



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
Escuela de Formación Profesional de  
Farmacia y Bioquímica

**Tesis**

“Actividad citotóxica y antiinflamatoria *in vitro* de las hojas de once  
morfotipos de *Bixa Orellana* L.”

Para optar el título de

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Autores**

**Bach. NORTHCOTE MARREROS, SIUL SAMIRIA**

**Bach. VELÁSQUEZ RÍOS, PRISCILA MANUELA**

**Asesores:**

**Q.F MARIO JAVIER DE LA CRUZ FLORES, MSc**

**ING. JORGE ISAAC VILLACRÉS VALLEJO, Mgr.**

**Iquitos – Perú**

**2019**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN**

En el caserío de Nina Rumi, Distrito de San Juan Bautista, Departamento de Loreto, a los 18 días del mes de Julio del dos mil diecinueve, siendo las 10:30 Horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designado según Resolución Decanal N°034-FFB-UNAP-2019, integrados por los señores docentes que a continuación se detalla:

- Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Dra. PRESIDENTE
- BLGO. FELIPE RÍOS ISERN MIEMBRO
- Q.F. ROSA DEL CARMEN MILUSKA VARGAS RODRIGUEZ, PhD. MIEMBRO



Se constituyeron en las instalaciones de la Facultad de Farmacia y Bioquímica sala de docentes, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulada "**ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTIINFLAMATORIA In Vitro DE LAS HOJAS DE ONCE MORFOTIPOS DE *Bixa Orellana* L.**", presentado por las Bachilleres Siul Samiria Northcote Marreros y Priscila Manuela Velásquez Ríos, para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA, de acuerdo a la Ley Universitaria N° 30220 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

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

Adecuadamente

Los miembros del Jurado Calificador llegaron a las siguientes conclusiones:

- 1.-La Tesis ha sido Aprobada por Unanimidad
- 2.-Observaciones Ninguna

Siendo las 11:50 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándoles a los sustentantes por su correcta exposición



  
Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Dra.  
PRESIDENTE

  
BLGO. FELIPE RÍOS ISERN  
MIEMBRO

  
Q.F. ROSA DEL CARMEN MILUSKA VARGAS RODRÍGUEZ, PhD  
MIEMBRO

TESIS APROBADA EN SUSTENTACIÓN PÚBLICA DEL DÍA: DIESIOCHO  
DEL MES DE: JULIO DEL AÑO: 2019, EN LAS INSTALACIONES DE LA  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA.



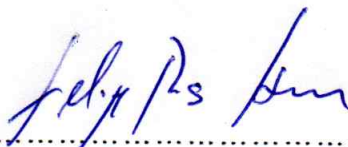
.....  
Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Dra.

Presidente



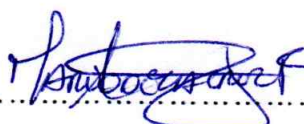
.....  
Q.F. ROSA DEL CARMEN MILUSKA VARGAS RODRIGUEZ, PhD.

Miembro



.....  
Bgo. FELIPE RIOS ISERN.

Miembro



.....  
Q.F. MARIO JAVIER DE LA CRUZ FLORES, MSc

Asesor



.....  
Ing. JORGE YSAAC VILLARES VALLEJO, MSc.

Asesor

## DEDICATORIA

En primer lugar dedico esta tesis a DIOS TODOPODEROSO, por haberme dado la vida y hacer posible que culmine con mucho éxito mi formación profesional.

Con mucho amor y cariño a mi madre y abuelos **FLORA MARREROS, VICTOR MARREROS Y FLORA MALDONADO** porque ellos fueron siempre el motor y motivo para que siga adelante demostrándome el apoyo incondicional, con mucha comprensión y siendo también los guías para culminar mi carrera profesional.

A mi tío **VICENT ROBERT CHARRUE**, que estuvo conmigo en los buenos malos y peores momentos de esta vida universitaria, por haber confiado en mí, por su apoyo incondicional, dándome consejos para ser una profesional de bien.

A mi esposo **IGOR PRACA DE ALMEIDA** por su paciencia, comprensión y apoyo durante todo este proceso.

A mis amigos del IMET en especial a **LENER NUÑEZ TUESTA Y SANDRA VASQUEZ TUESTA**, por su tiempo y conocimiento invertido durante este tiempo de trabajo.

**NORTHCOTE MARREROS, SIUL SAMIRIA**

## DEDICATORIA

A **DIOS** por haberme permitido y dado las fuerzas necesarias para llegar a esta etapa de mi vida, que es el inicio a la vida profesional de cada uno.

A mis padres **Manuel y Rocío**, pilares fundamentales en mi vida. Sin ellos, jamás hubiese podido conseguir lo que tengo hasta ahora. Su tenacidad y lucha insaciable han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir y destacar, no solo para mí, sino para mis hermanos y familia en general.

A mi esposo Gomer, compañero inseparable de cada jornada. A ellos este proyecto, que sin ellos, no hubiese podido ser.

A mis hermanos, parientes y primos que me brindaron el apoyo y respaldo en mi tomas de decisiones.

**VELÁSQUEZ RÍOS, PRISCILA MANUELA**

## **AGRADECIMIENTO**

A la facultad de Farmacia y Bioquímica – UNAP por habernos permitido ser parte de ella, a todos los docentes que fueron parte de nuestra formación profesional, brindándonos conocimientos y apoyo para seguir adelante día a día.

A nuestros asesores de tesis Q.F. Mario Javier De la Cruz Flores y Ing. Jorge Isaac Villacrés Vallejo, Mgr., por habernos brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también habernos tenido la paciencia del mundo para guiarnos durante todo el desarrollo de la tesis.

Al proyecto de investigación Obtención de morfotipos promisorios de *Bixa Orellana* L. “Achiote” en base a estudios integrados para la producción de colorantes y biomasa, Iquitos – Perú (Resolución Rectoral N° 0421-2019-UNAP)

Y para finalizar, agradecemos a todos los que fueron nuestros compañeros de clase durante todos los niveles de Universidad ya que gracias al compañerismo, amistad y apoyo moral han aportado nuestras ganas de seguir adelante en la carrera profesional.

**NORTHCOTE MARREROS, SIUL SAMIRIA  
VELÁSQUEZ RÍOS, PRISCILA MANUELA**

## INDICE DEL CONTENIDO

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
Portada	1
Dedicatoria	2
Agradecimiento	4
Índice	5
Índice de tablas	7
Índice de figuras	8
Lista de anexos	9
Siglas y abreviaturas	10
Resumen	11
Abstract	12
<b>CAPITULO I</b>	<b>13</b>
1.1. Introducción	13
1.2. Objetivos	15
1.2.1. Objetivo General	15
1.2.2. Objetivos Específicos	15
<b>CAPITULO II</b>	<b>16</b>
Marco Teórico	16
2.1. Antecedentes	16
2.2. Marco conceptual	19
2.2.1. Inflammaci3n	19
2.2.2. Tipos de inflamaci3n	21
2.2.3. Fases de la inflamaci3n	22
2.2.4. Tratamiento inflamatorio	22
2.2.5. Citotoxicidad	23
2.2.6. Especie vegetal en estudio:	24
2.3. Hip3tesis	29
2.4. Variables	30
2.4.1. Variable independiente	30
2.4.2. Variable dependiente	30
2.5. Operacionalizaci3n de variables	31
	34

<b>CAPITULO III</b>	
Metodología	34
3.1. Tipo de estudio	34
3.2. Diseño de la investigación	34
3.3. Población y Muestra	34
3.3.1. Población animal	34
3.3.2 Muestra animal	34
3.3.3 Muestra vegetal	35
3.4. Procedimiento experimental	35
3.4.1. Actividad citotóxica	35
3.4.2. Actividad antiinflamatoria	37
3.4.3. Preparación de los extractos acuosos liofilizados	39
3.5. Consideraciones éticas	39
<b>CAPITULO IV</b>	40
4.1. Resultados	40
4.1.1. Actividad citotóxica	40
4.1.2. Actividad antiinflamatoria	43
4.2. Discusión	45
4.3. Conclusiones	46
4.4. Recomendaciones	47
4.5. Referencias bibliográficas	48
4.6. Anexos	53



## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Cantidad de nauplios inyectados.	40
Tabla 2. Conteo de nauplios vivos y muertos de <i>Artemia franciscana</i> en las disoluciones.	42
Tabla 3. Calculo de la CL <sub>50</sub> a partir de la ecuación lineal obtenida vía análisis Probit	43
Tabla 4. Calculo del % de inhibición antiinflamatoria	43
Tabla 5. Calculo de la IC <sub>50</sub> de los once morfotipos de <i>Bixa orellana</i> L. y de La Hidrocortisona	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1: Inflamación.	20
Figura 2: Vía inflamatoria genérica.	21
Figura 3: Migración de leucocitos al tejido lesionado durante la respuesta inflamatoria.	22
Figura 4: Fármacos antiinflamatorios de uso comercial	23
Figura 5: Estructura química de los principales pigmentos de la <i>Bixa orellana</i> L.	27

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo 1. Flujograma del proceso de preparación de extractos acuoso liofilizado.	53
Anexo 2. Flujograma del ensayo de la actividad citotóxica	54
Anexo 3. Esquema de dilución del extracto para el experimento de citotoxicidad	55
Anexo 4. Configuración de esquema de experimento de citotoxicidad	55
Anexo 5. Hoja de trabajo_ ensayo de toxicidad por <i>Artemia franciscana</i>	56
Anexo 6. Hoja de trabajo_ conteo de larvas vivas / muertas de <i>Artemia franciscana</i>	57
Anexo 7. Constancia de certificación de la especie vegetal	58

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

ppm= partes por millón

FFB= Facultad de Farmacia y Bioquímica

CL<sub>50</sub>= Concentración letal media 50

IO= Instan Ocean

OMS= Organización mundial de la Salud

IMET= Instituto de Medicina Tradicional

H<sub>0</sub>= Hipótesis nula

H<sub>1</sub>= Hipótesis del investigador

K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>= Dicromato de potasio

M1 – M11 = morfotipo 1 al morfotipo 11

V = vivos

M = muertos

μg= micro gramos

mg/mL= miligramos por mililitros

ACIT = actividad citotóxica

AAI = actividad antiinflamatoria

## RESUMEN

El objetivo fue determinar actividad citotóxica y antiinflamatoria *in vitro* de hojas de once morfotipos de *Bixa Orellana* L. Hojas colectadas y acondicionadas, secadas en deshumecedor a 35 °C por seis días, posteriormente micropulverizadas. La ACIT se determinó sobre nauplios de *Artemia franciscana* a concentraciones de 0,001, 0,01, 0,1 y 1 mg/mL; obteniéndose CL<sub>50</sub> vía análisis Probit. La AAI fue mediante protección de membrana plasmática en glóbulos rojos humanos a concentraciones de 1, 10, 100, 1000 µg/mL midiéndose absorbancia 540 nm para obtener porcentaje inhibición e IC<sub>50</sub> se determinó por curva dosis-respuesta. Se concluyó que todos los morfotipos no presentan actividad citotóxica *in vitro* sobre nauplios de *Artemia franciscana*, ya que presentan CL<sub>50</sub> > 1000 µg/mL y en la actividad antiinflamatoria el de mejor actividad fue el morfotipo 9 con un IC<sub>50</sub> = 0,14 µg/mL; seguido del morfotipo 11 IC<sub>50</sub> = 0,16 mg/mL; morfotipo 10 con un IC<sub>50</sub> = 0,18 µg/mL; morfotipo 7 con un IC<sub>50</sub> = 0,43 µg/mL; morfotipo 6 con un IC<sub>50</sub> = 0,81 µg/mL y el morfotipo 5 con un IC<sub>50</sub> = 0,87 g/mL.

**Palabras claves:** *Bixa orellana* L. ,Actividad citotóxica, *Artemia franciscana*, actividad antiinflamatoria.

“In vitro cytotoxic and antiinflammatory activity of the leaves of eleven morphotypes of *Bixa Orellana* L.”

**ABSTRACT**

The objective was to determine in vitro cytotoxic and antiinflammatory activity of leaves of eleven morphotypes of *Bixa Orellana* L. Sheets collected and conditioned, dried in dehumidifier at 35 °C for six days, then micropulverized. ACIT was determined on nauplii of *Artemia franciscana* at concentrations of 0,001, 0,01, 0,1 and 1 mg/mL; LC50 was obtained through probit analysis. AAI was by protecting plasma membranes in human red blood cells at concentrations of 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{g/mL}$  by measuring 540 nm absorbance to obtain porcentaje inhibition and IC50 was determined by dose-response curve. It was concluded that all morphotypes have no in vitro cytotoxic activity on nauplii of *Artemia franciscana*, since they have CL50 > 1000  $\mu\text{g/mL}$  and in the antiinflammatory activity the best activity was morphotype 9 with an IC50 = 0,14  $\mu\text{g/mL}$ ; followed by morphotype 11 IC50 = 0,16 mg/mL; morphotype 10 with an IC50 = 0,18  $\mu\text{g/mL}$ ; morphotype 7 with an IC50 = 0,43  $\mu\text{g}$ ; type 0,5081  $\mu\text{g/mL}$  and morphotype 5 with an IC50 = 0,87  $\mu\text{g/mL}$ .

Keywords: *Bixa Orellana* L., Cytotoxic activity, Franciscan *Artemia*, antiinflammatory activity.

# CAPITULO I

## 1.1 INTRODUCCION

En las últimas décadas se ha incrementado el interés por los productos naturales y sus aplicaciones dentro de la industria farmacéutica en búsqueda de nuevos medicamentos no solo eficaces sino que también sean seguros <sup>(1)</sup>. Cerca al 30% de los fármacos empleados en los países industrializados proceden o son sintetizados a partir de productos vegetales, puesto que los extractos de plantas son una fuente atractiva de nuevos medicamentos <sup>(2)</sup>.

Cuando el organismo o un tejido se ven injuriado por agentes biológicos, químicos o físicos se produce la respuesta inflamatoria, que si bien tiene un fin protector, muchas veces puede causar daño y es necesario frenarla. Muchas especies vegetales son usadas en preparados artesanales con el fin de disminuir la respuesta inflamatoria y comercialmente los antiinflamatorios son uno de los medicamentos más vendidos <sup>(3)</sup>.

El estudio en cuanto a propiedades curativas de gran diversidad de plantas peruanas es aún incipiente, siendo mínimo el de las especies vegetales con posible actividad antineoplásica <sup>(3)</sup>. La actividad citotóxica de algunas especies químicas es deseada para destruir células neoplásicas, contrariamente una molécula de aplicación terapéutica con otro tipo de actividad, no debe producir ni inducir cambios mutagénicos porque sería insegura <sup>(4)</sup>.

Las plantas superiores han sido una fuente de mucha utilidad, sin embargo es importante descartar si los productos de origen natural mediante modelos *in vitro* e *in vivo*, no poseen actividad toxica, pero si es beneficioso conocer la actividad antitumoral inicial <sup>(4)</sup>. En las últimas década se han incorporado algunos ensayos de gran utilidad y eficacia que demandan unas mínimas cantidades de muestras y permiten una rápida evaluación de extractos crudos y fracciones para determinar actividad tóxica como actividad citotóxica; ocupando un lugar sobresaliente el bioensayo con *Artemia spp*<sup>(3)</sup>.

Dentro de la investigación se busca determinar la actividad tóxica que presentan los extractos de las especies vegetales en estudio sobre los nauplios de *Artemia spp.*, se incluyen: la determinación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) a fin de conocer la concentración que producirá un efecto tóxico en un 50% de la especie en experimentación y observar la relación riesgo-beneficio que va implicar el uso de estos extractos vegetales como alternativa medicinal <sup>(3)</sup>.

Asimismo, es necesario indicar que la actividad antiinflamatoria ha despertado en los últimos años un gran interés científico dentro del área farmacológica, principalmente por la capacidad potencial de ciertos compuestos de interferir en la evolución de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios <sup>(2)</sup>; dando como resultado un aumento en el número de personas que utilizan estos compuestos naturales para controlar su enfermedad <sup>(5)</sup>.

Es por ello que el presente trabajo de investigación, plantea determinar la actividad citotóxica *in vitro* sobre *Artemia franciscana* y la actividad antiinflamatoria *in vitro* mediante protección de membrana plasmática en glóbulos rojos humanos de las hojas de once morfotipos de *Bixa orellana* L.



## **1.2. OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo General**

- Determinar la actividad citotóxica *in vitro* sobre *Artemia franciscana* y la actividad antiinflamatoria *in vitro* mediante protección de membrana plasmática en glóbulos rojos humanos de las hojas de once morfotipos de *Bixa orellana* L.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- a) Determinar la concentración letal media 50 (CL<sub>50</sub>) de las hojas de los once morfotipos de *Bixa orellana* L.
- b) Determinar la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) y % de inhibición antiinflamatoria de las hojas de once morfotipos de *Bixa orellana* L.

## CAPITULO II

### MARCO TEORICO

#### 2.1. ANTECEDENTES

**Aranda, J. et al. (2017)**, realizaron una caracterización fitoquímica mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas. El método usado para la toxicidad fue medida en larvas de *Artemia salina*, la actividad antioxidante fue medida a través de la prueba de 2,2-difenil-1- picrilhidrazil (DPPH); y, la actividad hipoglicemiante *in vitro* fue evaluada mediante la prueba de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa e *in vivo* usando ratas albinas. Obtuvieron como resultado fitoconstituyentes: compuestos piranos, carbohidratos y fenoles; asimismo con respecto a la letalidad, encontraron una  $CL_{50}$  de 3108  $\mu\text{g/mL}$ ; la actividad antioxidante en la concentración de 20 mg/mL ( $86,68 \pm 0,71\%$ ) con una  $IC_{50}$ : ( $3,08 \pm 0,31$  mg/mL). Concluyeron que la concentración de 2000 y 1750  $\mu\text{g/mL}$  mostró la mejor actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -glucosidasa ( $IC_{50}$ : 399,39  $\mu\text{g/mL}$ ) observándose que había diferencia significativa<sup>(6)</sup>.

**Sepúlveda, C. et al.(2016)**, evaluaron el efecto del tiempo de extracción y la relación solvente sobre el contenido de fenoles totales, así como el efecto del contenido de sólidos y el pH de la solución, sobre la actividad antioxidante del extracto de hojas de *B. orellana*. El método usado para el contenido total de fenoles fue *Folin-Ciocalteu* y la actividad antioxidante se determinó por los métodos espectrofotométricos de reacción con el radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- ácido sulfónico) y la medida de la capacidad reductora sobre el  $\text{Fe}^{+3}$ . Los resultados sobre las condiciones del proceso que más favorecen la extracción de compuestos fenólicos desde las hojas de *Bixa orellana* L. son: tiempo de extracción de 60 h y relación solvente/ hojas (v/p) de 4/1; el contenido máximo de fenoles totales fue de  $144,77 \pm 9,66$  mg<sub>AT</sub>.g<sup>-1</sup>, que al someterlo a una solución de pH de 8 y 11,7 °Brix, presenta una actividad antioxidante de  $4406,83 \pm 43,30$   $\mu\text{mol}_{ET}$ .g<sup>-1</sup> por el método de reacción con el radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- ácido sulfónico) y  $4547,22 \pm 53,19$   $\mu\text{mol}_{ET}$ .g<sup>-1</sup> por el método de medida de la capacidad reductora sobre el  $\text{Fe}^{+3}$ <sup>(7)</sup>.

**Capella, S.O. et al.(2016)**, evaluaron la acción del extracto oleoso de urucum en la cicatrización de heridas cutáneas abiertas en ratas Wistar, las mismas que fueron tratadas de forma diaria con: extracto de urucum 0,1% (U 0,1%), extracto de urucum 0,01% (U 0,01%), vaselina (V) y solución fisiológica (SF) hasta 21 días. A los cuatro, siete, 14 y 21 días, se evaluó clínicamente la presencia de exudado, corteza y epitelización. A las 21 días, las muestras de piel fueron recolectadas para análisis tensiométrico, donde clínicamente todos los grupos de tratamiento presentaron una evolución cicatricial fisiológica. Los grupos U 0,1% y U 0,01% presentaron mayor presencia de epitelización a los siete días y mayor retracción cicatricial a los cuatro días. En la histología, U 0,1% y U 0,01% presentaron a los cuatro y siete días mayor cantidad de fibrina e inflamación que V y SF, y, en los demás momentos, no hubo diferencias entre los grupos. En cuanto a la fase cicatricial, a los cuatro días todos los grupos se encontraban en la fase inflamatoria, a los siete días U 0,1% y U 0,01% permanecían en la fase inflamatoria, difiriendo de SF y V, que se caracterizaban en la fase proliferativa. A los 14 días, los grupos se presentaban en transición de fase proliferativa para maduración y, a las 21 días, estaban todos en la fase de maduración. Concluyeron que el extracto oleoso de urucum acelera el proceso cicatricial en los primeros días, pero proporciona una cicatriz de baja calidad<sup>(8)</sup>.

**Avalos, J. (2014)**, evaluaron y compararon la actividad tóxica, citotóxica y fitoquímicos presentes de los extractos etanólicos y sus particiones de semilla y hoja de *Azadirachta indica* (Neem) de origen Mexicano (Ébano, SLP) comparada con la comercializada en la India (Coimbatore, Tamil Nadu). Usaron tres líneas celulares MCF7 (Cáncer de Mama), HaCaT (Queratinocitos Humanos) y CaLo (Cáncer cervicouterino). Determinaron la toxicidad de los extractos sobre *Artemia salina* siendo la de mayor actividad el extracto de semilla de neem de la India con una DL<sub>50</sub> de 476 µg/mL; los extractos que presentaron mayor actividad citotóxica sobre las distintas líneas celulares fueron: Extracto de hoja de neem de la india con una IC<sub>50</sub> 22.03 µg/mL sobre la línea MCF7, extracto de semilla de neem de la India con una IC<sub>50</sub> 32.17 µg/mL sobre la línea CaLo y extracto de hoja de neem de México con una IC<sub>50</sub> 135.76 µg/mL sobre la línea HaCaT. De los extractos de hoja y semilla se obtuvieron

dos particiones hexánica y clorofórmica, la mayor actividad se presentó en la partición hexánica de hoja de neem de la India con una  $IC_{50}$  25.17  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sobre la línea celular MCF7, partición clorofórmica de semilla de neem de la India con una  $IC_{50}$  30.93  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sobre la línea celular CaLo y partición clorofórmica de hoja de neem de la India con una  $IC_{50}$  98.09  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sobre la línea celular HaCaT. Demostraron que los extractos etanólicos de *A. indica* originarios de la India mostraron mayor actividad tóxica y citotóxica que los extractos de origen México, la partición hexánica de hoja de neem de la India fue la que presentó mayor actividad citotóxica sobre MCF7 y es promisorio como fitofármaco <sup>(9)</sup>.

**Huamán, O. et al. (2013)**, evaluaron el efecto de los extractos acuoso e hidroetanólico de hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) sobre los indicadores no enzimáticos de la hepatotoxicidad por paracetamol, en ratas. Utilizaron un diseño experimental con ratas machos de 3 meses de edad. Distribuyeron aleatoriamente 35 ratas machos de 3 meses de edad en 5 grupos, que recibieron vía peroral por 10 días: NaCl 0,9 por ciento los controles positivo y negativo, silimarina 300 mg/kg, extracto acuoso 500 mg/kg y extracto hidroetanólico 500 mg/kg; usaron como principales medidas de resultados: Ratio hepático (peso hígado/peso animal x 100), bilirrubina total (BT), directa (BD) e indirecta (BI), hepatomegalia, especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en hígado y suero. Mostraron como resultados que el tratamiento con extracto acuoso solo disminuyó los indicadores BT y BI ( $p < 0,01$ ), TBARS en suero ( $p < 0,05$ ) y hubo disminución de la masa hepática de -13,2 por ciento ( $p < 0,01$ ). En el grupo que recibió el extracto hidroetanólico se redujo la BT, BI ( $p < 0,01$ ), BD ( $p < 0,05$ ), TBARS en hígado ( $p < 0,01$ ) y la masa hepática -9,37 por ciento. Concluyeron que los extractos acuoso e hidroetanólico de hojas de *Bixa Orellana* L. (achiote) presentarían efecto hepatoprotector frente al paracetamol a dosis tóxica, en ratas <sup>(10)</sup>.

## 2.2. MARCO CONCEPTUAL

### 2.2.1. Inflamación.

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. Aunque dolorosa, la inflamación es, normalmente, una respuesta reparadora; un proceso que implica un enorme gasto de energía metabólica. En ocasiones, transcurre hacia una situación crónica que suele dar lugar a una enfermedad degenerativa como artritis, arteriosclerosis o, incluso, cáncer. Aunque suele acompañarse de una respuesta generalizada «respuesta de fase aguda» caracterizada por un cuadro clínico pasajero de sensación de malestar, fiebre y modificación del perfil de las proteínas y leucocitos circulantes, en ocasiones, la inflamación aguda local provoca una reacción orgánica generalizada «síndrome de respuesta inflamatoria sistémica» que, en una secuencia de reacciones a modo de espiral sin control «inflamación maligna» conduce al fracaso funcional de los diferentes órganos y sistemas «fracaso multiorgánico» y tras ello a la muerte del individuo <sup>(16)</sup>.

#### Desencadenante

#### inflamatorio

Infección

Lesión tisular

Estrés o disfunción celular

#### INFLAMACION

#### Propósito

Defensa del organismo

Respuesta de

Adaptación al estrés y retorno

#### fisiológico

contra la infección

reparación tisular

al estado homeostático

**Consecuencias** Autoinmunidad, lesión

Fibrosis, metaplasia y/o

Dishomeostasis (UPR) y/o

**Fisiopatológicas** Inflatóriatisular, tumorogénesis

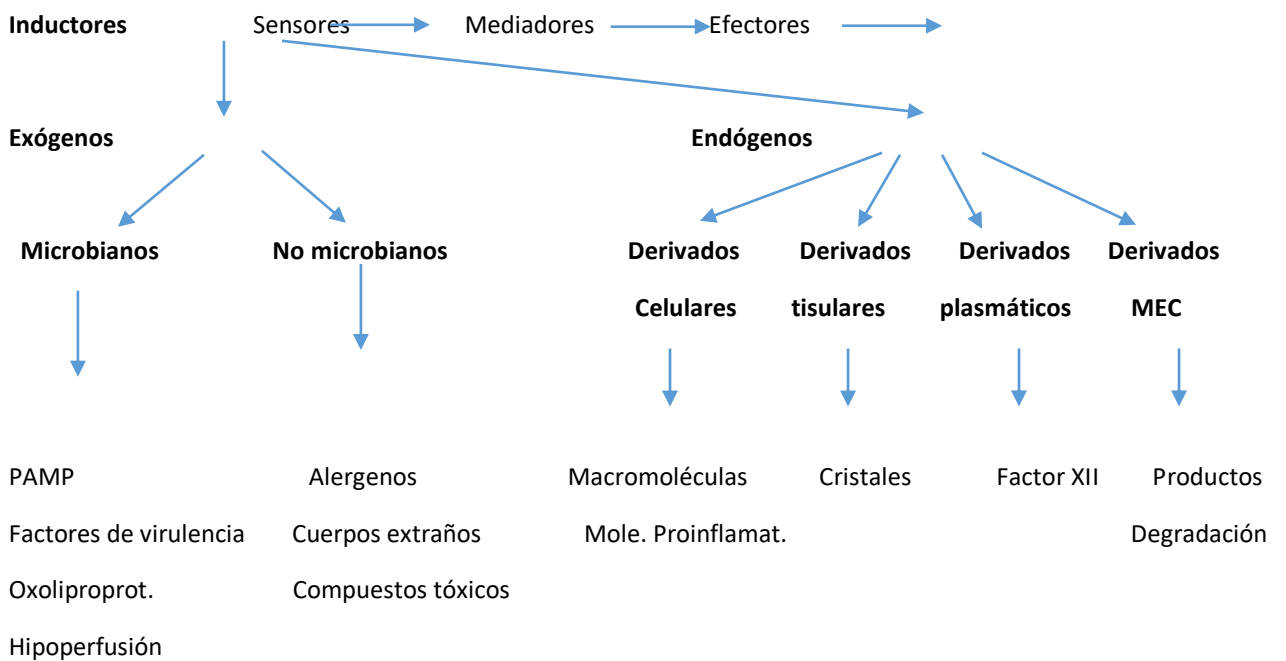
enf. autoinflamatorias

Sepsis, SIRS

#### Figura 1. Inflamación

Fuente: Weiss U (2002)

En cualquier caso, la respuesta inflamatoria está coordinada por un copioso dispositivo de mediadores que se organizan en complejas redes reguladoras. Para diseccionar tal entramado, es útil agrupar esas señales en categorías funcionales y distinguir entre inductores y mediadores de la respuesta inflamatoria. Los primeros son señales que inician el proceso; activan sensores especializados que suscitan la producción de lotes específicos de mediadores. Estos, a su vez, alteran los estados funcionales de células, tejidos y órganos — que son los efectores de la inflamación—, de manera que permitan su adaptación primero y reparación después, del daño infringido por el inductor<sup>(13)</sup>.



Inductores	Sensores	Mediadores	Efectores
Lipopolisacáridos bacterianos	TLR4	TNF- $\alpha$ , IL-6, PGE2	Endotelioscitos, leucocitos, hepatocitos, hipotalamocitos
Alergenos	IgE	Amina vasoactivas	Endotelioscitos, lisoniocitos
Cristales-urato monosódico, o pirofosfato cálcico deshidratado	NALP3 (inflamasona)	IL-1 $\beta$	Endotelioscitos, leucocitos, hepatocitos, hipotalamocitos
Colágeno	Factor Hageman	Bradiquina, coagulación, fibrino, C'	Endotelioscitos, lisoniocitos

**Figura 2.** Una vía inflamatoria genérica

Fuente: Weiss U (2002)

### 2.2.2. Tipos de inflamación.

La respuesta inflamatoria presenta dos tipos, que se diferencian por su duración

#### a) Inflamación aguda.

Es la respuesta inicial e inmediata a la lesión, relacionada principalmente con cambios hemodinámicos locales que llevan a manifestaciones clínicas como rubor, calor, edema y dolor en la zona afectada. Posteriormente, hay salida de leucocitos hacia el tejido lesionado e iniciar el proceso de degradación de los tejidos necróticos. Este tipo de inflamación tiene una duración que oscila entre, minutos, horas y pocos días.

#### b) Inflamación crónica.

Es una inflamación de larga duración (semanas, meses o años) en la cual la inflamación activa, la lesión tisular y el proceso de reparación suceden al mismo tiempo. La inflamación crónica es nociva para la salud y se constituye

en el mecanismo patogénico básico de algunas enfermedades crónicas como artritis reumatoidea, aterosclerosis fibrosis pulmonar, obesidad, entre otras.

### 2.2.3. Fases de la inflamación.

Después de un corto periodo de vasoconstricción a nivel arterial, se produce vasodilatación y aumento de flujo sanguíneo en la zona de la lesión, que causa enrojecimiento y aumento de la temperatura; posteriormente el flujo sanguíneo disminuye por un aumento de la permeabilidad vascular que permite la salida de líquido de los vasos y aumento de la viscosidad sanguínea, lo que se denomina estasis (parálisis total del flujo). A medida que evoluciona la estasis se produce la migración de los leucocitos a través del endotelio vascular mediante un mecanismo denominado transmigración (Figura 3), el cual permite que las células inflamatorias lleguen al sitio de la lesión <sup>(11)</sup>.

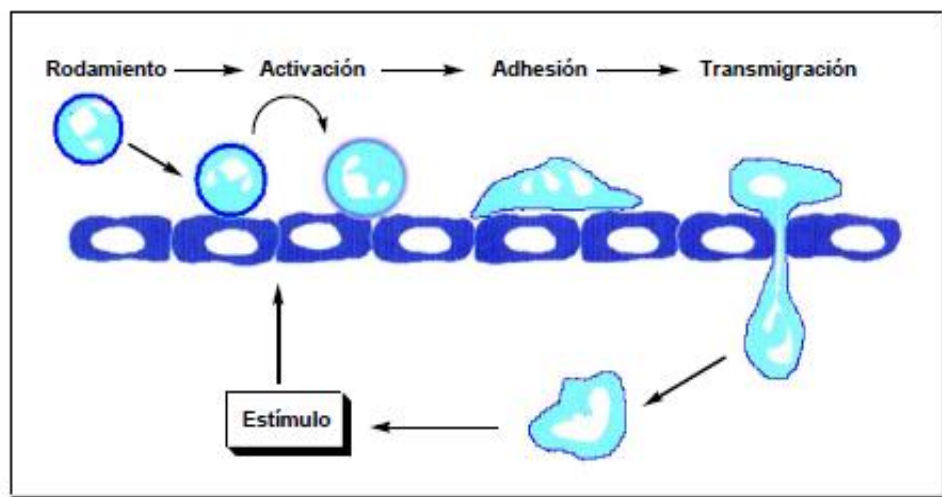


Figura 3: Migración de leucocitos al tejido lesionado durante la respuesta inflamatoria

Fuente: Weiss U (2002)

### 2.2.4 Tratamiento antiinflamatorio

Los tratamientos antiinflamatorios implican el uso de fármacos de tipo esterooidal y no esterooidal. Los glucocorticoides, cuya naturaleza es esterooidal (ej. cortisol 1), inhiben la transcripción de genes proinflamatorios y suprimen la respuesta inmune. Por otro lado, los agentes no esterooidales (ej. Diclofenaco 2)



suprimen la actividad de la enzima ciclooxigenasa (COX). Sin embargo, la utilización de estos agentes se ha asociado con complicaciones de tipo gastrointestinal e insuficiencia renal <sup>(14)</sup>.

La alta incidencia de enfermedades crónicas en las que está involucrada la inflamación y la presencia de efectos adversos en muchos de los fármacos utilizados comúnmente, ha orientado las investigaciones hacia la búsqueda de nuevos principios activos, con el objetivo de encontrar estructuras que brinden mayor eficacia y seguridad para controlar los efectos nocivos de la inflamación<sup>(14)</sup>.

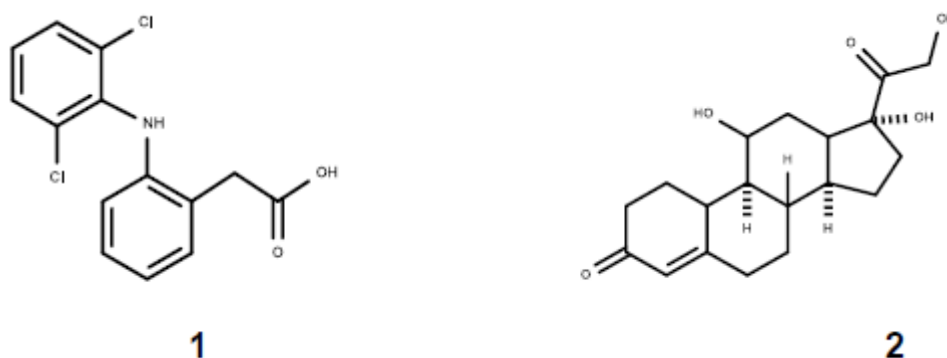


Figura 4: fármacos antiinflamatorios de uso comercial

Fuente: Weiss U (2002)

### 2.2.5. Citotoxicidad

Citotoxicidad, es la capacidad que tienen ciertas sustancias de destruir o lesionar las células tisulares. Todas las sustancias con efectos tóxicos, por variados que éstas sean, son compuestos químicos complejos que provocan enfermedades, o en casos muy graves, ocasionan la muerte según la dosis ingerida. Entre las sustancias tóxicas que contienen muchas plantas se encuentran alcaloides, glicósidos cardiotónicos, saponinas y terpenoides<sup>(15)</sup>.

## 2.2.6. Especie vegetal en estudio.

*Bixa orellana* L. (Nombre común: Achiote)

El achiote, urucú u onoto (*Bixa orellana*) es un arbusto de las regiones intertropicales de América, cultivado específicamente en el centro de México y Andes de Perú, desde la época precolombina.

### A. Clasificación Taxonómica.

Reino: Plantae.

División: Magnoliophyta.

Clase: Magnoliopsida.

Orden: Malvales.

Familia: Bixaceae.

Género: *Bixa*.

Especie: *Bixa orellana* L.

### B. Descripción botánica.

La *Bixa orellana* L. es un arbusto de las regiones intertropicales de América. Pertenece a la familia Bixaceae, y también se le conoce con los nombres: *Bixa acuminata*, *B. americana*, *B. odorata*, *B. platycarpa*, *B. purpurea*, *B. tinctoria*, *B. upatensis*, *B. urucurana*, *Orellana americana*, *O. orellana*. Sus nombres comunes son: axiote, achiote, achiotec, bijol, urucú, urucum, rocú, annatto, orellana, changerica entre otros<sup>(16)</sup>.

*B. orellana* es un arbusto perenne, de 2 a 6 m de altura, copa baja y extendida; tallo pardo y ramifico a poca altura del terreno. Las hojas son simples, grandes, verdosas claras, de márgenes lisos. Las flores se disponen en ramilletes, blanquecinas a rosadas según las variedades. El fruto es una cápsula roja de 2 a 6 cm de largo, con pelos gruesos espinosos, puede ser verdoso oscuro a morado (según las variedades), que al madurar pasa a pardo rojizo oscuro.

En cada valva hay semillas en número variable (10-50, en relación con el tamaño capsular). La semilla es comprimida, de 5 mm de largo, con tegumento recubierto de una sustancia viscosa de color rojizo intenso<sup>(17)</sup>.

El pigmento está localizado en la superficie de la semilla, como una cubierta resinosa y aceitosa, está formado fundamentalmente por bixina (cis y trans), con trazas de norbixina, éster. de dimetil bixina y otros apocarotenoides.

### **C. Información Etnomédica**

Según BrackE.<sup>(18)</sup> y Nalvarte W<sup>(19)</sup>, encontraron que en la medicina tradicional ésta planta es utilizada en:

- Fiebre: Tomar la infusión de las hojas.
- Inflamaciones dérmicas y vaginales: Aplicar la maceración acuosa de las hojas.
- Inflamación ocular: Instilar el mucílago resultante de la maceración acuosa de la corteza.
- Cefálico: Aplicar la pasta de las hojas machacadas en la frente y sienes.
- Dolores renales: Cocción de las hojas.
- Conjuntivitis: Aplicar la maceración acuosa de las hojas o de los tallos.
- Sedante: tomar el cocimiento de las hojas o de la corteza en mezcla con hojas de toronjil, rosa cisa y rosas.
- Antiemético: Tomar el líquido de las hojas machacadas.
- Antidiarreico: Tomar el líquido de las hojas machacadas o tomar la infusión de las hojas o semillas.
- Vómitos: En infusión, poner 3 hojas por cada taza, tomar una taza 3 veces al día.
- Tónico estomacal: Tomar la maceración acuosa de las semillas.
- Digestivo: Tomar el cocimiento de las hojas o corteza.
- Depurativo: Tomar el cocimiento de la corteza de la corteza raspada.
- Hepatitis: Tomar la decocción de las yemas florales.
- Malestar del hígado: Las semillas y el tinte, tomar el cocimiento de los cogollos.
- Malestar de la garganta, afecciones respiratorias (tos, bronquitis): Tomar la infusión de las hojas y semillas.
- Asma: Tomar el cocimiento de la raíz.
- Expectorante: Tomar la infusión de las semillas.

- Amigdalitis: Tomar el polvo de las semillas mezcladas con miel de abejas.
- Acarosis (caracha): Aplicar las semillas machacadas y maceradas en aceite de higuierillas.
- Lepra: Tomar el aceite de las semillas o aplicar la pasta de las hojas con sulfato de magnesio.
- Infecciones a la piel: Emplasto de las hojas sobre la piel previa maceración en agua. Dejar de 9 a 12 horas en un litro de agua durante una noche y aplicar después sobre la lesión.
- Antiséptico vaginal: Poner de 9 a 12 hojas restregadas durante una noche en un litro de agua. El líquido se aplica en lavados vaginales.
- Cicatrizante: Aplicar la maceración acuosa de las hojas serenas o lavar la herida con el cocimiento de las hojas.
- Quemaduras: Aplicar las semillas frescas trituradas.
- Diurético: Tomar el cocimiento de la raíz.
- Hipertensión: Tomar la maceración acuosa de las hojas.
- Homeostático: Contra las hemorroides, contra la angina, contra los abscesos.
- Cardiotónico: Tomar la infusión de las semillas o de las hojas.
- Antídoto contra el cianuro y ácido cianhídrico (yuca amarga): Comer el fruto o tomar la infusión del fruto y semillas.
- Malaria: Tomar el cocimiento de la raíz.

#### **D. Composición Química.**

La *B. orellana* es rica en carotenoides, especialmente apocarotenos como la bixina, isobixina y norbixina; también se describen el beta-caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina, orellina, entre otros. Además las semillas contienen lípidos como el ácido linoleico, y en menor cantidad el alfa-linolénico y oleico; aminoácidos como el glutamato, aspartato y leucina; contiene altas concentraciones de fósforo y escasas de calcio y gran cantidad de hierro y zinc (20,21).

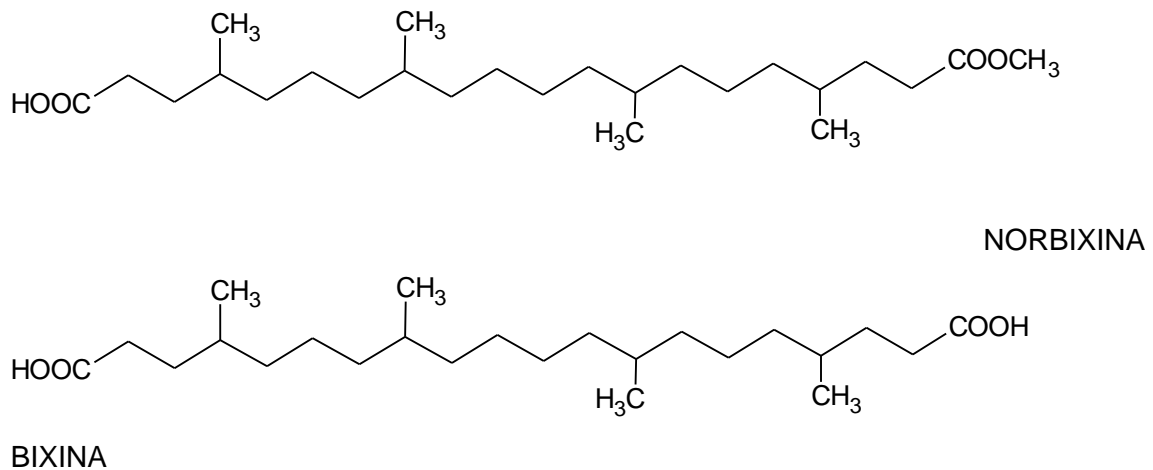


Figura 5: Estructura química de los principales pigmentos de la *Bixa Orellana* L.  
Fuente: De la C. (2010)

Los extractos de achiote son aceites o productos alcalinos obtenidos al eliminar la capa externa de las semillas de achiote mediante diversos procesos<sup>(24)</sup>. Estos extractos se presentan en polvo, en pasta, en suspensión o en solución. Los extractos liposolubles de achiote se obtienen mediante la extracción de la cubierta exterior de las semillas por medio de:

- a) La extracción directa con aceites o grasas comestibles.
- b) La incorporación en los aceites o grasas comestibles del extracto obtenido a disolventes orgánicos (acetona, diclorometano, etanol, hexano, metanol, isopropanol, tricloroetileno), seguida de la eliminación del disolvente.

El achiote es uno de los materiales más interesantes para la extracción de pigmentos es la posibilidad de obtener de su semilla tanto colorantes solubles en agua (hidrosolubles) como colorantes solubles en aceite (liposolubles) con solo variar el disolvente de extracción. La bixina es el pigmento mayoritario de la semilla del achiote y representa el 80 % de todos los carotenoides presentes. A partir de la bixina es posible obtener otros pigmentos como la norbixina (liposoluble), la sal de norbixina (hidrosoluble) y diversos productos de la degradación térmica que presentan liposolubilidad y el color amarillento estable e ideal para la coloración de las pastas. La sal de norbixina se obtiene

mediante la extracción alcalina (con hidróxido sódico o potásico) de los pigmentos de la semilla del achiote. Esta extracción transforma la bixina en sal (sal de norbixina), que es soluble en soluciones acuosas alcalinas. La sal de norbixina se precipita en forma de norbixina mediante la neutralización de la disolución (pH= 7), que en esta forma no es soluble en agua. Además de la sal de norbixina, es posible aumentar la solubilidad en agua de la bixina y la norbixina utilizando emulsificantes como los polisorbatos, el glicol propilénico, entre otros.

El extracto liposoluble de achiote debe contener al menos un 0,2 % de carotenoides, expresados como bixina, mientras que el extracto hidrosoluble de bixa debe contener al menos un 0,2 % de carotenoides, expresados como norbixina. La fracción liposoluble es insoluble en agua y es poco soluble en etanol, mientras que la fracción hidrosoluble es soluble en agua y poco soluble en etanol<sup>(23)</sup>.

De las semillas: bixinato de sodio, ácido tomentósico, bixina, beta caroteno, pectina, vitamina A, cryptoxantina, luteína, metilbixina, norbixina, zeaxantina.

De las hojas: Bixahaneno, ishwarano, 7-bisulfato de epigenina, 7-bisulfato de luteolina, 8-bisulfato de hipolaetina.

Carotenoides: Bixina, norbixina, orellina, betacaroteno, criptoxantina, metilbixina, zeaxantina, luteína, mono y sesquiterpenos.

Flavonoides: Glucósido de apigenina, bisulfato de apigenina, bisulfato de luteolina, bisulfato de hipolaetina, ácido tomentósico, vitaminas (A, B y C), proteínas, azúcares, celulosa, grasas, calcio, fierro y fósforo<sup>(24)</sup>.

### 2.3. HIPÓTESIS

H<sub>0</sub>: Los once morfotipos de *Bixa orellana* L. presentan actividad citotóxica *in vitro* sobre *Artemia franciscana*

H<sub>1</sub>: Los once morfotipos de *Bixa orellana* L. no presentan actividad citotóxica *in vitro* sobre *Artemia franciscana*

H<sub>0</sub>: Los once morfotipos de *Bixa orellana* L. no presentan actividad antiinflamatoria *in vitro* mediante protección de membrana plasmática en glóbulos rojos humanos.

H<sub>2</sub>: Los once morfotipos de *Bixa orellana* L. presentan actividad antiinflamatoria *in vitro* mediante protección de membrana plasmática en glóbulos rojos humanos.

## 2.4. VARIABLES.

### 2.4.1. Variable independiente.

Extractos acuosos liofilizados de las hojas de once morfotipos de *Bixa orellana* L.

Indicador:

Nivel de Concentración.

### 2.4.2. Variable dependiente.

a) Actividad citotóxica.

b) Actividad antiinflamatoria en las dosis ensayadas.

Indicador:

CL<sub>50</sub>.

% de inhibición antiinflamatoria, IC<sub>50</sub>.

Clasificación de toxicidad según CYTED <sup>(15)</sup>

GRUPO	CATEGORIA	ESCALA (ug/mL)
I	Extremadamente tóxico	1 – 10
II	Altamente tóxico	10 – 100
III	Moderadamente tóxico	100 – 500
IV	Ligeramente tóxico	500 – 1000
V	Prácticamente no tóxico	1000 – 1500
VI	Relativamente inocuo	>1500

Fuente: Journal Ethnopharmacol. 2011 September 1; 137(1): 121–140.  
doi:10.1016/j.jep.2011.04.071.



## 2.5. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES.

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA
Extracto acuoso liofilizado de las hojas de once morfotipos de <i>Bixa orellana</i> L.	Liofilizados de especies de diversos compuestos químicos, obtenido por cocción, congelado y conservado.	Extracción por cocción de la parte vegetal con agua a 60-100°C durante 72hrs. Posteriormente filtrado, concentrado a 60-70°C, congelado (1 día a -22°C) para finalmente liofilizar por 72 horas (-40°C, 1.33x10 <sup>-3</sup> MBARR/120 horas).	Dosis de extractos: 10 mg/mL 15 mg/mL  Concentraciones: 1ppm, 10ppm, 100ppm, 1000ppm	Con Actividad Sin Actividad  Con Actividad Sin Actividad	Racional Tipo : Cuantitativo

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA
Actividad citotóxica <i>in vitro</i> sobre <i>Artemia franciscana</i>	Ensayo donde se puede evaluar la citotoxicidad de un tratamiento, en términos de concentraciones letales (CL <sub>50</sub> ).	Ensayos empleados para determinar la potencial citotoxicidad que presentan los extractos de las especies vegetales sobre los nauplios de <i>Artemia franciscana</i> ., con la finalidad de conocer la concentración que producirá un efecto tóxico en el 50% de la especie en experimentación y visualizar la relación riesgo-beneficio que implicará el uso de estos extractos vegetales como alternativa medicinal.	Concentración letal (CL <sub>50</sub> ).	Citotóxico: 1 – 1000 ug/mL.  No citotóxico: >1000 ug/mL.	Racional.  Tipo:  Cuantitativo

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA
Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> mediante protección de membrana plasmática en eritrocitos de seres humanos	Ensayo donde se puede evaluar la actividad antiinflamatoria de un tratamiento, en términos de porcentaje de inhibición antiinflamatoria e IC <sub>50</sub> .	Ensayos empleados para determinar el potencial antiinflamatorio que presentan los extractos de las especies vegetales de los once morfotipos de <i>Bixa orellana</i> L. con la finalidad de conocer la concentración que producirá un porcentaje de inhibición antiinflamatoria satisfactoria e IC <sub>50</sub> ; y así visualizar la relación riesgo-beneficio que implicará el uso de estos extractos vegetales como alternativa medicinal.	% de inhibición antiinflamatoria  IC <sub>50</sub>	%  mg/mL	Racional.  Tipo: Cuantitativo

## CAPÍTULO III

### METODOLOGÍA

#### 3.1. TIPO DE ESTUDIO.

- Experimental: porque se realizó comparaciones de la variable dependiente entre los grupos experimentales y del control positivo.
- Analítico: porque presentó dos variables (bivariado), además planteó y puso a prueba una hipótesis.

#### 3.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.

ETAPA	PROCEDIMIENTO
I Etapa	Certificación de la especie vegetal
II Etapa	Preparación de la muestra: Acondicionamiento: limpieza, secado y molienda de hojuelas
III Etapa	Preparación del extracto acuoso.
IV Etapa	Liofilizado.

#### 3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA.

##### 3.3.1. Población animal.

Se utilizaron nauplios de *Artemia franciscana*.

##### 3.3.2. Muestra animal.

Se utilizaron quistes de *Artemia franciscana* que después de un proceso de eclosión se convirtieron a nauplios.

Criterios de Inclusión:

Nauplios viables de *Artemia franciscana*. Quistes que después de un proceso de eclosión llegaron a nauplios.

Criterios de exclusión:

Quistes que después de un proceso de eclosión no llegaron a la etapa de nauplios.

### 3.3.3. Muestra vegetal.

*B. orellana* L. reportado del jardín botánico de la Facultad de Agronomía-Zungarococha UNAP, que tiene como uso étnico sus actividades antiinflamatorias, citotóxicas, etc.

Criterios de Inclusión:

- Material vegetal identificado y georeferenciado.
- Material vegetal en buen estado de conservación. Las hojas grandes y enteras, no presentaron ningún tipo de mancha ni microorganismo.

### 3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Certificación Taxonómica de la especie vegetal. Se realizó en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de Amazonia Peruana – UNAP, el mismo que otorgó una constancia con su respectivo código de identificación.

#### 3.4.1. Actividad citotóxica.

Animales de Experimentación. huevos de *Artemia franciscana*, que luego de un proceso de eclosión se convirtieron a nauplios.

#### **A. Condiciones de mantenimiento de los camarones de experimentación:**

En un vaso precipitado de vidrio de 600mL, se preparó una solución de Instant Ocean 3% disolviendo 15 gramos de sal de IO (Instant Ocean) en 500 mL de agua destilada. De esta solución preparada, se extrajo 30 mL de solución IO 3%. Se agregaron 0,1g de quistes de *Artemia franciscana* y se dejó en reposo por un lapso de 15 minutos (proceso importante para poder descartar los quistes inviables). Luego, se agregó 370 mL de solución de IO para su hidratación a temperatura 25°C por 1 hora. Después, se colocó un pelele acuario (motor que es el encargado de dar aireación) en el vaso precipitado para la aireación (utilizar cinta adhesiva para fijar y cubrir con un papel de aluminio el recipiente), se colocó dos lámparas pequeñas de 20W a menos de 5 cm de cada lado del

frasco para una iluminación uniforme. Incubación a temperatura 25°C por 48 horas <sup>(25,26)</sup>.

Las condiciones ambientales para los quistes de experimentación, fueron monitoreadas mediante un medidor de temperatura en el laboratorio entre 22 y 29° C, la iluminación fue permanente con dos lámparas de 20W.

### **B. Tratamiento y evaluación de grupos experimentales:**

Apagar el peleele y una de las lámparas de luz de manera que los nauplios se congregaron para el lado iluminado del vaso precipitado. Después, se etiquetó los tubos de ensayos; colocando 06 columnas de tubos de ensayos etiquetados: A, B, C, D, E y F respectivamente. Cada columna, tuvo tres filas de tubos. Tubos A1-A3, B1-B3, C1-C3 y D1-D3 contenieron los nauplios con el extracto a evaluar (son los grupos experimentales). Los tubos de ensayos E1 – E3 fueron controles negativos con sólo el nauplio y solución IO agregada; los tubos de ensayos F1 – F3 fueron controles positivos en el que se añadieron 100 ppm de  $K_2Cr_2O_7$ . Luego, se preparó la solución madre de extracto a evaluar en una concentración de 10 mg/mL, siendo un extracto esterilizado purificado; se preparará a partir de ella, concentraciones de 1 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,01 mg/mL y 0,001 mg/mL. Cada concentración preparada, fue por triplicado y depositado a cada tubo de ensayo (6 mL). En los tubos de ensayo E1 – E3 se añadieron 5 mL de solución I.O 3% para los controles negativos y en los tubos de ensayo F1 – F3 se añadieron 5 mL de solución de  $K_2Cr_2O_7$  en una concentración de 100ppm para los controles positivos. Para todos los tubos de ensayos, se pipetearon del vaso de precipitado 10 nauplios y se colocaron en cada tubo de ensayo, posteriormente se cubrió con papel de aluminio (a todos los tubos de ensayo) y se colocó las lámparas de 20W a ambos costado durante 24 horas.

### **C. Determinación cuantitativa de supervivencia de nauplios:**

Estos, fueron contados después de 24 horas de exposición al extracto evaluado. Se transfirió el contenido de todos los tubos de ensayo (de uno en uno) a un pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 12 pocillos, después se enjuagó el tubo con una pequeña cantidad de agua para asegurar que todos los camarones fueron transferidos. Se contó los nauplios bajo un equipo de video de alta

resolución, registrando así cantidades de nauplios muertos y vivos por separado. Moribundo (gravemente enfermo y a punto de morir o extremadamente letárgico) todavía se consideró vivo.

Se registró el número de camarones vivos y muertos en la hoja de datos y el cálculo de la diferencia de la cantidad inicial de camarones añadido, se repitió este procedimiento para todos los tubos de ensayo, la eliminación de los contenidos del pozo cada vez. Se enjuagó bien con la solución IO y después se limpió con una peseta cada tubo de ensayo.

#### **D. Procesamiento de la información:**

Los resultados medios de la mortalidad de los nauplios de salmuera se representaron frente a los logaritmos de las concentraciones utilizando la herramienta de Análisis Probit del software estadístico SPSS, de la que la mediana letal concentración ( $CL_{50}$ ) en intervalos de confianza del 95% (IC) se calculó con el método de Finney (1971) <sup>(27,28)</sup>. La actividad biológica usando el ensayo del camarón de salmuera se registró como la concentración cuando el 50% de los nauplios murieron dentro de las 24 h de contacto con el extracto evaluado. Los valores  $CL_{50}$  de 1 – 10  $\mu\text{g/mL}$  (extremadamente tóxico); 10 – 100  $\mu\text{g/mL}$  (altamente tóxico); 100 – 500  $\mu\text{g/mL}$  (moderadamente tóxico); 500 – 1000  $\mu\text{g/mL}$  (ligeramente tóxico); 1000 – 1500  $\mu\text{g/mL}$  (prácticamente no tóxico) y > 1500  $\mu\text{g/mL}$  (relativamente inocuo) según Clasificación de toxicidad CYTED.

### **3.4.2. Actividad Antiinflamatoria.**

#### **A. Solución de Glóbulos Rojos Humanos:**

Se extrajo 20 mL de sangre venosa a una persona sana y que no recibió tratamiento alguno con ningún medicamento (por lo menos 15 días antes del ensayo). De la sangre extraída, se colocó 5mL en 4 tubos de ensayo y se mezcló con igual volumen de solución de Alsever estéril (2% dextrosa, 0,8% citrato de sodio, 0,05% ácido cítrico y 0,42% cloruro de sodio en agua). Se homogenizó por inmersión. La sangre se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos. Concluido este proceso, se descartó el sobrenadante (suero) y la fibrina (proteína). El plasma obtenido se lavó con ClNa 0,9% (pH 7,2) y se centrifugó a

3000 rpm por 15 minutos (repetir este proceso 3 veces). Con el paquete celular (plasma) se preparó una solución al 10% v/v con CNa 0,9% para obtener una solución de glóbulos rojos, y se almacenó a una temperatura de 2 – 8° C.

### **B. Preparación del tubo de experimentación:**

La mezcla a ensayar ha contenido 0,5 mL del extracto liofilizado de hojas de *Bixa Orellana* L. a diferentes concentraciones en varios tubos (por ejemplo: 1000, 100, 10, 1  $\mu\text{g/mL}$ ), con 0,2mL de Buffer fosfato (0,15 M, pH 7,4), 3,8mL de solución hiposalina (0,36%) y 0,5 mL de la suspensión de glóbulos rojos.

Se utilizó hidrocortisona como fármaco de referencia 250 mg/mL en la evaluación de actividad.

A otro tubo se agregó 4,3ml de solución hiposalina, con 0,2 mL de Buffer fosfato (0,15M, pH 7,4) y 0,5 mL de la suspensión de glóbulos rojos, el cual fue el estándar.

A otro tubo de ensayo se le agregó 4mL de solución isosalina, 0,5 mL del extracto liofilizado de hojas de *Bixa Orellana* L. y 0,5 mL de la suspensión de glóbulos rojos, el cual fue el blanco.

A otro tubo se le agregó 4mL de solución isosalina, 0,5 mL de la muestra (sol. isosalina) y 0,5 mL de la suspensión de glóbulos rojos, el cual fue el blanco del estandar.

Cada concentración se repite por triplicado.

Todos los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 10 min y fueron centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos.

La hemoglobina contenida en la solución sobrenadante fue valorada en el espectrofotómetro a 540 nm

El indicador que se evaluó en el ensayo será el porcentaje de hemólisis, que se calculó asumiendo que la hemólisis producida por el agua destilada es 100%.

El porcentaje de protección de la membrana de glóbulos rojos se calculó usando la siguiente expresión <sup>(29)</sup>:

$$\text{Proteccion (\%)} = 100 - \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} \times 100$$



### **3.4.3. Preparación de los extractos acuosos liofilizados.**

Los extractos fueron preparados siguiendo el estudio realizado por Aranda-Ventura 2014 – 2016. Se utilizó las hojas de once morfotipos de *Bixa orellana* L., las cuales fueron limpiadas, cortadas y acondicionadas en el cuarto de secado a temperatura entre 35 - 40°C y se utilizó un equipo deshumidificador durante 6 días. Los trozos de las hojas, previo molido se sometieron al proceso de cocción, llevándose a sequedad las  $\frac{3}{4}$  partes del contenido de agua a temperatura de 60 a 70°C, para su filtración y congelación posterior, en el equipo Shell Frezer a temperatura de -35°C. El producto congelado se llevó a liofilizar a una temperatura de -40°C con una presión de  $1,33 \times 10^{-3}$  MBARR durante 48 horas.

### **3.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS.**

Los nauplios de *Artemia franciscana* que fueron utilizados, no causaron ninguna alteración en su ecosistema, ni en su existencia como especie, ya que son de rápida reproducción.

La recolección de hojas de *B. Orellana* L. no causó ningún daño en su existencia como especie, ya que solo se utilizó en cantidades mínimas (100 g) por cada morfotipo.

## CAPITULO IV

### 4.1. RESULTADOS

#### 4.1.1. Actividad citotóxica

**Tabla 1.** Cantidad de nauplios inyectados.

Muestra	Extracto acuoso liofilizado de <i>Bixa orellana</i> L.											
	0,01 mg/mL		0,1 mg/mL		1 mg/mL		10 mg/mL		I.O 3% (-)		K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 100 ppm (+)	
<b>M1</b>												
1° réplica A	A <sub>1</sub>	30	B <sub>1</sub>	30	C <sub>1</sub>	30	D <sub>1</sub>	30	E <sub>1</sub>	30	F <sub>1</sub>	30
2° réplica B	A <sub>2</sub>	30	B <sub>2</sub>	30	C <sub>2</sub>	30	D <sub>2</sub>	30	E <sub>2</sub>	30	F <sub>2</sub>	30
3° réplica C	A <sub>3</sub>	30	B <sub>3</sub>	30	C <sub>3</sub>	30	D <sub>3</sub>	30	E <sub>3</sub>	30	F <sub>3</sub>	30
TOTALES		90		90		90		90		90		90
<b>M2</b>												
1° réplica A	A <sub>1</sub>	30	B <sub>1</sub>	30	C <sub>1</sub>	30	D <sub>1</sub>	30	E <sub>1</sub>	30	F <sub>1</sub>	30
2° réplica B	A <sub>2</sub>	30	B <sub>2</sub>	30	C <sub>2</sub>	30	D <sub>2</sub>	30	E <sub>2</sub>	30	F <sub>2</sub>	30
3° réplica C	A <sub>3</sub>	30	B <sub>3</sub>	30	C <sub>3</sub>	30	D <sub>3</sub>	30	E <sub>3</sub>	30	F <sub>3</sub>	30
TOTALES		90		90		90		90		90		90
<b>M3</b>												
1° réplica A	A <sub>1</sub>	30	B <sub>1</sub>	30	C <sub>1</sub>	30	D <sub>1</sub>	30	E <sub>1</sub>	30	F <sub>1</sub>	30
2° réplica B	A <sub>2</sub>	30	B <sub>2</sub>	30	C <sub>2</sub>	30	D <sub>2</sub>	30	E <sub>2</sub>	30	F <sub>2</sub>	30
3° réplica C	A <sub>3</sub>	30	B <sub>3</sub>	30	C <sub>3</sub>	30	D <sub>3</sub>	30	E <sub>3</sub>	30	F <sub>3</sub>	30
TOTALES		90		90		90		90		90		90
<b>M4</b>												
1° réplica A	A <sub>1</sub>	30	B <sub>1</sub>	30	C <sub>1</sub>	30	D <sub>1</sub>	30	E <sub>1</sub>	30	F <sub>1</sub>	30
2° réplica B	A <sub>2</sub>	30	B <sub>2</sub>	30	C <sub>2</sub>	30	D <sub>2</sub>	30	E <sub>2</sub>	30	F <sub>2</sub>	30
3° réplica C	A <sub>3</sub>	30	B <sub>3</sub>	30	C <sub>3</sub>	30	D <sub>3</sub>	30	E <sub>3</sub>	30	F <sub>3</sub>	30
TOTALES		90		90		90		90		90		90
<b>M5</b>												
1° réplica A	A <sub>1</sub>	30	B <sub>1</sub>	30	C <sub>1</sub>	30	D <sub>1</sub>	30	E <sub>1</sub>	30	F <sub>1</sub>	30
2° réplica B	A <sub>2</sub>	30	B <sub>2</sub>	30	C <sub>2</sub>	30	D <sub>2</sub>	30	E <sub>2</sub>	30	F <sub>2</sub>	30
3° réplica C	A <sub>3</sub>	30	B <sub>3</sub>	30	C <sub>3</sub>	30	D <sub>3</sub>	30	E <sub>3</sub>	30	F <sub>3</sub>	30
TOTALES		90		90		90		90		90		90

M6

1° réplica A	A <sub>1</sub>	30	B <sub>1</sub>	30	C <sub>1</sub>	30	D <sub>1</sub>	30	E <sub>1</sub>	30	F <sub>1</sub>	30
2° réplica B	A <sub>2</sub>	30	B <sub>2</sub>	30	C <sub>2</sub>	30	D <sub>2</sub>	30	E <sub>2</sub>	30	F <sub>2</sub>	30
3° réplica C	A <sub>3</sub>	30	B <sub>3</sub>	30	C <sub>3</sub>	30	D <sub>3</sub>	30	E <sub>3</sub>	30	F <sub>3</sub>	30
TOTALES		90		90		90		90		90		90

M7

1° réplica A	A <sub>1</sub>	30	B <sub>1</sub>	30	C <sub>1</sub>	30	D <sub>1</sub>	30	E <sub>1</sub>	30	F <sub>1</sub>	30
2° réplica B	A <sub>2</sub>	30	B <sub>2</sub>	30	C <sub>2</sub>	30	D <sub>2</sub>	30	E <sub>2</sub>	30	F <sub>2</sub>	30
3° réplica C	A <sub>3</sub>	30	B <sub>3</sub>	30	C <sub>3</sub>	30	D <sub>3</sub>	30	E <sub>3</sub>	30	F <sub>3</sub>	30
TOTALES		90		90		90		90		90		90

M8

1° réplica A	A <sub>1</sub>	30	B <sub>1</sub>	30	C <sub>1</sub>	30	D <sub>1</sub>	30	E <sub>1</sub>	30	F <sub>1</sub>	30
2° réplica B	A <sub>2</sub>	30	B <sub>2</sub>	30	C <sub>2</sub>	30	D <sub>2</sub>	30	E <sub>2</sub>	30	F <sub>2</sub>	30
3° réplica C	A <sub>3</sub>	30	B <sub>3</sub>	30	C <sub>3</sub>	30	D <sub>3</sub>	30	E <sub>3</sub>	30	F <sub>3</sub>	30
TOTALES		90		90		90		90		90		90

M9

1° réplica A	A <sub>1</sub>	30	B <sub>1</sub>	30	C <sub>1</sub>	30	D <sub>1</sub>	30	E <sub>1</sub>	30	F <sub>1</sub>	30
2° réplica B	A <sub>2</sub>	30	B <sub>2</sub>	30	C <sub>2</sub>	30	D <sub>2</sub>	30	E <sub>2</sub>	30	F <sub>2</sub>	30
3° réplica C	A <sub>3</sub>	30	B <sub>3</sub>	30	C <sub>3</sub>	30	D <sub>3</sub>	30	E <sub>3</sub>	30	F <sub>3</sub>	30
TOTALES		90		90		90		90		90		90

M10

1° réplica A	A <sub>1</sub>	30	B <sub>1</sub>	30	C <sub>1</sub>	30	D <sub>1</sub>	30	E <sub>1</sub>	30	F <sub>1</sub>	30
2° réplica B	A <sub>2</sub>	30	B <sub>2</sub>	30	C <sub>2</sub>	30	D <sub>2</sub>	30	E <sub>2</sub>	30	F <sub>2</sub>	30
3° réplica C	A <sub>3</sub>	30	B <sub>3</sub>	30	C <sub>3</sub>	30	D <sub>3</sub>	30	E <sub>3</sub>	30	F <sub>3</sub>	30
TOTALES		90		90		90		90		90		90

M11

1° réplica A	A <sub>1</sub>	30	B <sub>1</sub>	30	C <sub>1</sub>	30	D <sub>1</sub>	30	E <sub>1</sub>	30	F <sub>1</sub>	30
2° réplica B	A <sub>2</sub>	30	B <sub>2</sub>	30	C <sub>2</sub>	30	D <sub>2</sub>	30	E <sub>2</sub>	30	F <sub>2</sub>	30
3° réplica C	A <sub>3</sub>	30	B <sub>3</sub>	30	C <sub>3</sub>	30	D <sub>3</sub>	30	E <sub>3</sub>	30	F <sub>3</sub>	30
TOTALES		90		90		90		90		90		90

Fuente: Realización propia

La tabla 1 muestra la cantidad de nauplios de *Artemia franciscana* inyectados en cada tubo de ensayo haciendo un total de 90 por cada una de las

concentraciones evaluadas, más su respectivo control negativo y control positivo; todas ellas evaluadas en un tiempo de 24 horas.

**Tabla 2.**Conteo de nauplios vivos y muertos de *Artemia franciscana* en las disoluciones

Morfotipo	Repeticiones	Total Nauplios de <i>Artemia</i>	Concentraciones								I.O. 3% (-)	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (100 ppm)			
			0,001 mg/mL		0,01 mg/mL		0,1 mg/mL		1 mg/mL			V		M	
			V	M	V	M	V	M	V	M		V	M	V	M
M1	A1, A2, A3	90	90	0	90	0	72	18	79	11	90	0	0	90	
M2	A1, A2, A3	90	90	0	86	4	86	4	85	5	90	0	0	90	
M3	A1, A2, A3	90	90	0	84	6	80	10	30	60	90	0	0	90	
M4	A1, A2, A3	90	90	0	85	5	85	5	85	5	90	0	0	90	
M5	A1, A2, A3	90	90	0	89	1	90	0	59	31	90	0	0	90	
M6	A1, A2, A3	90	90	0	90	0	89	1	27	63	90	0	0	90	
M7	A1, A2, A3	90	90	0	90	0	85	5	66	24	90	0	0	90	
M8	A1, A2, A3	90	90	0	90	0	89	1	83	7	90	0	0	90	
M9	A1, A2, A3	90	90	0	86	4	86	4	87	3	90	0	0	90	
M10	A1, A2, A3	90	90	0	88	2	81	9	53	37	90	0	0	90	
M11	A1, A2, A3	90	90	0	87	3	84	6	86	4	90	0	0	90	

Fuente: Realización propia

La tabla 2 muestra la cantidad de nauplios vivos y muertos después de 24 horas expuestas al extracto por cada una de las concentraciones evaluadas.

**Tabla 3.** Cálculo de la CL<sub>50</sub> a partir de la ecuación lineal, obtenida vía análisis Probit

Morfotipo	Ecuación	R <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub> (mg/mL)
M1	y = 0,2264x + 0,1715	0,9295	<b>2,12</b>
M2	y = 0,0879x + 2,8421	0,9309	<b>1,64</b>
M3	y = 0,0314x + 3,3531	0,9919	<b>2,81</b>
M4	y = 0,621x + 2E-15	1,0000	<b>1370,25</b>
M5	y = 0,1108x + 0,8305	0,7118	<b>4,27</b>
M6	y = 0,0716x + 0,8543	0,8065	<b>7,94</b>
M7	y = 0,1515x + 0,7397	0,7003	<b>1,32</b>
M8	y = 0,4045x + 0,6662	0,6719	<b>5,13</b>
M9	y = 0.7455x + 0.1270	0,9551	<b>3,47</b>
M10	y = 0.0806x + 1.7859	0,5594	<b>7,59</b>
M11	y = 0.5442x + 0.5073	0,8325	<b>1,82</b>

Fuente: Elaboración propia

La tabla 3, muestra el valor de CL<sub>50</sub> de los once morfotipos de hojas de *Bixa orellana* L. donde todos los valores están por encima de 1000 µg/mL.

#### 4.1.2. Actividad antiinflamatoria.

**Tabla 4.** Cálculo del % inhibición antiinflamatoria

Especie vegetal <i>Bixa orellana</i> L.	Parte usada	% INH ANTIINFLAMATORIA				Λ
		1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	1000 µg/mL	
MORFOTIPO 1	Hojas	27.67	35.70	41.97	70.70	540 nm
MORFOTIPO 2	Hojas	24.01	27.98	32.53	66.01	
MORFOTIPO 3	Hojas	26.53	28.23	35.52	71.88	
MORFOTIPO 4	Hojas	22.99	27.62	29.94	67.36	
MORFOTIPO 5	Hojas	53.42	57.55	60.10	79.60	
MORFOTIPO 6	Hojas	55.68	56.57	65.27	86.14	
MORFOTIPO 7	Hojas	55.98	56.21	62.14	76.89	
MORFOTIPO 8	Hojas	47.40	48.68	51.81	56.48	
MORFOTIPO 9	Hojas	53.71	59.97	66.73	68.98	
MORFOTIPO 10	Hojas	53.59	56.14	61.66	65.47	
MORFOTIPO 11	Hojas	53.91	57.18	65.44	66.88	
<b>Hidrocortisona</b>		59.35	61.41	64.59	78.79	

Fuente: Elaboración propia

Tabla 4, muestra el porcentaje de inhibición antiinflamatoria a las diferentes concentraciones evaluadas.

**Tabla 5.** Cálculo de la IC<sub>50</sub> de los once morfotipos de *Bixa orellana* L y de la Hidrocortisona

Especie vegetal <i>Bixa orellana</i> L.	Ecuación	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub>
Morfotipo 1	$y = 5.8789\ln(x) + 23.704$	0,8703	<b>87.61</b>
Morfotipo 2	$y = 5.6699\ln(x) + 18.048$	0,7677	<b>280.16</b>
Morfotipo 3	$y = 6.2257\ln(x) + 19.04$	0,7581	<b>144.45</b>
Morfotipo 4	$y = 5.8816\ln(x) + 16.663$	0,7302	<b>289.46</b>
Morfotipo 5	$y = 3.5219\ln(x) + 50.503$	0,8120	<b>0.87</b>
Morfotipo 6	$y = 4.3471\ln(x) + 50.903$	0,8327	<b>0.81</b>
Morfotipo 7	$y = 2.9815\ln(x) + 52.506$	0,8157	<b>0.43</b>
Morfotipo 8	$y = 1.3196\ln(x) + 46.533$	0,9410	<b>13.84</b>
Morfotipo 9	$y = 2.2834\ln(x) + 54.461$	0,9632	<b>0.14</b>
Morfotipo 10	$y = 1.7868\ln(x) + 53.044$	0,9828	<b>0.18</b>
Morfotipo 11	$y = 2.0473\ln(x) + 53.783$	0,9344	<b>0.16</b>
Hidrocortisona	$y = 2.6714\ln(x) + 56.808$	0,8195	<b>0.08</b>

Fuente: Elaboración propia

La tabla 5 muestra los resultados de IC<sub>50</sub> para cada una de los once morfotipos y de la Hidrocortisona.

## 4.2. DISCUSION.

Los compuestos fenólicos son importantes en los diferentes procesos de oxidación lipídica y están asociadas con la actividad antiinflamatoria (Sokmenetal.2005; Choietal. 2002)<sup>30,31</sup>, también poseen efectos inhibitorios sobre la mutagénesis y carcinogénesis en humanos cuando son incluidos en la dieta diaria a partir de productos naturales. Los ácidos fenólicos y flavonoides son reconocidos como poseedores de actividad antiinflamatoria (Pyoetal.2004)<sup>32</sup>.

En la evaluación de la citotoxicidad de extractos acuosos liofilizados de los once morfotipos de *Bixa orellana* L. sobre *Artemia franciscana*, nuestro estudio muestra valores por encima de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y esto concuerda con lo declarado por Meyer et al/1982<sup>(33)</sup>, “un valor de  $\text{CL}_{50}$  mayor a 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  no se considera bioactivo”; en sentido no presenta actividad biológica y no puede considerarse como bioactiva.

En la actividad antiinflamatoria *in vitro* mediante protección de membrana plasmática en glóbulos rojos humanos, el de mejor actividad fue el morfotipo 9 con un  $\text{IC}_{50}= 0,14 \mu\text{g}/\text{mL}$ ; seguido del morfotipo 11  $\text{IC}_{50}=0,16 \text{ mg}/\text{mL}$ ; morfotipo 10 con un  $\text{IC}_{50}= 0,18 \mu\text{g}/\text{mL}$ ; morfotipo 7 con un  $\text{IC}_{50}= 0,43 \mu\text{g}/\text{mL}$ ; morfotipo 6 con un  $\text{IC}_{50}= 0,81 \mu\text{g}/\text{mL}$  y el morfotipo 5 con un  $\text{IC}_{50}= 0,87 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

Los morfotipos 5 y morfotipo 7, no presentaron diferencias significativas en sus porcentajes de protección en comparación al uso de Hidrocortisona a una concentración de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### 4.3. CONCLUSIONES.

En función al análisis efectuado, se concluye que:

- Los hojas de los once morfotipos de *Bixa orellana* L. no muestran actividad citotóxica *in vitro* sobre nauplios de *Artemia franciscana* a las diferentes concentraciones evaluadas, ya que todas ellas presentan  $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ .
- De los once morfotipos de la especie en estudio, los que presentaron a la concentración de  $1000 \mu\text{g/mL}$  mayor porcentaje de inhibición antiinflamatoria fueron el morfotipo 6 con un 86.14; el morfotipo 5 un 79.60 y el morfotipo 7 un 76.89 respectivamente.
- En la actividad antiinflamatoria *in vitro* mediante protección de membrana plasmática en glóbulos rojos humanos, el de mejor actividad fue el morfotipo 9 con un  $IC_{50} = 0,14 \mu\text{g/mL}$ ; seguido del morfotipo 11  $IC_{50} = 0,16 \text{ mg/mL}$ ; morfotipo 10 con un  $IC_{50} = 0,18 \mu\text{g/mL}$ ; morfotipo 7 con un  $IC_{50} = 0,43 \mu\text{g/mL}$ ; morfotipo 6 con un  $IC_{50} = 0,81 \mu\text{g/mL}$  y el morfotipo 5 con un  $IC_{50} = 0,87 \mu\text{g/mL}$ .
- Los extractos acuosos liofilizados de *Bixa orellana* L. presentan actividad antiinflamatoria mediante la inhibición de la lisis de la membrana celular en glóbulos rojos. En el caso los morfotipos 9, 10 y 11, mostraron un desempeño similar al fármaco de referencia Hidrocortisona.



#### **4.4. RECOMENDACIONES.**

En relación a que seis de los once morfotipos presentan mejor actividad antiinflamatoria, es oportuno continuar su estudio de aislamiento y purificación de cada uno de los metabolitos secundarios, para poder ser formulados en un futuro como posibles fármacos de actividad antiinflamatoria.

Estudios de toxicidad crónica por administración continua a 90 días, a fin de determinar efectos carcinogénicos, a los morfotipo 9; morfotipo 11; morfotipo 10; morfotipo 7; morfotipo 6 y el morfotipo 5 respectivamente.

De aquellos morfotipos que presentaron mejores valores en  $IC_{50}$ , se recomienda cuantificarlos metabolitos secundarios para así correlacionar su actividad citotóxica y antiinflamatoria.

#### 4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kahkashan P, Najat AB, Soliman Daw. Antibacterial activity of Phoenix dactylifera L. leaf and pit extracts against selected Gram negative and Gram positive pathogenic bacteria. J Med Plants Res. 2012; 6(2): 296-300.
2. Céspedes C, Ávila J, Martínez A, Serrato B, Calderón J, Salgado R. Antifungal and antibacterial activities of Mexican Tarragon (Tagetes lucida). J Agric Food Chem. 2006; 54 (10): 3521-3527.
3. Cañas, A., Ramírez, J., Valle, A. (2003). Determinación de la bioactividad citotóxica in vitro de extractos de veinticinco especies vegetales mediante el ensayo con Artemia salina. Universidad de el salvador. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/5668/>
4. Kamau LN, Mbaabu MP, Mbaria JM, Karuri GP, Kiama SG. Knowledge and demand for medicinal plants used in the treatment and management of
5. Diabetes in Nyeri County, Kenya. J Ethnopharmacol. 2016 May 11. pii: S0378-8741(16)30294-X. doi: 10.1016/j.jep.2016.05.021. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27180316.
6. Rezaei A, Farzadfard A, Amirahmadi A, Alemi M, Khademi M. Diabetes mellitus and its management with medicinal plants: A perspective based on Iranian research. J Ethnopharmacol. 2015 Dec 4;175:567-616. doi: 10.1016/j.jep.2015.08.010. Epub 2015 Aug 14. Review. PubMed PMID:26283471.
7. José Aranda-Ventura, Jorge Villacrés Vallejo, Dora García-de Sotero, Víctor Sotero Solís, Diego Vásquez Torres, Úrsula Monteiro Temmerman, German González-Aspajo, Rosario Mego Bardales, Wiliam Vigo Alfaro, (2017). Toxicidad, Actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* del extracto

acuoso de *Juglans neotropica* Diels (nogal peruano). REVISTA PERUANA DE MEDICINA INTEGRATIVA.2016;1(4):16-24 Disponible en: <http://rpmi.pe/ojs/index.php/RPMI/article/view/37/36> Fecha de acceso: 24 Abril 2018.

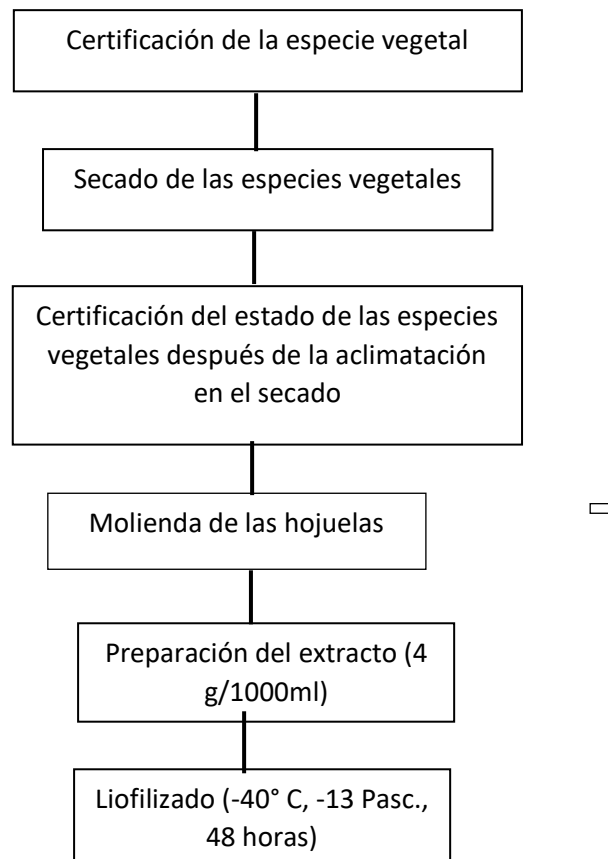
8. Cindy Tatiana Sepúlveda Rincón, Gelmy Oluz, Luz Ciro Gómez, José Edgar Zapata Montoya. Extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de hojas de *Bixa orellana* L. (achiote). Rev Cubana Plant Med vol.21 no.2 Ciudad de la Habana abr.-jun. 2016. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962016000200002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962016000200002) Fecha de acceso: 24 Abril 2018
9. Capella, S.O., Tillmann, M.T., Félix, A.O.C., Fontoura, E.G., Fernandes, C.G., Freitag, R.A., Santos, M.A.Z., Félix, S.R., & Nobre, M.O..(2016). Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68(1), 104-112. <https://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8374>
10. Avalos Soto Joaquin (2014). Actividad citotóxica y estudio fitoquímico de los extractos de semilla y hoja de neem (*azadirachta indica* a. juss) de origen regional (ébano, San Luis Potosí) comparada con la comercializada en la India. [Tesis doctorado] Universidad Autónoma de Nuevo León. 2014. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/4002/1/1080253534.pdf> Fecha de acceso: 24 Abril 2018
11. Weiss U (2002) Nature insight: Inflammation. *Nature* 420: 845. Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428-35. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)* Vol. 102, Nº. 1, pp 91-159, 2008. Disponible en: <http://www.rac.es/ficheros/doc/00681.pdf> Fecha de acceso: 02 Mayo 2018

12. Weiss U (2002) Nature insight: Inflammation. Nature 420: 845. Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. Nature 454:428-35. Disponible en: <http://www.rac.es/ficheros/doc/00681.pdf>
13. Huamán Gutiérrez, Oscar Gustavo; Sandoval Vegas, Miguel Hernán; Béjar Camarena, Elsa; Huamán Gutiérrez, Zoraida Judith; Tarazona Miranda, Víctor Hilario. Efecto de los extractos acuoso e hidroetanólico de hojas de Bixa orellana (achiote) sobre los indicadores no enzimáticos de la hepatotoxicidad por paracetamol, en ratas. An. Fac. Med. (Perú); 74(4): 279-283, (2013) Disponible en: <http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/pnc-15151?lang=es> Fecha de acceso: 7 Agosto 2018.
14. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Patología humana: Elsevier Health Sciences; 2008.
15. Espinós, D., A. López & E. Calvo. 2004. Bases farmacológicas y tratamiento de la inflamación. En: Monografía XV, Nuevos avances en medicamentos. Eds. Avendaño, C. & Tamargo, J. Real Academia Nacional de Farmacia-España., 237-286.
16. Freshney RI. 2000. Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique. Ed. Wiley-Liss: Nueva York, pp. 101,182, 309
17. Cytel-Rivaplamed. (2001). Métodos farmacológicos para la validación de plantas medicinales. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo; pág. 65-69.
18. Giuliano G; et al. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. TRENDS in Biotechnology. 2003;21(12):513-6.
19. Brack E. Diccionario Enciclopédico de plantas útiles del Perú, PNUD, Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. 1999.

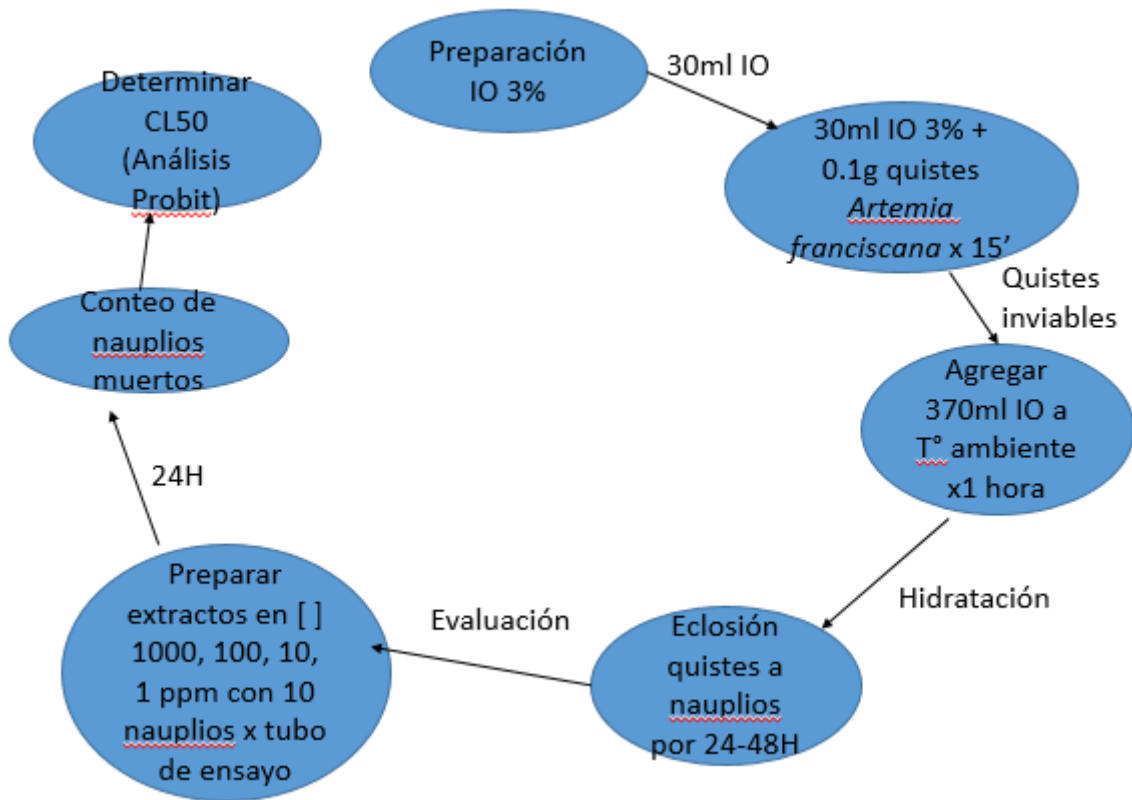
20. Nalvarte W; *et al.* Plantas amazónicas de uso medicinal, diagnóstico de un sector económico con un potencial de realización, Ciefor y Universidad Nacional Agraria la Molina Lima Perú, 1999.
21. Biltencourt C; *et al.* Characterization of thermal modifications of bixin from *Bixa orellana* fruit. *J Agric Food Chem.* 2005;53 (16):6195-200.
22. Hetzel de la C. Lourido Pérez; Gregorio Martínez Sánchez. La *Bixa orellana* L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. *Revista Cubana de Farmacia. Rev Cubana Farm v.44 n.2 Ciudad de la Habana abr.-jun. 2010* Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152010000200012](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152010000200012) Fecha de acceso: 25 Mayo 2019.
23. Rodríguez S; *et al.* Isolation and purification of RNA from tissues rich in polyphenols, polysaccharides, and pigments of annatto (*Bixa orellana* L.). *Mol Biotechnol.* 2007; 37(3):220-4.
24. Toledo de Oliveira T; *et al.* Biological properties of natural dyes. *Ars Pharmaceut.* 2004;45(1):5-20.
25. *Journal Ethnopharmacol.* (2011) September 1; 137(1): 121–140. doi:10.1016/j.jep.2011.04.071.
26. Aguirre Z; *et al* *Botanica Austroecuatorialiana*, ABYA YALA, 2002.
27. AYMÉ Fernández-Calienes Valdés, Judith Mendiola Martínez, Deyanira Acuña Rodríguez, Ramón Scull Lizama, Yamilet GUTIÉRREZ GAITÉN. Actividad antimalárica de un extracto hidroalcohólico de *Bixa orellana* L. *Rev Cubana Med Trop v.63 n.2 Ciudad de la Habana mayo.-ago. 2011* Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602011000200013](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602011000200013) Fecha de acceso: 24 Abril 2018

28. Liang P. y Macrae T. The synthesis of a small heat shock/alphacrystallin protein in *Artemia* and its relationship to stress tolerance during development. *Dev Biol*, (1999) 207:445-56. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10068475> Fecha de acceso: 30 de Abril 2018.
29. Andriolli A., Beraldo H., Santos D., Teixeira S., Teixeira L. y Ziolli R. Avaliação do potencial citotóxico de 2-piridiniformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos de Fe (III) utilizando *Artemia franciscana*. *Heal. and Environ. J.* (2007) 8: 2-10. Disponible en: [http://www.puc-rio.br/pibic/relatorio\\_resumo2007/resumos/QUI/ana\\_claudia\\_andriolli\\_danielle\\_da\\_s\\_santos\\_silvio\\_cesar\\_godinho\\_teixeira.pdf](http://www.puc-rio.br/pibic/relatorio_resumo2007/resumos/QUI/ana_claudia_andriolli_danielle_da_s_santos_silvio_cesar_godinho_teixeira.pdf)
30. Sokmen M. In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. *Life Sciences*: 76 (25), 2981-2993 (2005).
31. CHOI C.W. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison, *Plant Science*: 163, 1161-1168 (2002).
32. PYO Y.H., T.C. LEE, L. LOGENDRA Y R.T. ROSEN, Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cykla*) extracts, *Food Chem.*: 85, (19), 19-26 (2004).
33. Meyer, B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E., Mc Laughlin J.L.: Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta médica*. 45:31-4, 1982.

#### 4.6. ANEXOS.

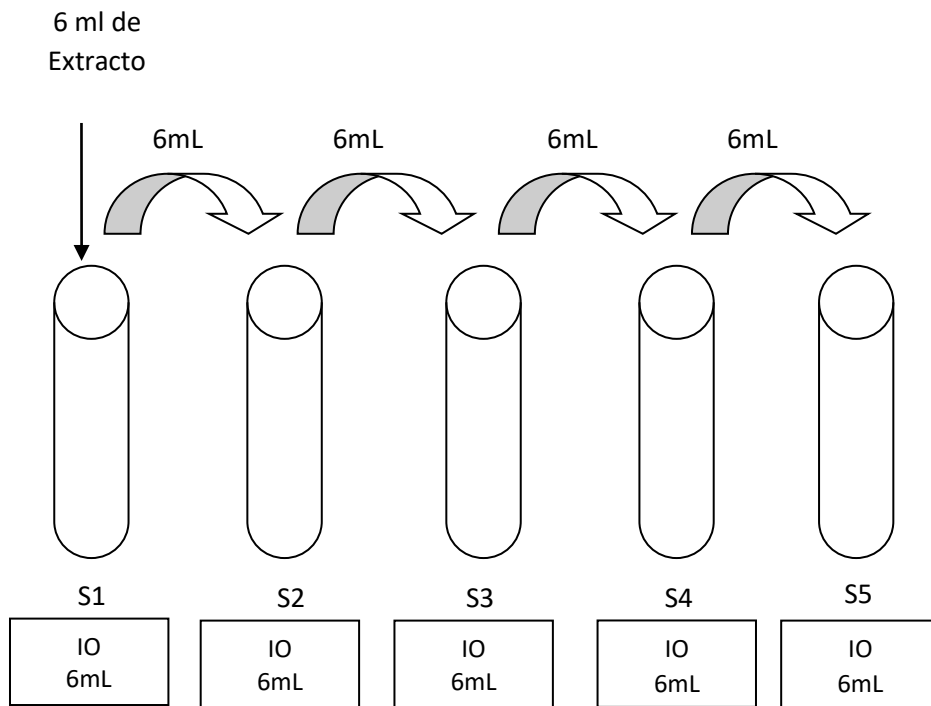


Anexo 1: Flujograma del proceso de preparación de extractos acuoso liofilizado

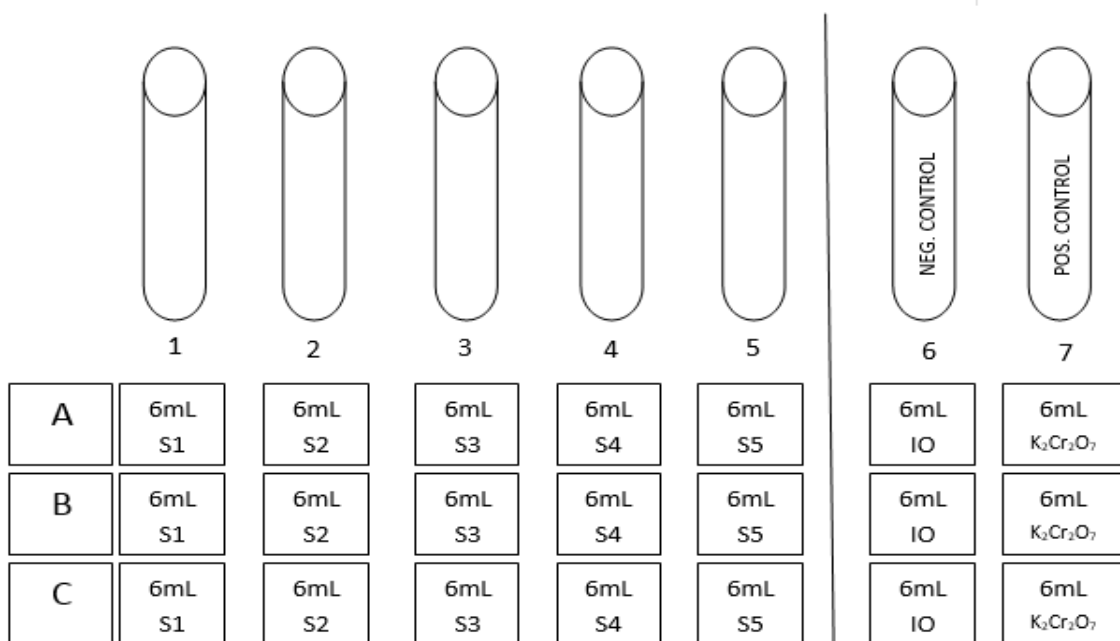


Anexo 2. Flujograma del ensayo de la actividad citotóxica





Anexo 3. Esquema de dilución del extracto para el experimento de citotoxicidad



Anexo 4. Configuración de esquema de experimento de citotoxicidad

AREA DE FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA

**HOJA DE TRABAJO**  
**ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA POR *Artemia franciscana***

**REGISTRO DE DATOS Y RESULTADOS**

FECHA:  
H. INICIO:  
H. TERMINO:

**CANTIDAD DE LARVAS INYECTADAS**

Muestra	Extracto de:					Control (-)	Control (+)
	[c]	S1	S2	S3	S4	S5	S6
repeticiones		1500	1000	500	50	10	Sol. IO 3% 400 ppm K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
1ª réplica A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
2ª réplica B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
3ª réplica C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7

**CONTEO DE LARVAS VIVAS Y MUERTAS DE *Artemia franciscana* EN LAS DISOLUCIONES**

FECHA:

Muestra	[c] ug/ml	Repeticiones	LARVAS DE <i>Artemia</i>			
			Total	Vivas	Muertas	% Letal
..... ..... ..... (Sol. IO 3%)	S1 1500 ppm	1ª repeticiónA1 2ª repeticiónB1 3ª repeticiónC1  Total				
..... ..... ..... (Sol. IO 3%)	S2 1000 ppm	1ª repeticiónA2 2ª repeticiónB2 3ª repeticiónC2  Total				
..... ..... ..... (Sol. IO 3%)	S3 500 ppm	1ª repeticiónA3 2ª repeticiónB3 3ª repeticiónC3  Total				
..... ..... ..... (Sol. IO 3%)	S4 50 ppm	1ª repeticiónA4 2ª repeticiónB4 3ª repeticiónC4  Total				
..... ..... ..... (Sol. IO 3%)	S5 10 ppm	1ª repeticiónA5 2ª repeticiónB5 3ª repeticiónC5  Total				

Anexo 5: Hoja de trabajo\_ ensayo de toxicidad por *Artemia franciscana*

CONTEO DE LARVAS VIVAS Y MUERTAS DE *Artemia franciscana* DEL CONTROL (-) Y (+)

Muestra	[c] ug/ml	Repeticiones	LARVAS DE ARTEMIA			
			Total	Vivas	Muertas	%Letal
Solución IO 3% (Control negativo)	S7	1ª Repetición A7				
		2ª Repetición B7				
		3ª Repetición C7				
		Total				
Solución K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (Control positivo)	S8 400	1ª Repetición A8				
		2ª Repetición B8				
		3ª Repetición C8				
		Total				

RESULTADOS Y CÁLCULO DE LA CL<sub>50</sub> DE LA MUESTRA FRENTE A LAS LARVAS DE *Artemia*

Muestra	[c] ug/ml	Repeticiones	LARVAS DE ARTEMIA				CL <sub>50</sub>
			Total	Vivas	Muertas	%Letal	ug/ml
(En Sol. IO 3%)	1500 ppm	total					
	1000 ppm	total					
	500 ppm	total					
	50 ppm	total					
	10 ppm	total					

Con los resultados se grafica [c] vs [% larvas vivas] y se obtiene una línea recta y se aplica la ecuación  $y=mx+b$ , se determina la pendiente (m) y el intercepto (b) y con estos datos se aplica a  $Y=50\%$  para obtener la concentración.

\* Clasificación Toxicidad según CYTED

RESULTADOS DEL CONTROL (-) Y (+) FRENTE A LAS LARVAS DE *Artemia*

Muestra	[c] ug/ml	Repeticiones	LARVAS DE ARTEMIA				CL <sub>50</sub>
			Total	Vivas	Muertas	%Letal	ug/ml
Sol. IO 3%		total					
Solución K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	400 ppm	total					

\*\* Según referencias

TABLA DE CLASIFICACIÓN DE TOXICIDAD SEGUN CYTED

GRUPO	CATEGORÍA	ESCALA (ug/ml)
I	Extremadamente tóxico	1 - 10
II	Altamente tóxico	10 - 100
III	Moderadamente tóxico	100 - 500
IV	Ligeramente tóxico	500 - 1000
V	Prácticamente no tóxico	1000 - 1500
VI	Relativamente inócuo	>1500

Anexo 6: Hoja de trabajo\_ conteo de larvas vivas / muertas de *Artemia franciscana*



UNAP

Centro de Investigación de  
Recursos Naturales  
Herbarium Amazonense — AMAZ

INSTITUCIÓN CIENTÍFICA NACIONAL DEPOSITARIA DE MATERIAL BIOLÓGICO  
CÓDIGO DE AUTORIZACIÓN AUT-ICND-2017-005

### CONSTANCIA N.º 14-2019-AMAZ-UNAP

El Coordinador del Herbarium Amazonense (AMAZ) del CIRNA, de La Universidad Nacional De La Amazonia Peruana

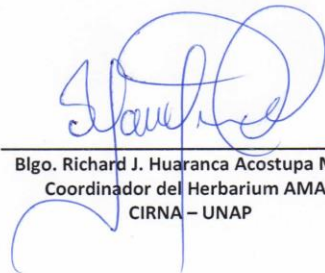
#### HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentada por **JORGE YSAAC VILLACREZ VALLEJO**, investigador de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana pertenece al proyecto titulado: **"Obtención de morfotipos promisorios de *Bixa orellana* L. "achiote" en base a estudios integrados para la producción de colorantes y biomasa, Iquitos - Perú"** ha sido **DETERMINADA** en este centro de investigación y enseñanza **Herbarium Amazonense-AMAZ-CIRNA-UNAP**, como se indica a continuación:

Nº	CÓDIGO AMAZ	FAMILIA	ESPECIE	Nombre común
01	000129	BIXACEAE	<i>Bixa orellana</i> L.	"achiote"

A los seis días del mes de junio del dos mil diecinueve, se expide la presente constancia al interesado para los fines que se estime conveniente.

Atentamente,



Blgo. Richard J. Huaranca Acostupa M.Sc.  
Coordinador del Herbarium AMAZ  
CIRNA – UNAP



Anexo 7: Constancia de certificación de la especie vegetal.