye que el extracto acuoso liofilizado o estrujado de *Bixa orellana* L. "Achiote" se clasifica como prácticamente no tóxico por vía oral.<sup>54</sup>

## 2. DEFINICIONES OPERACIONALES

### 2.1. Variable Independiente:

Extracto liofilizado acuoso de las hojas de los tres ecotipos E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub> de *Bixa orellana* L. “Achiote”.

**Indicador:** Dosis de 100 y 200mg/kg. p. c.

Fármaco utilizado como control positivo, Indometacina USP a dosis de 2.5 mg/kg.

### 2.2. Variable Dependiente:

Efecto antiinflamatorio de los ecotipos E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub> de *Bixa orellana* L. “Achiote” evaluadas, según la dosis ensayada.

**Indicador:** promedio del contenido fibrogranuloso de los diferentes grupos.

CUADRO N° 02.- OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA
Extractos acuosos liofilizados de las hojas de los tres ecotipos E <sub>1</sub> , E <sub>2</sub> y E <sub>3</sub> de <i>Bixa orellana</i> L. "Achiote"	Producto de la extracción de las hojas, obtenidos por cocción con agua, y conservada por liofilización es administrado según el peso corporal.	Extracción acuosa por cocción de las hojas a 60°C durante 2 horas. Con posterior filtrado, concentrado y liofilizado (-40°C, 1.33x10 <sup>-3</sup> MBARR/72 horas).	- Dosis de 100 y 200mg/kg.	Intervalar Tipo: Cuantitativo
Indometacina USP.	Sustancia con efecto antiinflamatorio.	Formulación convencional de Indometacina y excipientes dosificados bajo una forma farmacéutica establecida.	- Dosis de 2.5 mg/kg.	Intervalar Tipo: Cuantitativo



### 3. HIPOTESIS

Los extractos liofilizados acuosos de las hojas de los tres ecoupos de *Bixa orellana* L. "Achiote" a dosis de 100 y 200 mg/kg tienen igual o mayor efecto antiinflamatorio que la Indometacina USP a 2.5 mg/kg por exposición crónica.

# Capítulo III

## 1. METODOLOGIA

### 1.1. Tipo de estudio

**1.1.1. Experimental:** se realizo el control de variables de acuerdo al protocolo de estudio, con la finalidad de identificar las posibles relaciones entre causa y efecto.

**1.1.2. Prospectivo:** en el registro de información se inicio a partir de la fecha de estudio.

**1.1.3. Longitudinal:** se estudiaron las variables a lo largo del tiempo durante el periodo de investigación.

### 1.2. Diseño de investigación

El ensayo pre – clínico se realizo con ratas albinas machos *Rattus norvegicus* cepa Holtzmann, con grupos tratados al azar y de peso corporal entre 150 a 200g en condiciones controladas, a los que se les administro el extracto acuoso liofilizado de las hojas de los tres ecotipos E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub> de *Bixa orellana* L. "Achiote" a dosis de 100 y 200mg/kg, p.c en un intervalo de 6 días por cada dosis a evaluar, de igual manera se realizo con los grupos experimentales de control (Indometacina USP y solución salina 0.9%).

La distribución de los grupos de estudio fue de acuerdo al siguiente esquema de tratamiento:

**CUADRO N° 4.- Esquema de tratamiento en la investigación**

<b>Grupo experimentales</b>	<b>Dosis ensayadas</b>	<b>N° de animales</b>	<b>Vía de administración</b>
<b>Ecotipos I, II y III</b>	100 y 200mg/kg	6 por c/dosis	Oral
<b>Indometacina USP</b>	2.5mg/kg	6 por c/dosis	Oral
<b>Solución salina 0.9%</b>	3ml aprox.	6 por c/dosis	Oral

### **1.3. Diseño del Modelo utilizado: Granuloma inducido por pellets de algodón.**

Se midió los pesos de los pellets de algodón previo a ser colocados en la región interescapular del lomo de la rata albina; posteriormente se pesaron los pellets húmedos después de la extracción (peso húmedo) y después de ser sometidos a una temperatura de 110°C por 5 horas (peso seco), para establecer la diferencia de los pesos útil para determinar el promedio del contenido acuoso y fibrogranuloso presentes en la inflamación que permitió confirmar la inhibición de la inflamación.

Cada grupo de ensayo estuvo conformado por 6 ratas en considerable estado físico, número necesario para demostrar o rechazar la hipótesis.



## 2. POBLACION Y MUESTRA

**2.1. Población vegetal:** conjunto de hojas de los diferentes ecotipos *Bixa orellana* L. “Achiote” que se encuentran en el Fundo Zungarococha en la carretera de Puerto Almendra al margen derecho de la Facultad de Agronomía, ubicado en el distrito de San Juan Bautista, Iquitos – Perú.

**2.2. Muestra vegetal:** se utilizaron hojas aparentemente sanas, aproximadamente 500g de cada uno de los ecotipos E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub> de *Bixa orellana* L. “Achiote”, cuyos extractos posteriormente fueron liofilizados en el laboratorio de Fitoquímica del IMET- ESSALUD con sede en la ciudad de Iquitos.

### 2.2.1. Criterios de inclusión del material vegetal

- Hojas enteras.
- Hojas en buen estado, aparentemente sanas.
- Hojas verdes grandes y medianas.

**2.3. Población animal:** se utilizaron ratas albinas machos *Rattus norvegicus* cepa Holtzmann, provenientes del Centro Nacional de Producción de Biológicos del Instituto Nacional Salud, con sede en la ciudad de Lima.

**2.4. Muestra animal:** se emplearon 80 animales en total, teniendo en consideración que en toda la investigación se tiene una pérdida del 5% del tamaño muestra. La selección de los animales fue al azar teniendo en cuenta los criterios de inclusión.

#### **2.4.1. Criterios de inclusión de los animales**

- Ratas Albinas adultas jóvenes y sanas, que no mostraron alteraciones funcionales o signos evidentes de enfermedad.
- Ratas del sexo macho y con peso corporal entre 150-200g.

### **3. INSTRUMENTOS Y MATERIALES**

#### **3.1. Instrumentos**

Fichas de recolección de datos.

#### **3.2. Material vegetal**

Extractos acuosos liofilizados de los tres ecotipos E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub> de *Bixa orellana* L. “Achiote”.

#### **3.3. Material biológico**

Ratas albinas *Rattus norvegicus* cepa Holtzmann, sexo macho.

### **3.4. Materiales de laboratorio**

- Algodón hidrófilo.
- Pellets pesados (5 mg- estériles a 120<sup>0</sup>C x 1 hora).
- Alcohol medicinal.
- Jeringas descartables (1 ml, 10ml).
- Agujas N° 26 x 1”.
- Guantes quirúrgicos. N° 7 ½.
- Espátula mediana.
- Marcador de vidrio.
- Papel filtro.
- Botellas descartables.
- Cernidor.
- Cacerolas medianas.
- Mascarillas descartables.
- Cánula intragástrica
- Placas petri.
- Vaso de precipitado (25ml, 50 ml, 100 ml)
- Piscetas.
- Hilos de sutura (seda negra 0/3).
- Equipo de disección.
- Papel toalla.
- Bandejas plásticas con tapa de malla metálica.
- Viruta.

### **3.5. Equipos**

- Liofilizador: Freezer Dry sistem/ Freezone 4,5 L LABCONCO.
- Congeladora.
- Refrigeradora.

- Cocina eléctrica.
- Balanza analítica. Mettler Toledo AG 204.
- Balanza digital.
- Cámara fotográfica (Digital).

### **3.6. Drogas e insumos químicos.**

- Indometacina Q.P, suministrada por el Laboratorio MERCK.
- Ketamina 50mg/10ml.
- Cloruro de sodio 0.9%
- Picrato de sodio.
- Bencilpenicilina sódica 1'000. 000UI.
- Agua destilada
- Alcohol medicinal.

#### 4. PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCION DE DATOS

##### 4.1. Recolección de muestras vegetales.

Fueron recolectadas del Fundo Zungarococha en la carretera de Puerto Almendras, que esta ubicado al margen derecho de la Facultad de Agronomía que se encuentra en el distrito de San Juan Bautista, Iquitos – Perú.

En la recolección de las muestras vegetales se considero lo siguiente:

- Edad de la planta.
- Estado vegetativo.
- Temporada de recolección.

Para la identificación de los tres ecotipos de *Bixa orellana* L. “Achiote” se tuvo como patrones de diferenciación a cada planta en estudio.

##### 4.2. Identificación de las muestras vegetales

La identificación taxonómica de los tres ecotipos de *Bixa orellana* L. “Achiote” se realizo en el Herbarium Amazonense - AMAZ de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (ANEXO N° 06)

### **4.3. Obtención de los extractos acuosos liofilizados.**

- Selección de materia prima: fueron seleccionadas las partes vegetales (hojas) en buen estado de conservación.
- Lavado de la materia prima: las partes vegetales se sometieron a la acción continua de un chorro de agua para despojarlos de contaminantes.
- Secado de la materia prima. Las muestras seleccionadas fueron sometidas a secado a temperatura de 42 °C durante 48 horas.
- Obtención del extracto acuoso: se sometió a cocción en agua la parte vegetal en la proporción 1:10 (P/V) a temperatura entre 60° a 70°C, durante 2 horas, luego de su enfriamiento fue filtrado en algodón para posteriormente filtrar en papel filtro y finalmente concentrado.
- Congelación del extracto acuoso: el extracto acuoso fue congelado (- 22°C), por más de 24 horas.
- Liofilización del extracto acuoso: consistió en deshidratar el extracto acuoso congelado a bajas temperaturas y presión (- 40°C y 1.33 x 10<sup>-3</sup> MBARR) mediante sublimación.
- Pesado, envasado y rotulado del extracto liofilizado: se llevo a cabo en una cámara de flujo laminar.
- Almacenado: en ambiente seco a temperaturas menores de 25°C, en frascos con cierre hermético y alejado de la luz.

#### 4.4. Preparación de las soluciones de los extractos liofilizados.

En la preparación de los liofilizados se empleo como solvente solución salina al 0.9%. Se determino el factor de volumen y la concentración según las dosis a ensayar, haciendo uso de la tabla de dosificación (ver el anexo 05). Luego se determino el peso corporal promedio de los modelos biológicos según los grupos experimentales y se procedió al cálculo para cada dosis haciendo uso de las siguientes formulas:

❖ **Volumen requerido del solvente (solución salina 0.9%)**

$$VS (ml) = PP \text{ rata } (gr) \times FV \times NI$$

VS: volumen del solvente.

PP rata: peso promedio de las ratas.

FV: factor de volumen.

NI: número de individuos.

❖ **Cantidad requerida del extracto liofilizado:**

$$ExL (gr) = \frac{[gr] \times VS (ml)}{100ml}$$

ExL: extracto liofilizado. VS: factor del solvente. [ gr ] : peso del liofilizado

❖ **Volumen de la solución preparada del extracto liofilizado a administrar:**

$$VI (ml) = P \text{ rata } (gr) \times FV$$

VI: volumen de administración.

P rata: peso de la rata.

FV: factor de volumen

#### **4.5. Etapa de cuarentena y procedimiento de identificación de los modelos biológicos (ratas).**

##### **4.5.1. Etapa de cuarentena:**

Las ratas fueron sometidas por 7 días, con la finalidad de que las ratas se adapten al entorno del ambiente y bajo observación permanente. Las ratas que presentaron alguna alteración funcional fueron separadas de los grupos experimentales.

##### **4.5.2. Sistema de identificación (Marcaje / pesaje):**

Las ratas fueron marcadas con picrato de sodio, sobre determinadas aéreas del cuerpo, posteriormente se procedió al pesado de las ratas por medio de la balanza simple, dicha marca y peso serán anotados en fichas de recolección de datos (ver anexo 03).

#### **4.6. Recolección de datos para la evaluación antiinflamatoria.**

Se considero la observación directa y los pesos de cada animal al principio y término de la evaluación, registrándose los pesos de los pellets de algodón en peso húmedo y peso seco que dio por finalizada la evaluación, en las fichas de recolección de resultados del efecto inflamatorio de cada animal, teniendo en cuenta el método, sustancia y el nivel de dosis ensayada (ver anexo 04).

#### **4.7. Método de granuloma inducido por pellets de algodón (método crónico)**

##### **4.7.1. Técnica operatoria**

Para esta evaluación se utilizaron ratas albinas, machos, distribuidas aleatoriamente en grupos de 6 animales por grupo experimental. Después de un ayuno de 12 horas, se procedió a la primera administración por vía oral de los extractos liofilizados acuosos de las hojas de los tres ecotipos E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub> de *Bixa*



*orellana* L. “Achiote” en dosis de 100 y 200 (mgKg<sup>-1</sup>)/p.c, Indometacina (2.5 mgKg<sup>-1</sup>) y solución salina al 0.9%.

Después de los 30 minutos de administración, estos fueron sometidos a anestesia por inyección intraperitoneal de ketamina 500mg/10ml a una dosis de 82.5mg/kg/p.c., Luego se procedió a la decolación dorsal de la piel y se le practico una incisión dorsal para implantar 2 pellets de algodón embebidos en solución de Bencilpenicilina sodica (1'000.000UI) en cada animal, equidistantes y separados uno del otro, para posteriormente ser evaluados durante los 5 días de administración del extracto y del control. Al 6<sup>to</sup> día se sacrificaron los animales por dislocación cervical teniendo en consideraciones los aspectos éticos de la experimentación animal. Se procedió a la excéresis de los granulomas para ser pesados y secados. Se determino el contenido acuoso y fibrogranuloso, este último de interés para el promedio de inflamación de los diferentes grupos de ensayo y su posterior interpretación del porcentaje de inhibición de la inflamación respectiva.<sup>16</sup>

El % efecto antiinflamatorio se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ EA} = \frac{\text{PICN} - \text{PISE}}{\text{PICN}} \times 100$$

% EA: Efecto antiinflamatorio.

PICN: Promedio de inflamación del grupo control negativo (solución salina 0.9%).

PISE: Promedio de inflamación del grupo de las sustancia en estudio (ecotipos a dosis de 100 y 200 mg/kg de p.c).

## **5. ANALISIS E INTERPRETACION DE DATOS**

Los resultados del ensayo fueron expresados de acuerdo a la diferencia de los pesos de los pellets de algodón para determinar los promedios del contenido fibrogranuloso, extraídos de los diferentes grupos tratados y el promedio de peso del grupo control negativo. Se calculo los resultados obtenidos mediante la media y t-students como medida de significancia estadística, que fueron presentados mediante tablas y gráficos de barras. Los datos se procesaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para hacer comparaciones múltiples de las medias obtenidas de la experimentación con la test.

## **6. PROTECCION DE LOS DERECHOS DE LOS ANIMALES EN EXPERIMENTACION.**

Durante la evaluación se tuvo en cuenta los principios básicos y éticos en la experimentación animal, que permitió disminuir al máximo el sufrimiento de los mismos.

Las consideraciones éticas que se tuvo en cuenta fueron:

- Se evito el daño físico innecesario durante el proceso metodológico.
- Se utilizaron grupos de animales en cantidades necesarias para demostrar y realizar la hipótesis de la evaluación.

Asimismo, se tuvo en cuenta los principios básicos sobre animales de experimentación estipulados por la Legislación de los Estudios Unidos y por el Comité Nacional de España perteneciente al International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS); algunos de estos principios son mencionados a continuación:

- Los estudios que requieran la utilización de animales vivos deben llevarse a cabo con la supervisión de profesionales o especialistas calificados en experimentación biológica.
- Los animales en experimentación deben ser tratados de manera adecuada, alimentándolos convenientemente, y manteniéndolos bajo las oportunas medidas de higiene, antes, durante y después de la intervención.
- Todos los experimentos que puedan causar daño o sufrimiento de los animales, deben llevarse a cabo bajo la aplicación de anestesia con el fin de evitar el dolor innecesario al animal; únicamente podrán llevarse a cabo sobre el animal despierto en aquellos casos en que se certifique que la anestesia interfiere o invalida el proceso experimental, debiendo en ese caso estar dicho experimento convenientemente aprobado y supervisado por el jefe de equipo de investigación.
- Si una vez terminado el proceso de experimentación agudo no se precisa la supervivencia del animal, este debe ser sacrificado por procedimientos que causen o aseguren un mínimo sufrimiento, debiéndose constatar la muerte del animal antes de deshacerse del mismo.

# Capitulo IV

## 1. RESULTADOS

En las tablas N° 01 y 02, se muestran los resultados los pesos de los pellets después de seis días de evaluación de los animales en tratamiento con el ecotipo E<sub>1</sub> a dosis de 100 y 200mg/kg/pc.

**Tabla N° 01. Promedio del contenido fibrogranuloso de la evaluación del ecotipo E<sub>1</sub> de *Bixa orellana* L. "Achiote" a dosis de 100mg/kg en ratas albinas.**

Ecotipo E <sub>1</sub>		Dosis: 100 mg/kg					
Marca de identificación	Peso de pellets (mg)	Peso húmedo (mg)	Peso seco (mg)	Contenido acuoso (mg)	Contenido fibrogranuloso (mg)	Promedio del contenido fibrogranuloso (mg)	
<b>F</b>	Izq.	5	54.5	11.6	42.9	6.6	7
	Der.	5	46.9	12.4	34.5	7.4	
<b>L</b>	Izq.	5	45.2	11.5	33.7	6.5	7.05
	Der.	5	46	11.6	34.4	6.6	
<b>C</b>	Izq.	5	53.4	12.4	41	7.4	8.2
	Der.	5	58.5	14	44.5	9	
<b>PDD</b>	Izq.	5	41.5	9.8	31.7	4.8	4.65
	Der.	5	38.3	9.5	28.8	4.5	
<b>PDI</b>	Izq.	5	51.5	12	39.5	7	8.25
	Der.	5	60.3	14.5	45.8	9.5	
<b>B</b>	Izq.	5	47.6	11.9	35.7	6.9	7.6
	Der.	5	50.2	13.3	36.9	8.3	
<b>Promedio del total del contenido fibrogranuloso</b>						<b>7.125</b>	

**Tabla N° 02. Promedio del contenido fibrogranuloso de la evaluación del ecotipo E<sub>1</sub> de *Bixa orellana* L. "Achiote" a dosis de 200mg/kg en ratas albinas.**

Ecotipo E <sub>1</sub>		Dosis: 200 mg/kg					
Marca de identificación	Peso de pellets (mg)	Peso húmedo (mg)	Peso seco (mg)	Contenido acuoso (mg)	Contenido fibrogranulos o (mg)	Promedio del contenido fibrogranuloso (mg)	
<b>F</b>	Izq.	5	54.8	14.9	39.9	9.9	9.05
	Der.	5	58.5	13.2	45.3	8.2	
<b>L</b>	Izq.	5	44.9	11.9	33	6.9	7.25
	Der.	5	47.6	12.6	35	7.6	
<b>C</b>	Izq.	5	66.4	17.4	49	12.4	11.7
	Der.	5	57.5	16	41.5	11	
<b>PDD</b>	Izq.	5	50.4	12.7	37.7	7.7	8
	Der.	5	52.	13.3	38.7	8.3	
<b>PDI</b>	Izq.	5	52.3	14	38.3	9	10
	Der.	5	62.7	16	46.7	11	
<b>B</b>	Izq.	5	50.8	12.3	38.5	7.3	8.25
	Der.	5	59.2	14.2	45	9.2	
<b>Promedio del total del contenido fibrogranuloso</b>						<b>9.042</b>	

En las tablas N° 03 y 04, se muestran los resultados los pesos de los pellets después de seis días de evaluación de los animales en tratamiento con el ecotipo E<sub>2</sub> a dosis de 100 y 200mg/kg/pc.

**Tabla N° 03. Promedio del contenido fibrogranuloso de la evaluación del ecotipo E<sub>2</sub> de *Bixa orellana* L. "Achiote" a dosis de 100mg/kg en ratas albinas.**

Ecotipo E <sub>2</sub>		Dosis: 100 mg/kg					
Marca de identificación		Peso de pellets (mg)	Peso húmedo (mg)	Peso seco (mg)	Contenido acuoso (mg)	Contenido fibrogranuloso (mg)	Promedio del contenido fibrogranuloso (mg)
<b>F</b>	Izq.	5	56.9	14.2	42.7	9.2	9.8
	Der.	5	64.6	15.4	49.2	10.4	
<b>L</b>	Izq.	5	55.6	13.2	42.4	8.2	8.55
	Der.	5	62.2	13.9	48.3	8.9	
<b>C</b>	Izq.	5	61.6	15.4	46.2	10.4	10.25
	Der.	5	59.6	15.1	44.5	10.1	
<b>PDD</b>	Izq.	5	48.4	13.1	35.3	8.1	7.5
	Der.	5	43.8	11.9	31.9	6.9	
<b>PDI</b>	Izq.	5	55.1	14.1	41	9.1	9.65
	Der.	5	62.4	15.2	47.2	10.2	
<b>B</b>	Izq.	5	53.4	13.6	39.8	8.6	8.7
	Der.	5	57.6	13.8	43.8	8.8	
<b>Promedio del total del contenido fibrogranuloso</b>							<b>9.075</b>

**Tabla N° 04. Promedio del contenido fibrogranuloso de la evaluación del ecotipo E<sub>2</sub> de *Bixa orellana* L. "Achiote" a dosis de 200mg/kg en ratas albinas.**

Ecotipo E <sub>2</sub>		Dosis: 200 mg/kg				
Marca de identificación	Peso de pellets (mg)	Peso húmedo (mg)	Peso seco (mg)	Contenido acuoso (mg)	Contenido fibrogranuloso (mg)	Promedio del contenido fibrogranuloso (mg)
<b>F</b>	Izq.	5	49	12.7	36.3	7.7
	Der.	5	40.6	12.4	28.2	7.4
<b>L</b>	Izq.	5	64.5	18.1	46.4	13.1
	Der.	5	72.3	18.7	53.6	13.7
<b>C</b>	Izq.	5	75.8	19.4	56.4	14.4
	Der.	5	63.7	16.5	47.2	11.5
<b>PDD</b>	Izq.	5	61.9	14	47.9	9
	Der.	5	63.2	14.4	48.8	9.4
<b>PDI</b>	Izq.	5	49	12.7	36.3	7.7
	Der.	5	40.6	12.4	28.2	7.4
<b>B</b>	Izq.	5	40.7	11.6	29.1	6.6
	Der.	5	56.7	16	40.7	11
<b>Promedio del total del contenido fibrogranuloso</b>						<b>9.90</b>



En las tablas N° 05 y 06, se muestran los resultados los pesos de los pellets después de seis días de evaluación de los animales en tratamiento con el ecotipo E<sub>3</sub> a dosis de 100 y 200mg/kg/pc.

**Tabla N° 05. Promedio del contenido fibrogranuloso de la evaluación del ecotipo E<sub>3</sub> de *Bixa orellana* L. "Achiote" a dosis de 100mg/kg en ratas albinas.**

Ecotipo E <sub>3</sub>		Dosis: 100 mg/kg					
Marca de identificación	Peso de pellets (mg)	Peso húmedo (mg)	Peso seco (mg)	Contenido acuoso (mg)	Contenido fibrogranuloso (mg)	Promedio del contenido fibrogranuloso (mg)	
<b>F</b>	Izq.	5	48.2	10.6	37.6	5.6	7.1
	Der.	5	58.4	13.6	44.8	8.6	
<b>L</b>	Izq.	5	56	12.9	43.1	7.9	9.5
	Der.	5	59.2	16.1	43.1	11.1	
<b>C</b>	Izq.	5	57.1	11.2	45.9	6.2	8.2
	Der.	5	67.1	15.2	51.9	10.2	
<b>PDD</b>	Izq.	5	57.2	13.2	44	8.2	8
	Der.	5	51.5	12.8	38.7	7.8	
<b>PDI</b>	Izq.	5	54.2	13.5	40.7	8.5	8.75
	Der.	5	65.3	14	51.3	9	
<b>B</b>	Izq.	5	48.1	12.6	35.5	7.6	8.05
	Der.	5	54.5	13.5	41	8.5	
<b>Promedio del total del contenido fibrogranuloso</b>						<b>8.27</b>	

**Tabla N° 06. Promedio del contenido fibrogranuloso de la evaluación del ecotipo E<sub>3</sub> de *Bixa orellana* L. "Achiote" a dosis de 200mg/kg en ratas albinas.**

<b>Ecotipo E<sub>3</sub></b>		<b>Dosis: 200 mg/kg</b>					
<b>Marca de identificación</b>	<b>Peso de pellets (mg)</b>	<b>Peso húmedo (mg)</b>	<b>Peso seco (mg)</b>	<b>Contenido acuoso (mg)</b>	<b>Contenido fibrogranuloso (mg)</b>	<b>Promedio del contenido fibrogranuloso (mg)</b>	
<b>F</b>	Izq.	5	70.2	15.1	55.1	10.1	10.35
	Der.	5	68.2	15.6	52.6	10.6	
<b>L</b>	Izq.	5	48.6	12.8	35.8	7.8	9.3
	Der.	5	67.6	15.8	51.8	10.8	
<b>C</b>	Izq.	5	69.4	15	54.4	10	10.45
	Der.	5	73.7	15.9	57.8	10.9	
<b>PDD</b>	Izq.	5	48.7	12.2	36.5	7.2	9.1
	Der.	5	66.3	16	50.3	11	
<b>PDI</b>	Izq.	5	55.2	12.6	42.6	7.6	7.55
	Der.	5	55.6	12.5	43.1	7.5	
<b>B</b>	Izq.	5	46.8	12.7	34.1	7.7	10.5
	Der.	5	70	18.3	51.7	13.3	
<b>Promedio del total del contenido fibrogranuloso</b>						<b>9.5</b>	

En la tabla N° 07, se muestran los resultados los pesos de los pellets después de seis días de evaluación de los animales en tratamiento con indometacina a dosis de 2.5mg/kg.

**Tabla N° 07. Promedio del contenido fibrogranuloso de la evaluación de la Indometacina a dosis de 2.5 mg/kg en ratas albinas.**

<b>Indometacina USP</b>		<b>Dosis: 2.5 mg/kg</b>				
<b>Marca de identificación</b>	<b>Peso de pellets (mg)</b>	<b>Peso húmedo (mg)</b>	<b>Peso seco (mg)</b>	<b>Contenido acuoso (mg)</b>	<b>Contenido fibrogranuloso (mg)</b>	<b>Promedio del contenido fibrogranuloso (mg)</b>
<b>F</b>	Izq.	5	40.5	10.3	30.2	5.3
	Der.	5	44	10.7	33.3	5.7
<b>L</b>	Izq.	5	46.9	9.8	37.1	4.8
	Der.	5	43.6	11	32.6	6
<b>C</b>	Izq.	5	52.6	10.8	41.8	5.8
	Der.	5	41.8	10.1	31.7	5.1
<b>PDD</b>	Izq.	5	51.3	11.3	40	6.3
	Der.	5	42.5	10.2	32.3	5.2
<b>PDI</b>	Izq.	5	49.7	11.1	38.6	6.1
	Der.	5	48.3	10.3	38	5.3
<b>B</b>	Izq.	5	46.8	10.1	36.7	5.1
	Der.	5	45.2	9.8	35.4	4.8
<b>Promedio del total del contenido fibrogranuloso</b>						<b>5.46</b>

En la tabla N° 08, se muestran los resultados los pesos de los pellets después de seis días de evaluación de los animales en tratamiento con solución salina al 0.9%.

**Tabla N° 08. Promedio del contenido fibrogranuloso de la evaluación de la solución salina al 0.9% en ratas albinas.**

**Solución salina 0.9 %**

Marca de identificación	Peso de pellets (mg)	Peso húmedo (mg)	Peso seco (mg)	Contenido acuoso (mg)	Contenido fibrogranuloso (mg)	Promedio del contenido fibrogranuloso (mg)
<b>F</b>	Izq.	5	37.9	15.1	22.7	8.5
	Der.	5	38.1	11.9	26.2	
<b>L</b>	Izq.	5	47.4	12.8	34.6	8.35
	Der.	5	51.4	13.9	37.5	
<b>C</b>	Izq.	5	48.1	16.9	31.2	14.35
	Der.	5	68.7	21.8	46.9	
<b>PDD</b>	Izq.	5	40.2	11.9	28.3	8.9
	Der.	5	45.2	15.9	29.3	
<b>PDI</b>	Izq.	5	66.3	17.5	48.8	14.65
	Der.	5	85.2	21.8	63.4	
<b>B</b>	Izq.	5	57.5	13.7	43.8	8.65
	Der.	5	55.2	13.6	41.6	
<b>Promedio del total del contenido fibrogranuloso</b>						<b>10.56</b>

En la tabla N° 9 se muestran el promedio de efecto inflamatorio y porcentajes del efecto antiinflamatorio de cada uno de los extractos acuosos liofilizados a las dosis ensayadas, además de los controles positivo y negativo.

**Tabla N° 09. Porcentaje de inhibición de la inflamación en los diferentes ecotipos de *Bixa orellana* L. "Achiote" por el modelo de granuloma inducido por pellets de algodón.**

<b>Grupo y/o controles</b>	<b>Dosis</b>	<b>Promedio del efecto inflamatorio</b>	<b>Porcentaje del efecto antiinflamatorio</b>
<b>Ecotipo E<sub>1</sub></b>	100 mg/kg	7.125	32.53
	200 mg/kg	9.042	14.37
<b>Ecotipo E<sub>2</sub></b>	100 mg/kg	9.075	14.06
	200 mg/kg	9.90	6.25
<b>Ecotipo E<sub>3</sub></b>	100 mg/kg	8.27	21.68
	200 mg/kg	9.5	10.04
<b>Solución salina 0.9 %</b>		10.56	
<b>Indometacina USP</b>	2.5 mg/kg	5.46	48.29

En la tabla N° 10 se muestran los promedios del contenido acuoso y fibrogranuloso obtenidos en cada uno de los grupos evaluados, en la misma se puede apreciar que los ecotipos E<sub>1</sub> y E<sub>3</sub>, a dosis de 100 mg/kg/pc presentan una disminución significativa de la inflamación con respecto a la Indometacina USP a dosis de 2.5mg/kg/pc. ( $p \leq 0.05$ ), de igual manera los mismos ecotipos a dosis de 200mg/kg/pc. No presentan disminución significativa de la inflamación mediante el método ensayado.

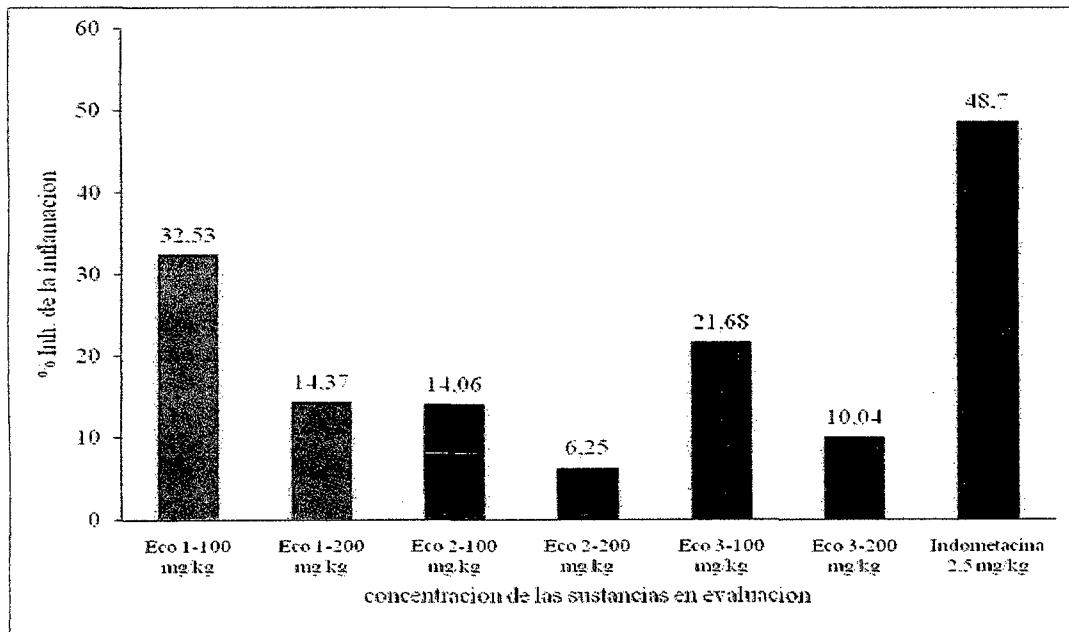
**Tabla N° 10. Promedio del contenido acuoso y fibrogranuloso de los diferentes ecotipos de *Bixa Orellana* L. "Achiote" mediante el modelo de granuloma inducido por algodón**

GRUPO	DOSIS	PROMEDIO DEL CONTENIDO ACUOSO	PROMEDIO DEL CONTENIDO FIBROGRANULOSO
Indometacina USP	2.5 mg/kg	35.64	5.46 *
Ecotipo E <sub>1</sub>	100 mg/kg	37.45	7.04 *
	200 mg/kg	40.12	9.04
Ecotipo E <sub>2</sub>	100 mg/kg	42.69	9.08
	200 mg/kg	41.59	9.91
Ecotipo E <sub>3</sub>	100 mg/kg	43.13	8.27 *
	200 mg/kg	47.15	9.50

\*  $p \leq 0.05$  VS Control negativo

En el grafico N° 01, se muestra el porcentaje de inhibición de la inflamación de los diferentes ecotipos de *Bixa orellana* L "Achiote" y el control positivo, en el mismo se puede observar que los ecotipos E<sub>1</sub> y E<sub>3</sub> a dosis de 100mg/kg presentan un porcentaje considerable de efecto antiinflamatorio, la presencia de metabolitos con propiedades antiinflamatorias en los extractos acuosos liofilizados que les confieren la propiedad de inhibir la inflamación mediante el método de granuloma inducido por pellets de algodón, así mismo se demuestra que los mismos ecotipos a dosis de 200mg/kg, no representan un porcentaje considerable de inhibición de la inflamación con respecto a la Indometacina, también se puede decir que el ecotipo E<sub>2</sub> no presenta un porcentaje significativo de inflamación en relación con los demás extractos y el control positivo mediante el método ensayado.

**GRAFICO N° 01. Porcentaje de inhibición de la inflamación de los diferentes ecotipos de *Bixa orellana* L. "Achiote" mediante el modelo de granuloma inducido por pellets de algodón.**



## 2. DISCUSION

Existen diferentes métodos para evaluar la actividad antiinflamatoria, siendo el más apropiado el método del granuloma inducido por pellets de algodón.

El mecanismo generador de la inflamación es una reacción de hipersensibilidad retardada, donde participan mediadores químicos que dan lugar a la infiltración de neutrófilos, macrófagos y linfocitos, los cuales rodean la zona donde se encuentra el cuerpo extraño, de esta forma, este modelo caracteriza típicamente la fase proliferativa del proceso inflamatorio.<sup>55</sup>

**SWINGLE K. y SHIDEMAN F.;** describieron el método de granuloma inducido por pellets de algodón en tres fases de respuesta frente al cuerpo extraño; una primera fase transudativa, que ocurre a las primeras tres horas; la segunda exudativa, definido como el goteo de azul de Evans del torrente sanguíneo alrededor del granuloma que ocurre entre 3 y 72 horas después de la implantación y una tercera fase proliferativa, que ocurre entre tres y seis días después de la implantación. La potencia del efecto antiinflamatorio de los extractos de *Bixa orellana* "Achiote", se evalúa en la fase exudativa y proliferativa comparada con la Indometacina la cual es utilizada como control eficaz en la evaluación inflamatoria.<sup>56</sup>

Las ventajas de muchas plantas medicinales se fundamentan en función a su fácil absorción por su semejanza biológica en el ADN en cada una de ellas; además por lo que poseen función y ciclo metabólico similar al de los humanos, el alto contenido en vitaminas, minerales, enzimas, aceites esenciales, etc; hacen que sean menos tóxicas que los fármacos químicos y los resultados se han observado en miles de casos con rigor científico.<sup>57</sup>



La presencia de flavonoides descritas por Harbone (1975), Terashima et, al (1991), Garro et, al (1993), coinciden con lo encontrado mediante tamizaje fitoquímico. La actividad antiinflamatoria de estos flavonoides contenidos en las hojas de *Bixa Orellana* L. "Achiote" pueden deberse a la propiedad venoactiva (efecto antiedematoso), es decir son capaces de disminuir la permeabilidad de los capilares sanguíneos y aumentar su resistencia, inhibiéndose de esta manera la migración leucocitaria (polimorfonucleares) hacia el foco inflamatorio. Asimismo, los flavonoides influyen en el metabolismo del ácido araquidónico, debido a que inhiben la fosfolipasa A<sub>2</sub>, la 5-lipooxigenasa, o la endoperoxido prostaglandina sintetasa, que influyen en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, las cuales juegan un papel importante en la génesis del dolor y la inflamación, lo que ha sido demostrado en otros trabajos experimentales. Los flavonoides naturales además de ser inhibidores de la ciclooxigenasa (COX), actúan como antioxidantes contra [O<sub>2</sub>] y especies radicalarias sin consumirse durante el proceso permitiendo su reutilización en consecutivas interacciones con O<sub>2</sub> lo que sumado a la inhibición de la COX contribuirían a mejorar la capacidad antiinflamatoria.<sup>60,61</sup>

En la evaluación de los tres ecotipos de *Bixa orellana* L. "Achiote", se pudo comprobar que todos extractos acuosos liofilizados poseen efecto antiinflamatorio con las diferentes dosis ensayadas, sin embargo los mismos tienen mayor efecto a dosis de 100mg/kg que a dosis de 200mg/kg.

El procedimiento experimental de la nuestra evaluación se realizó de acuerdo a ciertas condiciones experimentales preestablecidas, con esto los resultados encontrados nos conducen a establecer que los extractos acuosos liofilizados de los ecotipos E<sub>1</sub> y E<sub>3</sub> de las hojas de *Bixa orellana* L. "Achiote", a dosis de 100mg/kg/p.c. tienen efecto antiinflamatorio significativo sobre el estímulo lesivo ocasionado por la implantación de los pellets de algodón, no obstante los mismos extractos liofilizados a dosis de 200mg/kg/p.c., no presentaron efecto antiinflamatorio considerable mediante el mismo método, esta diferencia de efecto entre ambas dosis se explicaría

mediante la teoría planteada por Clark en la que supone que el efecto máximo de una sustancia se obtiene con la ocupación de todos los receptores, y que cuando estos han sido ocupados en su totalidad la respuesta biológica seguirá siendo la misma, incluso esta puede ser disminuida por la saturación de los receptores aunque se eleve la concentración del agonista o la sustancia en estudio.<sup>58</sup>

La diferencia de los efectos antiinflamatorios encontrada en la evaluación de los tres ecotipos de *Bixa orellana* L. "Achiote", puede estar relacionada a la composición de cada uno de estos; pues en el ecotipo E<sub>1</sub> se encontró mayor presencia de metabolitos secundarios (flavonoides, fenoles, taninos, azúcares reductores triterpenos y esteroides) en comparación con los ecotipos E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub> al realizar una serie de ensayos en el tamizaje fitoquímico. Con estos indicios se puede establecer que el efecto antiinflamatorio de cada uno de los ecotipos puede estar influido directamente por la presencia de los flavonoides y otros metabolitos como son los triterpenos y esteroides que de alguna manera van a contribuir en dicho efecto.

Las diferencias en los resultados de la presente evaluación también puede estar relacionada a otros factores propios de la planta como también los factores que afectan al modelo animal entre los que están la dosis, la forma de preparación de los extractos, parte utilizada de la planta, estado vegetativo de las plantas, temporada de recolección y factores medioambientales (clima, suelo, etc) entre otros; los que en conjunto determinan la cantidad (concentración) y calidad (potencia) de los principios activos responsables del efecto biológico, así como también los factores propios que afectan al modelo animal.

Nuestros resultados se correlacionan con lo encontrado por SILVA y Col., en 1998 los cuales demostraron mediante la inducción de inflamación con formol al 10%, que el extracto liofilizado de *Bixa orellana* L. "Achiote", disminuye la inflamación en un 54% a una dosis de 100mg/kg vía intraperitoneal. La variabilidad de estos resultados con los nuestros estaría relacionada al método y al control positivo empleados en la

evaluación. Esto al igual que otros estudios donde se evaluó actividad antiinflamatoria del extracto de *Bixa orellana* L., "Achiote" en procesos inflamatorios de la próstata también a dosis de 100mg/kg, nos permiten establecer que los extractos liofilizados ensayados en nuestra evaluación tienen un efecto considerable sobre la inhibición de los procesos inflamatorios.<sup>10</sup>

Los resultados obtenidos con la Indometacina son congruentes con los que sustentan que los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son muy eficaces en este modelo. El efecto farmacológico de la Indometacina radica básicamente en su efectividad clínica de inhibición de la enzima ciclooxigenasa. Como consecuencia inhibe la formación de prostaglandinas (particularmente PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>) a partir del ácido araquidónico membranario de distintos tipos celulares.<sup>55</sup>

La Indometacina como otros AINES, inhibe la infiltración de granulocitos en el cuerpo extraño, previniendo la generación de fibras de colágeno y la presencia de mucopolisacáridos. Ha sido descrito también que estas drogas inhiben el incremento de la permeabilidad vascular inducida por la hialuronidasa, lo cual puede explicar la eficacia mostrada en este modelo, en el cual el incremento de la permeabilidad vascular es uno de los factores implicados en la formación del granuloma.<sup>55</sup>

### 3. CONCLUSIONES

- Los extractos acuosos liofilizados de los ecotipos E<sub>1</sub> y E<sub>3</sub> de *Bixa orellana* L. "Achiote", a dosis de 100mg/kg/p.c. tienen efecto antiinflamatorio (E<sub>1</sub>= 32.53% y E<sub>3</sub> = 21.68%) con respecto a la Indometacina USP ( $p \leq 0.05$ ), mediante el modelo de granuloma inducido por pellets de algodón en ratas albinas.
- Los extractos acuosos liofilizados de los tres ecotipos en estudio de *Bixa orellana* L. "Achiote", presentaron el siguiente porcentaje de efecto antiinflamatorio a dosis de 200 mg/kg (E<sub>1</sub>= 14.37%, E<sub>2</sub> = 6.25% y E<sub>3</sub> = 10.04%) con respecto a la Indometacina USP a dosis de 2.5 mg/kg mediante el mismo método.

#### **4. RECOMENDACIONES**

- Realizar trabajos de investigación mediante la aplicación de éste y otros métodos, que brinden una mayor información del efecto antiinflamatorio que puedan tener los diferentes ecotipos a las dosis ensayadas y a otras dosis.
- Realizar estudios fitoquímicos con el propósito de determinar los principios activos responsables del efecto antiinflamatorio y a su vez propiciar el cultivo de los ecotipos con propiedades terapéuticas.
- Realizar estudios de las diferentes partes (tallos, raíces y corteza) de los tres ecotipos en estudio con la aplicación del mismo método, lo cual permita obtener mayor información de la acción antiinflamatoria.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. García Martínez Y; Martínez Cruz V; Torres Díaz A. 2007. Inflamación aguda y patologías pulpares. Policlínica universitaria “Belkis Sotomayor Álvarez” Ciego de Ávila. [Artículo en internet]. [acceso el 20 de Diciembre del 2008]. Disponible en:  
[http://bvs.sld.cu/revistas/mciego/vol14\\_supl1\\_08/revisiones/r7v14\\_supl108.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/mciego/vol14_supl1_08/revisiones/r7v14_supl108.htm)
2. Lazo N.; Maco M; Matos Z ; Maguiña Y. 2007. Efecto protector del *Lactobacillus acidophilus* en gastritis erosiva inducida por Indometacina en ratones. CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana. Federación Latinoamericana de Sociedades Científicas de Estudiantes de Medicina. Vol. 12, número 002. Lima, Perú .pp. 76-79. [Artículo en internet]. [Acceso el 27 de Diciembre del 2008]. Disponible en:  
<http://www.redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/717/71712208.pdf>
3. Cruz B. B. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Caracterización de cinco extractos de plantas medicinales nativas de Guatemala, validadas científicamente. [Acceso el 26 de Diciembre del 2008]. Disponible en:  
<http://www.biblioteca.usac.edu.gt>
4. Gonzales Coral A. Colección y mantenimiento de germoplasma de Achiote (*Bixa orellana* L.) en la Amazonia Peruana. IIAP. Folia Amazónica VOL. N° 4(1). Av. Abelardo Quiñones Km. 2.5 Apartado 784. Iquitos – Perú. 1992. Pag: 49,61 y 62.
5. Cecilia Zotyen Quan. Nueva San Salvador, Agosto de 2002. Cultivo del Achiote, *Bixa orellana* L. pag.13. [Acceso el 05 de Enero del 2009]. Disponible en:  
<http://www.centa.gob.sv/documentos/agroindustria/Manual%20Tecnico%20del%20Achiote.pdf>

6. Domínguez S., X. A. Métodos de investigación fitoquímica. México. Editorial Limusa. 1979. 281 p.
7. Estrella, E. Plantas medicinales amazónicas: realidad y perspectivas. Tratado de cooperación amazónica. Secretaria Pro – Tempore. Lima – Perú. 1995. 302 p.
8. Dodson, C.H., Gentry A.H. y Valverde, F.M. Flora de Jauneche, Flóruilas de las zonas de vida de Ecuador I. Banco Central de Ecuador. 1985. 512 p.
9. Menéndez, R., Miranda, M., Morón, F., Núñez, A., Rodríguez, I y Soler. B *et al.* Plantas medicinales fitomédica. Ministerio de salud pública. Ciudad de la Habana, Cuba. II Editorial Ciencias Médicas. El Vedado. 1993. 117 p.
10. Silva, H. Garcia, A., Alvarado, R., Garcia, J, Pinedo, M. y Cerrutti, T.. Plantas Medicinales de la Amazonia Peruana. Instituto Peruano de Seguridad Social. Instituto de Medicina Tradicional. Iquitos – Peru. 1995. 255 p.
11. CYTED/CNPq. Métodos de la evaluación de la actividad farmacológica de plantas medicinales. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 2001. Pag. 60 – 71.
12. Vinay K, M; Abul K. A; Nelson F. Patología estructural y funcional. 7ª edición. Impreso en Madrid. Editorial SAUNDERS. 2005. Pag.47-86.
13. Sociedad Cubana de Farmacología. Memorias (Programa y Resúmenes). Taller nacional sobre inflamación. Escuela Latinoamericana de Medicina 28 al 30 de noviembre. 2001. Pag: 16, 18, 21, 22, 23, 30, 32, 33 y 69. [Sitio en internet]. Disponible en:  
<http://www.scf.sld.cu/pdf/taller-inflamacion/4taller04/4taller-programa-resumenes.pdf> -Consultado: 10 de abril del 2008.

14. Walker, K.; Fox, A.J. ; Urban, L. A. Animal models in pain research. *Mol. Med. Today*, 1999. 5 : 319-321.
15. Moore, W.W. La corteza suprarrenal. En Selkurt, E.E. *Fisiología*. 4<sup>ta</sup> ed. trad. Cast. Buenos Aires. El Ateneo. 1981. pp. 780.
16. Gonzales, A. Caracterización y evaluación de germoplasma de "Achiote" *Bixa orellana* L. procedente de la Amazonia Peruana. Centro Internacional de altos Estudios agronómicos mediterráneos. Instituto de agronómico mediterráneo de Zaragoza – España. 1996. 93 p.
17. Silva D. H, Ríos I. F. *Bixa orellana* L un antiinflamatorio milenario. IPSS – IMET. Iquitos – Perú. 1996. Pág. 10 y 48.
18. Baelmans R, Deharo E, Bourdy G, Muñoz V, Quenevo C, Sauvain M, et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part IV. Is a new haem polymerization inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products? *J Ethnopharmacol* 2000; 73(1-2): 271-5. [Acceso el 08 de Enero del 2009]. Disponible en:  
<http://www.productosbiokosma.com.ar/monografias/urucum.doc>
19. Gonzales Coral A. Colección y mantenimiento de germoplasma de Achiote (*Bixa orellana* L.) en la Amazonia Peruana. IIAP. *Folia Amazónica* Vol. N° 4(1). Av. Abelardo Quiñones Km. 2.5 Apartado 784. Iquitos – Perú. 1992. Pag: 49,61 y 62.
20. Gentry AH. 1993. *A field guide to the families and genera of woody plants of Northwest South America* (Colombia, Ecuador, Perú). Washington, DC.
21. Cáceres, A. *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 1995. pp, 55-6.



22. Gupta, M.P. Ed. 1995. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. CYTEC (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo), Santa fé de Bogotá, Colombia. p. 199, 230, 428.
23. Infojardín. Urucú. [Acceso el 09 de Enero del 2009]. Disponible en: <http://fichas.infojardin.com/plantas-medicinales-COPIASEGURIDAD/bixa-orellana.htm>
24. Duke. JA, Vasquez MR. Amazonian Ethnobotanical Dictionary. USA. 1994. p: 215.
25. Aparnathi, K.D., *Bixa orellana* L. Publicado en: Species Plantarum. Sistema nacional de información nacional. Comisión nacional forestal.1753. pag : 5/6. [Sitio en internet]. Disponible en: [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/13-bixac1m.PDF](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/13-bixac1m.PDF). Consultado: 10 de abril del 2008
26. Y. E Herbs Suppliers. Empresa de productos y terapias. Hierbas Medicinales. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.herbs-suppliers.com/Spanish/hierbas.htm>. Consultado: 23 de julio del 2008
27. Kosel, C., Orce, R. y Escobar, R. El auge Medicina Natural en República Dominicana. Santo Domingo, R.D. 2005 [Sitio en internet]. Disponible en: <http://html.rincondelvago.com/medicina-natural-en-la-republica-dominicana.html>. Consultado: 23 de julio del 2008.
28. Productos peruanos: plantas medicinales, vegetales y alimentos. Amazon nutrition. *Bixa orellana* L. ``Achiote``. Disponible en: <http://www.ptnsa.com/achiote.html>

29. Juárez S. Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana* L.). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. Tesis de Maestría 2005. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v68n4/a05v68n4.pdf>. Consultado: 23 de julio del 2008.
  
30. Resumen monográfico de la planta medicinal de Achiote. Laboratorio naturalista CODEPLAM S.R. LTDA “LINDA VIDA”. 2002 disponible en: [http://www.perudata.com/lindavida/achiote\\_estudios.htm](http://www.perudata.com/lindavida/achiote_estudios.htm)
  
31. Chen de C, J. Aislamiento, verificación e identificación del principio activo responsable de la actividad antifúngica de las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote”. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala, Julio – 1997. [Informe de tesis en Internet]. [Acceso el 11 de Enero del 2009]. Disponible en: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_1821.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_1821.pdf)
  
32. Lawrence BM, Hogg JW. Ishwarane in *Bixa orellana* leaf oil. *Phytochemistry* 1973; 12(12): 2995. Pag. 71.
  
33. Harborne, J.B. 1975. Flavonoid bisulfates and their cooccurrences with ellagic acid in the Bixaceae, Frankeniaceae and related families. *Phytochemistry* 14 (5-6): 1331-1337.
  
34. Pinto E. 1980. Recopilación de datos botánicos y análisis químico cualitativo de algunas especies de plantas consideradas medicinales en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), pag. 57.
  
35. Atal C. K. & Kapur B. M. 1982. Cultivation and utilization of medicinal plants. Jammu Tawi India Regional Research Laboratory (877p) pp. 456 – 45.

36. Terashima S; Shimizi M; Mories M; Morita N. 1991. Studies on aldolase reductase inhibitors from natural products IV constituents and aldolase reductase inhibitory effect of *chrysanthemum*, *Mori folium*, *Bixa orellana* and *dipomoea batatas*. Chem Pharm Bull 1991; 3912: 3346 – 3347.
37. Garro C. V; Raymundo N; Zavaleta A. & Aedo A. 1993. Investigación de flavonoides en *Bixa orellana*. Theorema Año 2 – N° 3 Julio.
38. Roersch C. Plantas medicinales en el sur andino del Perú. Vol. I. centro de medicina andina. Cusco Perú.1994.Pag: 98. pp: 302 – 5.
39. Silva H, Ríos F. Toxicidad aguda de 12 especies vegetales de la amazonia peruana con propiedades medicinales. IPSS – IMET. Iquitos – Perú; 1997.
40. Alonso J. R. 1998. Tratado de fitomedicina: Bases clínicas y farmacológicas. Isis Ed. Buenos Aires – Argentina
41. Silva H y col. *Bixa orellana* L. Monografía. IPSS – IMET. Iquitos - Perú. 1998. Pag: 98.
42. Otero R, Núñez V, Jiménez S. L. *et al.* Snakebites and ethnobotany in the northwest región of Colombia. Part II: neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. J Ethnopharmacology 2000; 71: 505-511.
43. Otero R, Núñez V, Jiménez S. L. *et al.* Mordeduras de serpientes y etnobotánica en la región noroeste de Colombia: Parte II: la neutralización de los efectos letales y enzimáticos del veneno de *Bothrops atrox*. J Ethnopharmacol. Agosto 2000; 71 (3) 505-11. Programa de Ofidismo, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín.

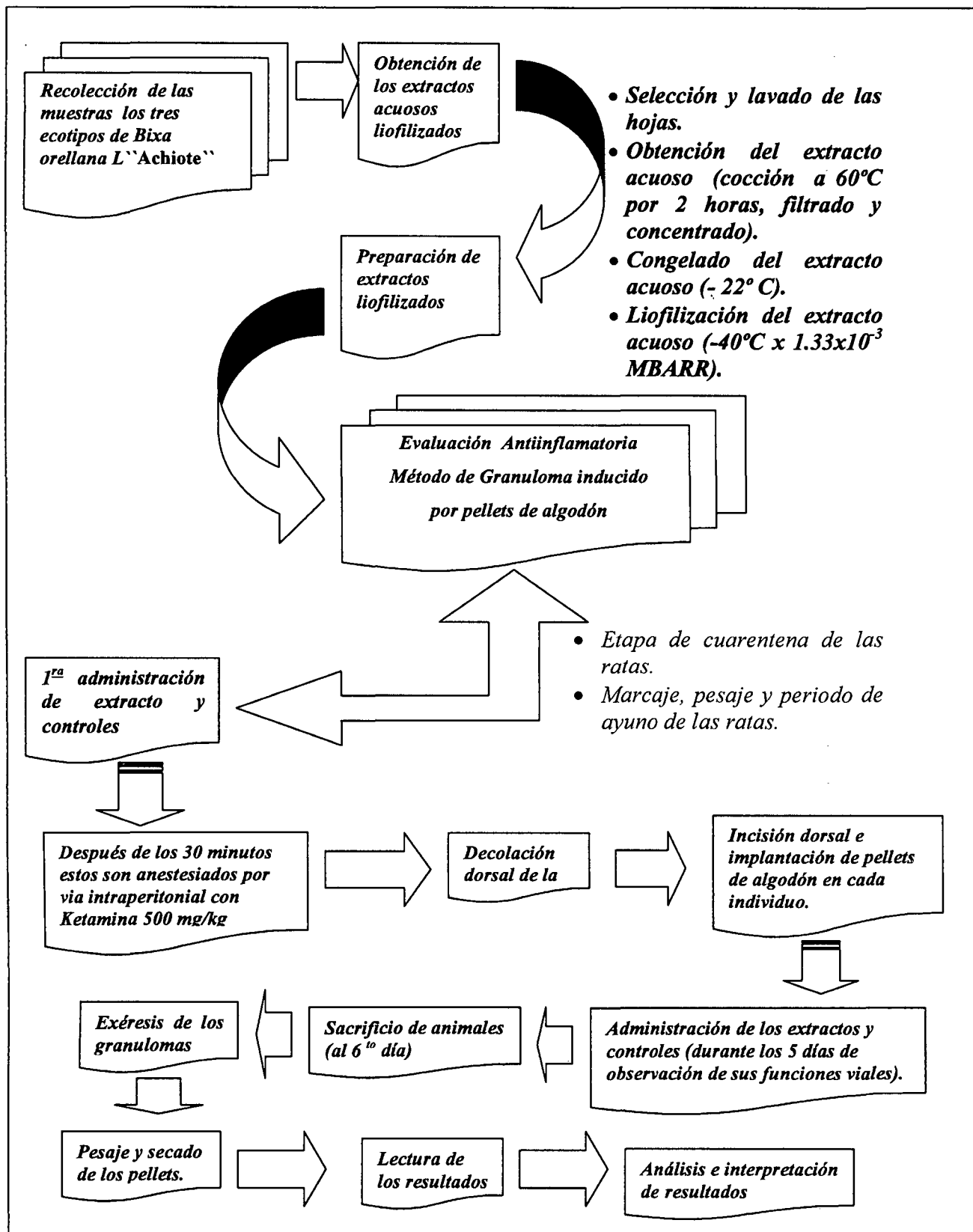
44. Martínez C. M. 2000. Investigación y manejo de la bacteriosis de la cebolla en Quíbor, Estado Lara. FONOIAP divulga N° 68:22:24. Investigadora. FONAIAP. Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Lara. El Cují, Estado Lara. 2 Disponible en:  
<http://ceniap.inia.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/FonaiapDivulga/fd68/texto/mmartinez.htm>.
45. Incháustegui G. R., Nina C. E., Cerruti S.T., Portocarrero N.P., Calloapaza V. C, Rios I. F., *et al.* Actividad antiinflamatoria y antimicrobiana. Es salud IMET. Iquitos – Perú. 2001. Pág.: 61,62 y 63.
46. Nonato R. L. 2003. Evaluación de la actividad antiinflamatoria intestinal crónica analgésica, transito intestinal y performance motora del extracto atomizado de las hojas de *Bixa orellana* L. ``Achiote``. Departamento de Farmacología del Instituto de medicina tradicional (IMET – ESSALUD).
47. Alvarado D, Beltran C, *et al.* Efecto antioxidante de los diferentes extractos de las hojas de *Bixa orellana* en hígados de ratones sometidos a estrés. Anuales de la Facultad de Medicina Vol. 65 Suplemento 2004. 62 III - Jornadas Científicas Sanfernandinas VI Jornadas de Investigación en Salud. Sección Farmacología- Departamento de Ciencias Dinámicas. Facultad de Medicina – UNMSM Disponible en:  
[http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/anales/v65\\_sup/Pdf/a06.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/anales/v65_sup/Pdf/a06.pdf)
48. Rojas R., Caviedes L., Gilman R.H. y Lock O. 2004. Departamento de Química, Pontificia Universidad el del de Católica, Lima, Perú, Department de Salud Internacional, la Johns Hopkins Escuela de Salud Pública, Baltimore, Maryland Disponible en:  
[http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol10\\_esp\\_05/pla03405.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol10_esp_05/pla03405.pdf)

49. Incio V. N., Álvarez F. P. Modelo Experimental en el Estudio de Posibles Principios Activos Antipaludicos. Rev. Peru Med Exp Salud Publica 23(3), 2006. Septiembre, año/ vol. 23, número 003. Instituto Nacional de Salud (Perú). pp. 173-176. Lima - Perú. [Acceso el 09 de Enero del 2009]. Disponible en: <http://www.redalyc.uaemex.mx>
50. Huamán O., Arnao I., Béjar E., Sandoval M. Efecto del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Bixa orellana* (achiote), en la secreción gástrica de ratas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú. 2007. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v68n4/a05v68n4.pdf>. Consultado: 23 de julio del 2008.
51. Shilpi J. A, Uddin S. J, Alam M. S, *et al.* Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.minproteccionsocial.gov.co/VBeContent/library/documents>. Consultado: 23 de julio del 2008.
52. Influencia de la asociación de extractos *Bixa Orellana* L y de la *Uncaria tomentosa* Wild DC sobre la Hiperplasia Benigna de Próstata. [Acceso el 05 de Enero del 2009]. Disponible en: [http://www.schuler.com.pe/schuler\\_aleman/Influenc.pdf](http://www.schuler.com.pe/schuler_aleman/Influenc.pdf).
53. IMET – Instituto de Medicina Tradicional. 2008. Ensayos de actividad antiinflamatoria.
54. Nonato R. L. 2003. Evaluación de la toxicidad del extracto acuoso liofilizado de *Bixa orellana* L. ``Achiote``. Departamento de Farmacología y toxicología del Instituto de Medicina Tradicional (IMET – ESSALUD).

55. Menéndez R., Carbajal D., Mas R., Perez Y., Molina V., Arruzabala M. & González M. [Acceso el 10 de Enero del 2008]. Disponible en:  
[http://www.latamjpharm.org/trabajos/25/2/LAJOP\\_25\\_2\\_1\\_8\\_599W506H1E.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/25/2/LAJOP_25_2_1_8_599W506H1E.pdf)
56. Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics, Vol. 183, Issue 1, 226-234, 1972 copyright-1972 by american society for pharmacology and experimental therapeutics, k. f. swingle<sup>1</sup> and f. e. shideman<sup>1</sup> las fases de la contestación inflamatoria a la implantación hipodérmica de una pelotilla de algodón y su modificación por ciertos agentes de antiinflammatory disponible en:  
<http://jpet.aspetjournals.org/cgi/content/abstract/183/1/226>
57. Dr. Biagio Tinghino. "Terapias naturales".2002. disponible en:  
<http://www.elsalvador.com/hablemos/ediciones/012702/actualidad.htm>
58. Velasco M. A. 1996. Farmacología. 16 a edición.
59. Aedici I. A.; Agrupación Estudiantil de Divulgación Científica. Flavonoides. Disponible en:  
<http://www.geocities.com/aedici/flavonoides.htm>
60. Duwiejva M. Zertlin J. L. 1993. Plants as a source of antiinflammatory substances. Department of Physiology and Pharmacology. University of stratchelyde. Glasgow. Cap11:151-163.
61. Hyon Pyo K., Kun Ho Son, Hyeun Wookch, Sam Sik K. 2004. Antiinflamatory plant flavonoids and celular action mechanisms. J. Pharmacol.. 5ª 96, 229-245.

# **ANEXOS**

ANEXO N°01. Flujograma del proceso de recolección y análisis de datos.





ANEXO N° 02. Tamizaje fitoquímico realizado en el laboratorio de Fitoquímica del IMET de los tres ecotipos de *Bixa orellana* L. "Achiote"

Metabolitos	Ensayos	Ecotipo 01			Ecotipo 02			Ecotipo 03		
		Éter	Alcohol	agua	Éter	Alcohol	agua	Éter	Alcohol	agua
Alcaloides	Dragendorff	++	-	++	++	+	++	++	+	++
Triterpenos y esteroides	Lieberman-burchard	+++	-	-	++	-	-	+++	-	-
Quinonas	Borntrager	-	0	-	0	+	-	0	0	-
Cumarinas	Baljet	0	+	-	+	0	-	0	-	-
Carotenos	Carr-price	+++	-	-	+++	-	-	++	-	-
Aceites esenciales- grasas	Sudan	++	-	-	+	-	-	++	-	-
Azúcares reductores	Fehling	-	++	++	-	++	+++	-	-	++
Saponinas	Espuma	-	0	0	-	0	+	-	0	+++
Fenoles y taninos	Cloruro ferrico	-	+++	0	-	++	0	-	+	0
Aminoácidos y aminas	Ninhidrina	-	-	0	-	0	-	-	0	-
Glicosidos cardiotonicos	Kedde	-	-	-	-	++	-	-	-	-
Flavonoides	Shinoda	-	+++	+++	-	+	++	-	+++	++
Mucilagos	Prueba del tacto	-	-	+++	-	-	+++	-	-	++
Principios Amargos-astringentes	Prueba del gusto	-	-	+	-	-	++	-	-	+
Glicosidos	Molish	-	-	++	-	-	++	-	-	+++
Glicosidos cianogenicos	Picrato de sodio	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* (+++) abundante; (++) moderado; (+) leve; (0) ausente; (-) no se realizo

**ANEXO N° 03. FICHAS DE RECOLECCION DE DATOS PARA LA  
EVALUACION DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO**

Modelo de estudio:.....

Modelo biológico:..... Sexo:.....

Sustancia:..... Hora de administración:.....

Dosis:.....

Fecha de inicio:..... al.....

Ficha de observación:

<b>Marca</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Vi</b>	<b>observaciones</b>
<b>F</b>			
<b>L</b>			
<b>C</b>			
<b>PDD</b>			
<b>PDI</b>			
<b>B</b>			

Vi: volumen de inculo.

**ANEXO N° 04. Ficha de recolección de los resultados del efecto inflamatorio**

Marca de identificación		Peso de pellets (mg)	Peso húmedo (mg)	Peso seco (mg)	Contenido acuoso (mg)	Contenido fibrogranuloso (mg)	Promedio del contenido fibrogranuloso (mg)
F	Izquierda						
	Derecha						
L	Izquierda						
	Derecha						
C	Izquierda						
	Derecha						
PDD	Izquierda						
	Derecha						
PDI	Izquierda						
	Derecha						
B	Izquierda						
	Derecha						
Promedio del total del contenido fibrogranuloso							

**ANEXO 05**  
**Tabla de Dosificación:**  
**FACTOR DE VOLUMEN (ml x 10<sup>-2</sup>) /gmc.**

C/F [%]	1.4	1.6	1.8	2.0	2.2	2.4	2.6	2.8	3.0	3.2	3.4	3.6	3.8	4.0	
0.05	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Altamente Tóxico
0.1	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	
0.2	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	Moderadamente Tóxico
0.3	42	48	54	60	66	72	78	84	90	96	102	108	114	120	
0.4	56	64	72	80	88	96	104	112	120	128	136	144	152	160	
0.5	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
1.0	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	340	360	380	400	Ligeramente Tóxico
1.5	210	240	270	300	330	360	390	420	450	480	510	540	570	600	
2.0	280	320	360	400	440	480	520	560	600	640	680	720	760	800	
2.5	350	400	450	500	550	600	650	700	750	800	850	900	950	1000	
3.0	420	480	540	600	660	720	780	840	900	960	1020	1080	1140	1200	
3.5	490	560	630	700	770	840	910	980	1050	1120	1190	1260	1330	1400	
4.0	560	640	720	800	880	960	1040	1120	1200	1280	1360	1440	1520	1600	Prácticamente No tóxico
5.0	700	800	900	1000	1100	1200	1300	1400	1500	1600	1700	1800	1900	2000	
10.0	1400	1600	1800	2000	2200	2400	2600	2800	3000	3200	3400	3600	3800	4000	
15.0	2100	2400	2700	3000	3300	3600	3900	4200	4500	4800	5100	5400	5700	6000	
20.0	2800	3200	3600	4000	4400	4800	5200	5600	6000	6400	6800	7200	7600	8000	
25.0	3500	4000	4500	5000	5500	6000	6500	7000	7500	8000	8500	9000	9500	10000	
30.0	4200	4800	5400	6000	6600	7200	7800	8400	9000	9600	10200	10800	11400	12000	Inocuo
35.0	4900	5600	6300	7000	7700	8400	9100	9800	10500	11200	11900	12600	13300	14000	
40.0	5600	6400	7200	8000	8800	9600	10400	11200	12000	12800	13600	14400	15200	16000	
45.0	6300	7200	8100	9000	9900	10800	11700	12600	13500	14400	15300	16200	17100	18000	
55.0	7700	8800	9900	11000	12100	13200	14300	15400	16500	17600	18700	19800	20900	22000	
65.0	9100	10400	11700	13000	14300	15600	16900	18200	19500	20800	22100	23400	24700	26000	
75.0	10500	12000	13500	15000	16500	18000	19500	21000	22500	24000	25500	27000	28500	30000	
85.0	11900	13600	15300	17000	18700	20400	22100	23800	25500	27200	28900	30600	32300	34000	



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

HERBARIUM AMAZONENSE (AMAZ)

Esquina Pevas/Nanay - Telefono 23 6121 - Apartado Postal 326

E-mail: [herbarium@amaz.com.pe](mailto:herbarium@amaz.com.pe)  
Iquitos-Perú

*Centro de Estudio, Investigación y Enseñanza*

**CONSTANCIA**

LA DIRECTORA DEL HERBARIUM AMAZONENSE DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA,

HACE CONSTAR:

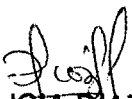
Que, las muestras colectadas por los Bachs. **Edilberto Cienfuegos Garcia** y **Liliana Cueva Piña**, pertenecen al Anteproyecto de Tesis Titulado "Evaluacion del efecto antiinflamatorio de extractos acuosos liofilizados de las hojas de tres ecotipos de *Bixa orellana* L. "achiote" en ratas albinas *Rattus norvegicus*; fue verificado e identificado en este Centro de Estudio, Investigación y Enseñanza como a continuación se indica:

<u>Familia</u>	<u>Nombre Científico</u>	<u>Nombre Vulgar</u>
BIXACEAE	<i>Bixa orellana</i> L.	"achiote"

Se expide la presente constancia, a solicitud de los interesados para los fines que estime conveniente.

Iquitos, 07 de Julio del 2008



  
Blga. FELICIA DÍAZ JARAMA  
Directora (e) AMAZ

**Figura N° 01. Ecotipo 1 - *Bixa orellana* L. “Achiote”**

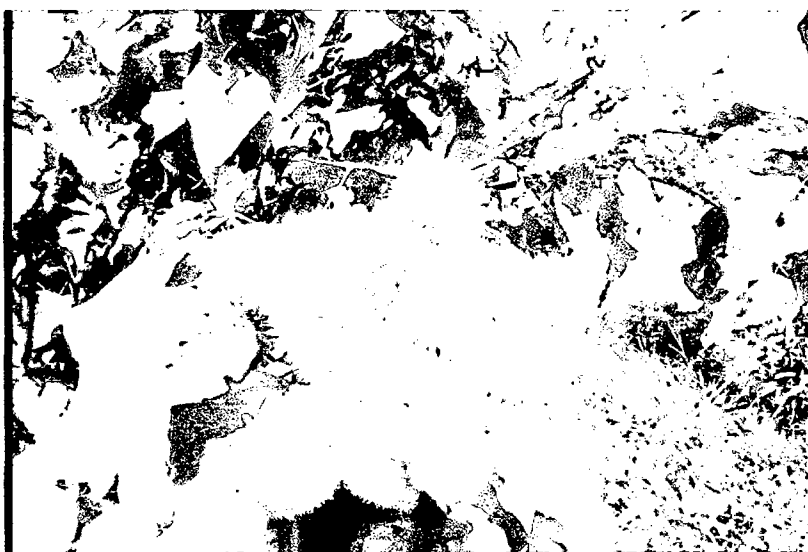
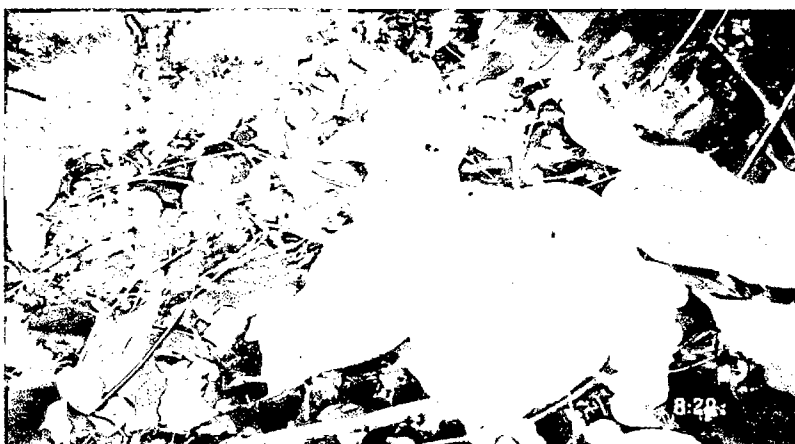
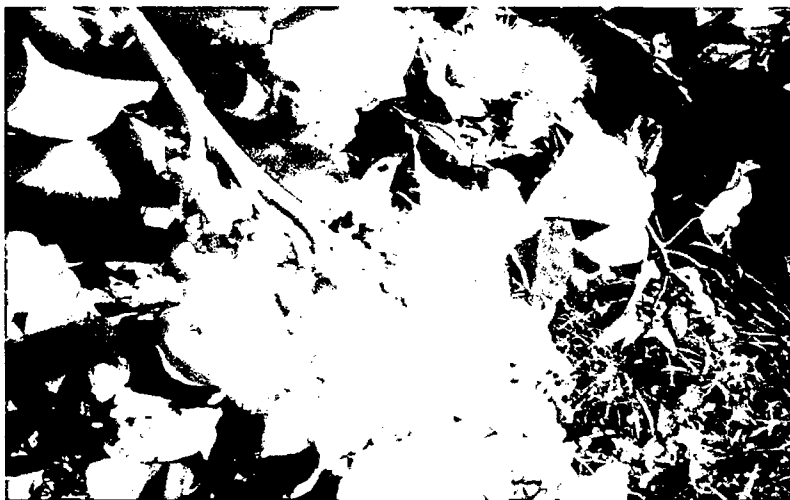
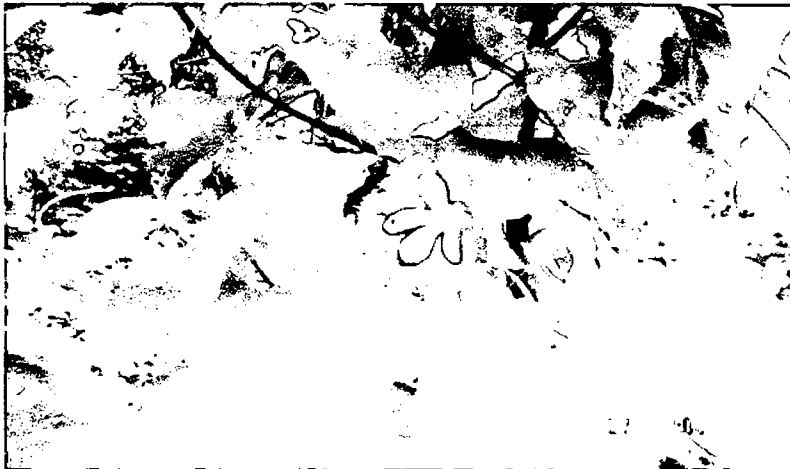


Figura N° 02. Ecotipo 2 - *Bixa orellana* L. "Achiote"



Figura N° 03. Ecotipo 3 - *Bixa orellana* L. “Achiote”





**Figura N° 04. Ecotipo 1, 2 y 3 - *Bixa orellana* L. "Achiote"**



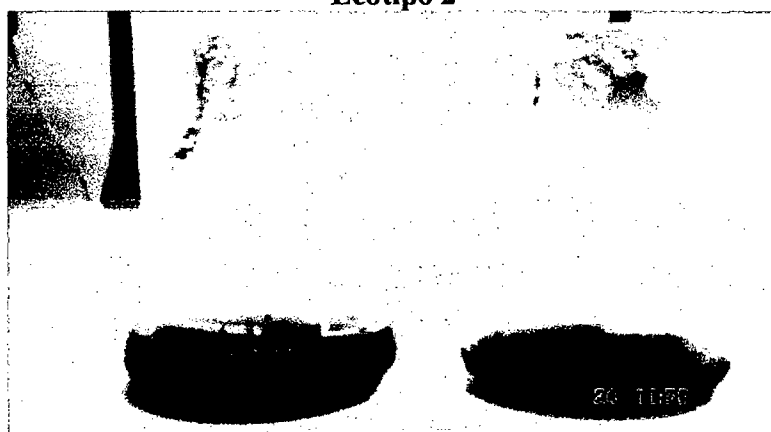
Figura N° 05. Extractos acuosos liofilizados de los tres Ecotipos de *Bixa orellana* L.

“Achiote”

Ecotipo 1



Ecotipo 2



Ecotipo 3



Figura N° 06. Indomecina USP.  $C_{19}H_{16}NO_4Cl$

