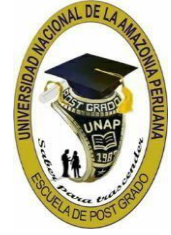




UNAP



**FACULTAD DE ENFERMERIA
MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**ESTUDIO TÓXICOLÓGICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
HOJAS DE *Calathea lutea***

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN SALUD
PÚBLICA**

**PRESENTADO POR: CLAUDIO ADRIANO APAGÜEÑO ARÉVALO
DARWIN LUCIANO TAMANI GUERRA**

**ASESORES: Ing. REYNA GLADYS CÁRDENAS VDA. DE REÁTEGUI, Dra.
Lic. Enf. RUTH VÍLCHEZ RAMÍREZ, Mgr.**

IQUITOS, PERÚ

2020



UNAP



**FACULTAD DE ENFERMERIA
MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**ESTUDIO TÓXICOLÓGICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
HOJAS DE *Calathea lutea***

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN SALUD
PÚBLICA**

**PRESENTADO POR: CLAUDIO ADRIANO APAGÜEÑO ARÉVALO
DARWIN LUCIANO TAMANI GUERRA**

**ASESORES: Ing. REYNA GLADYS CÁRDENAS VDA. DE REÁTEGUI, Dra.
Lic. ENF. RUTH VÍLCHEZ RAMÍREZ, Mgr.**

IQUITOS, PERÚ

2020



UNAP

Escuela de Postgrado "JOSÉ TORRES VÁSQUEZ"
Oficina de Asuntos Académicos



ACTA DE SUSTENTACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
023-2020-OAA-EPG-UNAP

Con **Resolución Directoral N° 0486-2020-EPG-UNAP**, se autoriza la sustentación del Trabajo de Investigación: "ESTUDIO TOXICOLÓGICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE HOJAS DE *Calathea lutea*", teniendo como jurados a los siguientes profesionales:

Q.F. Luis Domingo Nonato Ramírez, Dr.	Presidente
Q.F. Rosa del Carmen Miluska Vargas Rodríguez, Dra.	Miembro
Q.F. Ivonne Navarro del Águila, Mgr.	Miembro
Lic. Enf. Ruth Vilchez Ramirez, Mgr.	Asesora
Ing. Reyna Gladys Cárdenas Vda. de Reátegui, Dra.	Asesora

A los doce días del mes de noviembre del 2020, a las 16:00 horas., en la modalidad virtual zoom institucional de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, se constituyó el Jurado Evaluador y dictaminador, para escuchar y evaluar el Trabajo de Investigación: "ESTUDIO TOXICOLÓGICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE HOJAS DE *Calathea lutea*" presentado por los señores CLAUDIO ADRIANO APAGÚEÑO AREVALO y DARWIN LUCIANO TAMANI GUERRA, como requisito para obtener el **Grado Académico de Maestro en Salud Pública**, que otorga la UNAP de acuerdo a la Ley Universitaria N° 30220 y el Estatuto de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.

Después de haber escuchado la sustentación y luego de formuladas las preguntas, éstas fueron:

RESPONDIDAS ADECUADAMENTE

El Jurado, después de la deliberación correspondiente en privado, llegó a las siguientes conclusiones, la sustentación es:

1.° Aprobado como: a) Excelente () b) Muy bueno () c) Bueno ()

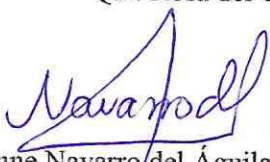
2. Desaprobado: ()

Observaciones : NINGUNO

A Continuación, el Presidente del Jurado, da por concluida la sustentación, siendo las 5:15 pm del doce de noviembre del 2020; con lo cual, se le declara a los sustentantes APTOS para recibir el **Grado Académico de Maestro en Salud Pública**.


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


Q.F. Rosa del Carmen Miluska Vargas Rodríguez, Dra.
Miembro

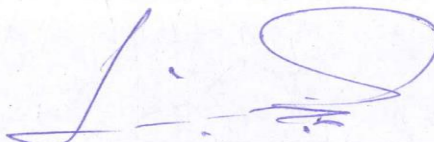

Q.F. Ivonne Navarro del Águila, Mgr
Miembro


Lic. Enf. Ruth Vilchez Ramirez, Mgr.
Asesora



Ing. Reyna Gladys Cárdenas Vda. de Reátegui, Dra.
Asesora

JURADO

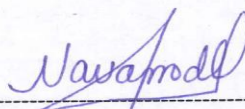
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN APROBADO EN SUSTENTACIÓN PÚBLICA EL DÍA 12 DEL MES DE NOVIEMBRE DEL AÑO 2020, EN LA MODALIDAD VIRTUAL, POR LA PLATAFORMA VIRTUAL ZOOM INSTITUCIONAL, DE LA ESCUELA DE POSTGRADO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA, EN LA CIUDAD DE IQUITOS – PERÚ.



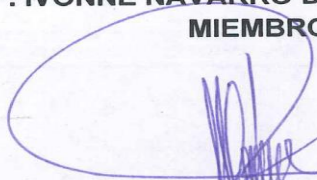
**Q.F. LUIS DOMINGO NONATO RAMÍREZ, Dr.
PRESIDENTE**



**Q.F. ROSA DEL CARMEN MILUSKA VARGAS RODRÍGUEZ, Dra.
MIEMBRO**



**Q.F. IVONNE NAVARRO DEL ÁGUILA, Mgr.
MIEMBRO**



**ING. REYNA GLADYS CÁRDENAS VDA. DE RÉATEGUI, Dra.
ASESORA**



**LIC. ENF. RUTH VÍLCHEZ RAMÍREZ, Mgr.
ASESORA**

A Dios y mis padres mayor fuente de inspiración
Todos los logros no serían posibles sin ustedes

Claudio Adriano

A mi familia, por motivarme en alcanzar este logro
Esto no sería posible sin ustedes

Darwin Luciano

AGRADECIMIENTO

Agradecemos en primer lugar a Dios por la vida y la salud, por las bendiciones e iluminarnos en cumplir nuestro objetivo.

A la facultad de Farmacia y Bioquímica y Facultad de Industrias Alimentarias por facilitarnos los ambientes para desarrollar parte del proyecto de investigación.

Agradecemos el apoyo y dedicación a nuestras orientadoras Dra. Reyna Gladys Cárdenas de Reátegui y Mgr. Ruth Vílchez Navarro por haber compartido con nosotros sus conocimientos y sobre todo su amistad.

Del mismo modo agradecemos al Lic. Alexander Javier Iman Torres por el apoyo incondicional en el desarrollo de la investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	PÁGINAS
CARATULA	i
CONTRACARATULA	ii
ACTA DE SUSTENTACIÓN	iii
JURADO	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I: MARCO TEÓRICO	3
1.1 Antecedentes	3
1.2 Bases teóricas	5
1.3 Definición de términos básicos	16
CAPÍTULO II: VARIABLES E HIPÓTESIS	17
2.1 Variables y su operacionalización	17
2.2 Formulación de hipótesis	19
CAPITULO III: METODOLOGÍA	20
3.1 Tipo y diseño de la investigación.	20
3.2 Población y muestra.	21
3.3 Técnicas e instrumentos	23
3.4 Procedimientos de recolección de datos	24
3.5 Técnicas de procesamiento y análisis de datos	29
3.6 Aspectos éticos	30
CAPITULO IV: RESULTADOS	31

CAPITULO V: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	45
CAPITULO VI: PROPUESTA	47
CAPITULO VII: CONCLUSIONES	48
CAPITULO VIII: RECOMENDACIONES	49
CAPITULO IX: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	50
ANEXOS	
1. Instrumentos de recolección de datos	

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINAS
Tabla N° 1: Rendimiento del extracto acuoso de <i>Calathea lutea</i> .	32
Tabla N° 2: Peso promedio de los ratones durante la experimentación.	33
Tabla N° 3: Observaciones macroscópicas de órganos blancos asociados a las acciones del agente Órgano/Sistema	34
Tabla N° 4: Observación macroscópica de los órganos de los ratones.	35
Tabla N° 5: Actividad antibacteriana del extracto acuoso de las hojas de <i>Calathea lutea</i> "Bijao" frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	44
Tabla N° 6: Actividad antibacteriana de los controles positivos meropenem 10 µg, ciprofloxacino 5 µg, gentamicina 10 µg y vancomicina 30 µg frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	45

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINAS
Figura N° 1: <i>Calathea lutea</i>	5
Figura N° 2: Resultados del estudio histopatológico del hígado a concentración de 2000 mg/kg de extracto de <i>Calathea lutea</i> .	36
Figura N° 3: Resultados del estudio histopatológico del riñón a concentración de 2000 mg/kg de extracto de <i>Calathea lutea</i> .	37
Figura N° 4: Resultados del estudio histopatológico del hígado a concentración de 25 mg/kg de extracto de <i>Calathea lutea</i> .	38
Figura N° 5: Resultados del estudio histopatológico del riñón a concentración de 25 mg/kg de extracto de <i>Calathea lutea</i> .	39
Figura N° 6: Resultados del estudio histopatológico del hígado a concentración de 200 mg/kg de extracto de <i>Calathea lutea</i> .	40
Figura N° 7: Resultados del estudio histopatológico del riñón a concentración de 200 mg/kg de extracto de <i>Calathea lutea</i> .	41
Figura N° 8: Resultados del estudio histopatológico del hígado	42
Figura N° 9: Resultados del estudio histopatológico del riñón	43

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar y determinar la toxicidad y la actividad antibacteriana del extracto acuoso de las hojas de *Calathea lutea* "Bijao"; para desarrollar la investigación se utilizó hojas de *C. lutea* "Bijao" que fueron recolectadas en el distrito de Indiana. Se realizó un estudio experimental, prospectivo y longitudinal. Para determinar la toxicidad se utilizó el método de Clases Tóxicas Agudas, descrito por la Normativa N°423 de la OECD, en el cual se realizaron pruebas en ratones albinos a dosis de 2000 mg/kg PC, 200 mg/kg PC y 25 mg/kg PC durante 14 días, en esta prueba se utilizaron: el extracto acuoso de *C. lutea* "Bijao" y ratones albinos *Mus musculus* balb/C del sexo macho, fueron asignados 12 ratones aleatoriamente con peso promedio de 28,7 g y divididos en 4 grupos: 1 grupo control negativo y 3 grupos experimentales; se administró por vía oral, previo ayuno de 12 horas a dosis única y se registró el peso corporal de los ratones el día cero, siete y catorce, según los resultados del extracto acuoso de hojas de *C. lutea* "Bijao" no tiene efecto tóxico o nocivos en los animales de experimentación, en la observación macroscópica de los órganos no se presentó alteración alguna. Con respecto a la actividad biológica se utilizó el método de difusión en agar o disco frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se utilizaron como controles positivos los antibióticos meropenem, ciprofloxacino, gentamicina y vancomicina, obteniendo resultados que, a concentraciones de 1300 mg/mL, 1500 mg/mL, y 1700 mg/mL del extracto acuoso de las hojas de *C. lutea* no presenta actividad biológica frente a las bacterias en mención.

Palabras claves: *Calathea lutea*, Actividad biológica, Toxicidad.

ABSTRACT

The present work aimed to evaluate and determine the toxicity and antibacterial activity of the aqueous extract of the leaves of *Calathea lutea* "Bijao"; *C. lutea* "Bijao" leaves were used to develop the research and were collected in the Indiana district. An experimental, prospective cross-sectional study was conducted. To determine the toxicity, the Acute Toxic Classes method was used, described by OECD Standard No. 423, in which tests were performed on albino mice at a dose of 2000 mg/kg CP, 200 mg/kg CP and 25 mg/kg PC for 14 days, in this test were used: the aqueous extract of *C. lutea* "Bijao" and albino mice *Mus musculus* balb/C of the male sex, 12 mice were randomly assigned with an average weight of 28.7 g and divided into 4 groups: 1 negative control group and 3 experimental groups; it was administered orally, after fasting for 12 hours at a single dose and the body weight of the mice was recorded on day zero, seven and fourteen, according to the results of the aqueous extract of *C. lutea* leaves "Bijao" has no toxic effect or harmful in experimental animals, there was no alteration in the gross observation of the organs. Regarding biological activity, the method of diffusion in agar or disk was used against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The antibiotics meropenem, ciprofloxacin, gentamicin and vancomycin were used as positive controls. Obtaining results that, at concentrations of 1300 mg/mL, 1500 mg/mL, and 1700 mg/mL of the aqueous extract of the leaves of *C. lutea* do not present biological activity against the bacteria in question.

Keywords: *Calathea lutea*, Biological activity, Toxicity.

INTRODUCCIÓN

El ser humano en su intento de adaptar al medio ambiente y luchar por su supervivencia, ha entrado en contacto con diversas sustancias tóxicas, experimentando el uso de ponzoñas de animales y hasta plantas venenosas; así mismo viene realizando la selección de recurso vegetales, animales y minerales que son esenciales para mantenerse con vida. Nuestros antepasados seleccionaban sus alimentos por un proceso empírico, ya que ellos no tenían conocimiento científico de las propiedades que estos tenían¹.

En nuestra región el Bijao es utilizado como materia prima para la envoltura de alimentos típicos, para conservar algunos alimentos como pescados, así como también para cubrir heridas o quemaduras en la piel. Sin embargo, la población desconoce los demás beneficios que reciben de esta planta como su inocuidad o actividad farmacológica.

El uso de plantas medicinales utilizadas desde la antigüedad es una práctica de mucha importancia, ya que da una reserva de arsenal terapéutico, y se puede decir que carece de efectos secundarios. Con ese fin se viene realizando muchas investigaciones, intentando describir las propiedades farmacológicas que estas tienen².

En relación a la *C. lutea* encontramos estudios con respecto a sus características bioquímicas y fisiológicas, sobre servicios ecosistémicos, estudios químicos y fitoquímicos como alternativa de alimentos funcionales, incluso estudios sobre su comportamiento en su reproducción; sin embargo, no se cuenta con literatura científica publicada que aporte al desarrollo de esta investigación. Esta situación se da debido al desconocimiento de los mismos, la reducción en la biodiversidad y la falta de planes o políticas que promuevan los estudios de investigación.

Sin embargo, tenemos la certeza que la generación de nuevos conocimientos sobre estudios de toxicidad y actividad antibacteriana sirve de soporte para la realización de diversos proyectos multidisciplinarios en el cuidado de la salud de las personas.

El objetivo fundamental del presente trabajo de investigación es el de determinar la toxicidad y actividad antibacteriana del extracto acuoso de *C. lutea* en ratones albinos *Mus musculus* cepa Balb/C y microorganismos patógenos.

Es por ello que el presente trabajo nos permitió realizar un aporte de información y de nuevos conocimientos respecto a la toxicidad y la actividad antibacteriana, a ciertas concentraciones del extracto acuoso de la hoja de Bijao *C. lutea*, la función que cumple en el bienestar de quienes manipulan esta hoja y se ven beneficiados con los diversos usos que le dan. Todo este nuevo conocimiento permitirá a pobladores y a entidades gubernamentales y no gubernamentales a tomar decisiones que redunden en el empoderamiento de la comunidad y poder hacer uso de esta planta con seguridad, sin dejar de lado el uso fitoterapéutico que puede tener.

CAPITULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

En el año 2019 se desarrolló un trabajo de investigación tipo casos y controles para determinar la toxicidad aguda del extracto acuoso de hojas de *C. lutea* "Bijao" en ratones albinos *Mus musculus* Balb/C". Utilizando un estudio experimental, prospectivo con corte transversal, teniendo como muestra animal a 12 ejemplares de ratones albinos de sexo macho repartidos en grupo control negativo y 3 grupos experimentales a los cuales sometieron a ayuno por 24 horas, luego procedieron a administrar una dosis única por vía oral del extracto acuoso de hojas de *C. lutea* "Bijao" a una dosis de 25 mg/kg, 200 mg/kg y 2000 mg/kg respectivamente. Sus resultados fueron que, en el tiempo de experimentación, los ratones tuvieron un aumento de aproximadamente 17,52% del peso promedio del primer al séptimo día, y una disminución de aproximadamente 15,42% del peso promedio del séptimo al décimo cuarto día. Con respecto a la evaluación macroscópica de toxicidad aguda de los órganos y sistemas, observaron sedación leve a nivel de comportamiento en todos los grupos, y a nivel cutáneo y del sistema autónomo, pilo erección leve a la dosis de 200 mg/kg peso corporal. Asimismo, se evidenció agrandamiento hepático en los grupos 2 (200 mg/kg) y predominancia en el 3 (2000 mg/kg PC) con una variación de 1,97 g en el peso entre los grupos, significando un aumento de aproximadamente el 80% del basal y el 30% del peso corporal total del ratón. En donde ella concluye, que el extracto utilizado en sus pruebas, presentan posible efecto tóxico en los animales de experimentación a dosis de 2000 mg/kg, al manifestar alteraciones clínicas a nivel de hígado, en comparación con el grupo control negativo³.

En el año 2018 se desarrolló un trabajo de investigación tipo cuantitativo realizando un estudio de características bioquímicas y fisiológicas de la fotosíntesis en plantas de dos especies de *Calathea*. En este trabajo experimental los investigadores manejaron muestras vegetales de *Calathea insignis* y *Calathea makoyana* y usaron técnicas que determinaron la capacidad fotosintética mediante técnicas de reflectancia espectral. Los resultados del estudio muestran que estas dos especies de *Calathea* son probablemente plantas de sombra⁴.

En el año 2017 se desarrolló un trabajo de investigación tipo cuantitativo realizando un estudio sobre los servicios ecosistémicos asociados al Bijao (*C. lutea*) en el municipio de Moniquirá, Boyacá. En este trabajo le dieron un enfoque cuantitativo usando patrones numéricos y en el enfoque cualitativo fueron el uso de herramientas participativas, usando encuestas como instrumento de recolección de datos. Sus resultados más relevantes mostraron que las mujeres prefieren trabajar con las hojas de *C. lutea* (66%) y que, gracias a ello, perciben un ingreso económico para su familia que cualquier otra actividad, finalmente en la zona de estudio, el Bijao es una de las principales fuentes de ingreso, las familias asociadas a esta planta pueden ser consideradas como pertenecientes a la agricultura familiar en transición (76,47%)⁵.

En el año 2014 se desarrolló un trabajo de investigación tipo cuantitativo realizando un estudio sobre el comportamiento del “Bijao” (*Calathea inocephala*) bajo diferentes técnicas de propagación rizomática y fertilización con Molimax en campo definitivo en Tingo María. El diseño de investigación fue experimental. Lo que los autores buscaban con este trabajo fue facilitar la propagación del “Bijao” y fortalecer los conocimientos relacionados al crecimiento inicial en campo definitivo, ya que su consumo masivo puede ocasionar su extinción⁶.

1.2 Bases teóricas

1.2.1 *Calathea lutea*



Figura N° 1: *C. lutea*

La *C. lutea*, nombre científico del Bijao, es una planta herbácea, de grandes hojas ovaladas, que crece de manera silvestre en formaciones llamadas manchales sobre suelos húmedos, generalmente cerca de cuerpos de agua, y se encuentra disponible todo el año. Tiene propiedades antimicrobianas, lo que se relaciona con la preservación de los alimentos⁷.

Esta planta se encuentra en toda la selva de nuestro país, ya que se consume o se usa en forma tradicional desde nuestros ancestros, es común utilizar esta especie vegetal para la preparación de un alimento tradicional (juane), por eso es de importancia conocer si es capaz de producir alguna alteración o signo de toxicidad en el organismo⁷.

El uso más común de la *C. lutea* “Bijao” por el poblador amazónico involucra someter a la hoja a altas temperaturas, al punto de ebullición del agua, lo que permite la liberación de metabolitos secundarios directamente en los alimentos de su dieta; además la falta de medicamentos y productos sanitarios obliga a los pobladores de bajos recursos económicos a recurrir a la naturaleza, encontrando en la hoja de Bijao una alternativa para aislar heridas y quemaduras, lo que retarda el proceso infeccioso.

1.2.1.1 Taxonomía

Taxonómicamente *C. lutea* pertenece al reino Plantae, de División Magnoliophyta, es de división Liliopsida, del orden Zingiberales. Pertenece a la familia Marantaceae, del género *Calathea* y su especie es *Calathea lutea*⁶.

1.2.1.2 Distribución

Esta especie, está distribuida ampliamente desde México, Bolivia, Colombia, Brasil, y Perú entre los 150 m y los 1440 m de altitud. *C. lutea* es una especie de gran porte que alcanza hasta los 3 m de alto, con hojas basales y caulinares, grandes y con el envés blanco-pruinoso, con una inflorescencia caulinar de hasta 8 florescencias cilíndricas, de brácteas en espiral, elípticas, de ápice retuso, verdes a vinotinto⁸.

1.2.1.3 Uso

C. lutea es usada comúnmente para la preparación de algunos alimentos como envoltura, hay pocos estudios con respecto a otro uso⁸.

1.2.2 Toxicología

La toxicología es un parte de la ciencia que se encarga de estudiar las sustancias químicas o naturales que causan daño al organismo humano. Se dice que una sustancia es tóxica al entrar en contacto, penetrar o ser absorbido por n organismo vivo, en dosis elevadas, produce un efecto adverso indirecto o directo en el mismo⁹.

Evidentemente el efecto de estas sustancias en el organismo se debe a las altas dosis de administración de la misma, y en toxicología podemos hablar de compuestos o sustancias exógenas al metabolismo normal, dichos compuestos son denominados comúnmente compuestos xenobióticos. Del mismo modo existen diversos compuestos endógenos, intermediarios del metabolismo como el glutamato, hormonas, como la tiroxina, que causan un efecto tóxico cuando la dosis de administración es elevada; lo mismo sucede con los micronutrientes como el selenio, es muy importante para el organismo,

pero en bajas concentraciones y tóxico a concentraciones altas. Todo lo explicado párrafos arriba se encuentran inmerso en toxicología, mientras que la producción endógena de sustancias metabólicas intermedias a altas concentraciones a causa de enfermedades o defectos en el metabolismo no lo están, causando un efecto similar en el organismo⁹.

1.2.2.1 Toxicología experimental

La evaluación de la toxicidad (llamada también Toxicología Experimental) se fundamenta con el fin de determinar los diversos tipos de toxicidad que existen, por ejemplo, toxicidad aguda, crónica, neurotoxicidad, efectos irritantes, etc, y que tienen como agente causal la ingesta de alguna sustancia, con el objeto de seguir protocolos estandarizados, cumpliendo requisitos legales para su debido registro y posterior comercialización⁹.

1.2.2.2 Toxicidad aguda

La presencia de síntomas y efectos, posterior a la aplicación de sustancias químicas o naturales a dosis relativamente alta, está relacionado a daños que esta causa por motivo de su alta concentración, llamándose de este modo toxicidad aguda. La observación del efecto de la aplicación de esta sustancia sucede después de la administración de la misma, y puede durar hasta catorce días, posteriormente se procede a sacrificar los animales en estudio para su respectivo análisis anatomopatológico¹⁰.

- **Periodo de observación:** Al menos 14 días, pero no rígidos. En este se observará: reacciones tóxicas, inicio y término de periodo de recobrado. El tiempo en que los signos aparecen y desaparecen y cuando mueren (esto es importante)¹¹.
- **Exámenes clínicos:** Se realizan: una vez al día (o más), necropsia a los moribundos y muertos, observaciones de: cambios en la piel, pelos, ojos membranas mucosas, respiratorio, circulatorio, autónomo y central, actividad somatomotora¹¹.

- **Signos clínicos:** Comportamiento, temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letárgica, sueño-coma, tiempo en que mueren, peso: a los tiempos 0, 7 y 14¹¹.
- **Patología:** Necropsia de todos los animales, Cambios patológicos groseros deberán registrarse en animales que sobrevivan 24 o más horas¹¹.

➤ **Clase de Toxicidad Aguda (CTA)**

Hoy en día los diferentes métodos para determinar la toxicidad de una sustancia han venido creciendo en respuesta a la oposición social con respecto al uso desmedido de animales de laboratorio, del mismo modo, a causa de la ciencia de mejorar y encontrar nuevas técnicas de evaluación tóxicológica¹².

Los métodos utilizados actualmente incluyen procedimientos que ayudan a mejorar el uso e intercambio de información, con el fin de evitar repeticiones innecesarias a la hora de realizar los ensayos. También ayuda a mejorar los diseños experimentales, garantizando los procedimientos estandarizados y evitando el sufrimiento de animales de experimentación empleados. Se espera obtener con el avance en tecnología e investigación nuevos métodos más humanos y contrastados científicamente que los que tenemos en la actualidad¹².

Las clases tóxicas agudas es uno de los métodos más utilizados en la actualidad, la cual solo utiliza 3 animales del mismo sexo en un procedimiento por etapas y permite clasificar las sustancias dentro del margen de toxicidad y confirmar los valores de DL₅₀, obtenidos por el método convencional¹².

Estos son tres principios básicos que identifican el amplio concepto de los métodos alternativos basado en el principio de las tres erres¹²:

- ✓ Sustituir los animales de experimentación por métodos *in vitro*.

- ✓ Disminuir el número de animales que se utilicen en los ensayos.
- ✓ Reducir el dolor en los animales, así como el sufrimiento.

1.2.2.3 Toxicidad crónica

➤ Toxicidad subcrónica

Este tipo de toxicidad, a comparación de la aguda, incluye dentro de su procedimiento la aplicación de dosis en forma repetida, por un periodo de 90 días aproximadamente, este tipo de toxicidad se aplica comúnmente con el fin de tener más evidencia en la afección de órganos, obtenida de los datos de dosis efecto con los cuales se diseñan las pruebas de toxicidad crónica, incluida la estimación de un “nivel de efectos adversos no observados”. En este procedimiento, al menos se utilizan tres dosis diferentes, la primera dosis, la más alta, que causa mortalidad en al menos el 10%, la dosis baja que no produce efecto tóxico, y la dosis intermedia, y un grupo control que no se expone al químico o sustancia a prueba. Cabe señalar que se utilizan especies de animales para experimentos, bien pueden ser ratas, o perros, aplicando pruebas separando el género (machos y hembras), ya que esta puede afectar la respuesta del cuerpo a la sustancia en prueba¹³.

1.2.2.4 Toxicología bioquímica

Los procesos que ocurren a nivel molecular y celular al ingerir una sustancia toxica sintética o natural se le conoce como toxicología bioquímica. Es de mucha importancia para seguir en el desarrollo de nuevas terapias, que se defina las interacciones de los efectos tóxicos tanto agudos y crónicos, con el objetivo de tener más efectividad a la hora de determinar riesgos tóxicos, y desarrollar compuestos de usos clínicos nuevos¹³.

El desarrollo de la bioquímica y toxicología molecular se ve limitado al descubrimiento restringido en el uso de biomarcadores de exposición¹³.

1.2.2.5 Toxicología molecular

Hoy en día el estudio del genoma humano, ha ayudado a mejorar técnicas de biología molecular, como por ejemplo en la actualidad, existen grupos de investigación dedicados a describir el genoma a diferentes niveles en el árbol evolutivo.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la producción de ratones genéticamente modificados, así mismo los microarreglos, que se utilizan para evaluar condiciones genéticas, incluyendo exposición de tóxicos, son hoy en día unas técnicas moleculares que son consideradas potencialmente útiles, que son utilizadas en análisis de riesgo¹⁴.

1.2.2.6 Toxicología genética

La identificación y análisis de acción de agentes tóxicos que interactúan con el material genético de los organismos vivos, son conocidos como toxicología genética. El fin de esta parte de la toxicología es entender los agentes físicos y químicos que producen efectos genéticos hereditarios que pueden causar letalidad. Es por ello que la toxicología genética es una ciencia multidisciplinaria que pretende relacionar la exposición de agentes tóxicos con la inducción de alteraciones en el genoma humano, y definir a partir de ellos el efecto que los tóxicos ambientales producen sobre la integridad genética de los seres vivos¹⁴.

1.2.2.7 Relación dosis – respuesta

El termino dosis respuesta es utilizado para evaluar la relación matemática de cuanta sustancia toxica ingreso al organismo y cuál es el riesgo de desarrollar alguna respuesta negativa a la dosis administrada. A través de mecanismos en la fisiología y el metabolismo humano es que

los compuestos tóxicos muestren sus efectos y la relación dosis respuesta¹⁴.

La dosis o concentración que se administra se puede calcular, cuando el agente tóxico o químico es capaz de producir algún efecto que se observable, como por ejemplo la muerte del organismo o algún daño de órganos. Y esta cuantificación puede ayudar en la experimentación al apreciar la respuesta del objeto en estudio a diferente dosis o concentraciones; y eso se puede observar en los animales que experimentan reacciones intensas, y otras reacciones leves, o algunas celular pueden morir o vivir¹⁴.

1.2.2.8 Dosis letal 50

Esta terminología es aplicada a sustancias químicas, naturales, que causa muerte al 50% de los animales utilizado en las pruebas. La dosis letal 50, es un valor que se obtiene estadísticamente. Y se trata de calcular o estimar la mejor dosis que se requiere para causar muerte en 50% de los animales en prueba, por lo tanto, siempre se va ver acompañada de algunos errores, así mismo se evidenciara el intervalo de confianza⁹.

1.2.2.9 Concentración inhibitoria 50

La concentración inhibitoria 50 se utiliza para medir que tan eficaz es un compuesto o sustancia química para inhibir bioquímicamente o biológicamente un proceso. Es una medida cuantitativa que indica la dosis en la cual el compuesto o sustancia realiza una inhibición por la mitad en el proceso biológico dado, ya sea de una enzima, célula, receptor celular, o microorganismo.

También se puede decir que es la concentración de un determinado compuesto o sustancia química, necesaria para inhibir o reducir *in vitro* el crecimiento celular general en un 50 % y comúnmente está siendo utilizado para determinar la actividad antimicrobiana de un cultivo¹⁵.

➤ **Biomarcadores**

A la hora de dosificar un compuesto químico, es necesario considerar la relación dosis respuesta, y estudiar la naturaleza de la respuesta y los factores que afecta a la misma. Todo esto es necesario en la evaluación del riesgo a cualquier agente tóxico. En toxicología es muy importante determinar la exposición real a cualquier agente tóxico, la respuesta del organismo a la sustancia, y la susceptibilidad de los efectos que causan daño. Por eso hoy en día los conocidos biomarcadores son instrumentos o herramientas que ayudan a medir dichos parámetros. En la actualidad se utilizan biomarcadores de respuesta del organismo a la exposición de sustancias químicas, y biomarcadores de susceptibilidad¹³.

1.2.3 Histología

El hombre ha desarrollado diferentes métodos con el cual puede estudiar y describir los órganos, tejidos y células la cual componen al ser humano, perfeccionando a lo largo del tiempo diversos instrumentos necesarios que ayudan a conocer con más precisión la forma y función de los diferentes niveles de la materia¹⁴.

Métodos o técnicas usadas en histología:

1.2.3.1 Microscopía

Esta técnica emplea el microscopio como instrumento para poder observar células y tejidos, así como las primeras descripciones y grabados de organismos microscópicos; para lo cual se emplea lentes compuestos en la observación de protozoarios y otros organismos unicelulares¹⁶.

En la actualidad existen muchos tipos de microscopios, como: microscopio óptico de campo brillante, microscopio óptico de campo de fases, microscopio de luz ultravioleta y de fluorescencia, microscopio electrónico de transmisión, y microscopio electrónico de barrido¹⁶.

1.2.3.2 Técnica citoquímica e histoquímicas.

La estructura de los tejidos, células, están formadas por carbohidratos, proteínas y otros compuestos, las cuales son químicamente activas, que en diferentes condiciones es posible hacerlas reaccionar con otros compuestos¹⁶.

La capacidad de reacción que se puede aplicar entre los componentes de células y tejidos, con otros compuestos es lo que vienen estudiando las técnicas citoquímicas e histoquímicas para la demostración de la actividad de una enzima, o complejos enzimáticos celulares e hísticos¹⁶.

Esta técnica entrega como producto compuestos coloreados visibles al microscopio óptico, permitiendo fácilmente estudiar algún daño que pudiera tener algún órgano en estudio. Gran ejemplo de ello es la observación de lípidos que se acumulan intracelularmente en algunas patologías, o los lípidos que forman parte de estructuras celulares¹⁶.

1.2.3.3 Técnicas de fraccionamiento celular

Esta técnica consiste en separar los componentes celulares, utilizando la centrifugación en un medio isotónico. En la cual es necesario romper las paredes celulares utilizando procedimientos de homogenización, y posteriormente llevar la muestra a la centrifuga para separar los componentes. La forma, el tamaño y la densidad de las partículas, estará relacionada a la velocidad de sedimentación de la centrifuga. Obteniendo de esta forma diferente fracciones celulares¹⁶.

Se denomina unidad *Svedverg*, a la unidad que va definir la velocidad de sedimentación, la cual relaciona la velocidad angular del rotor de la centrífuga con la distancia de la partícula al eje del rotor¹⁶.

La contaminación de la muestra en el proceso de fraccionamiento celular es algo que se tiene que tener en cuenta, gran ejemplo es la el tamaño, la forma, la talla y la densidad de una mitocondria pequeña, que se puede asemejar a un lisosoma al observarla, y, por tanto, se obtendría una fracción mitocondrial contaminada por lisosomas. Este hecho es necesario tenerlo en cuenta

cuando se está estudiando el contenido enzimático de determinada fracción, ya que se pueden falsear los resultados¹⁶.

1.2.3.4 Técnica de cultivos de tejidos

Este método es utilizado muchas veces, para poder apreciar el crecimiento, diferenciación celular, entre otros. Esta técnica consiste en cultivar la muestra en estudio, ya sea células o tejidos en medios de cultivos nutritivos, en la cual las células a temperaturas adecuadas, y a un pH correcto logran desarrollar funciones metabólicas idénticas a las que realizaban cuando formaban parte del tejido o órgano¹⁶.

Esta técnica es muy útil para el estudio de los virus, utilizando a las células de cultivo como hospederas de ellos. Esta técnica es utilizada muchas veces en estudiar celular cancerígenas y el comportamiento en el desarrollo de tumores cancerosos¹⁶.

1.2.4 Actividad antibacteriana

Se entiende por actividad antibacteriana a la capacidad que tiene algún compuesto o sustancia química o natural de matar, o inhibir el crecimiento de algún tipo de microorganismo, impidiendo de esta forma su acción patógena¹⁷.

1.2.4.1 Resistencia microbiana

Hoy en día la resistencia microbiana ha ido creciendo sustancialmente. En contexto muchos equipos de investigación han venido proponiéndose como objetivo principal buscar nuevos principios bioactivos, que tengan efectos antimicrobianos¹⁷.

Uno de los temas en la actualidad que preocupa a la comunidad científica en salud, es la constante emergencia con respecto a cepas bacteriana, puesto que estas están creando resistencia, y el mercado farmacológico no está presentando antibióticos eficaces para contrarrestar

este problema, constituyendo actualmente, un problema creciente de salud pública a nivel mundial¹⁷.

Debido al velocidad de crecimiento exponencial con la que los microorganismos logran desarrollar alguna resistencia a algún fármaco utilizado comúnmente, la producción de nuevas moléculas que tengan acción frente a estas bacterias, la producción de nuevas moléculas es lenta y ha disminuido, notoriamente, en los últimos años, causando de este modo que el tratamiento a infecciones causada por bacterias no sea eficaz¹⁸.

Y en una respuesta a contrarrestar esto, la comunidad científica ve la necesidad de encontrar alternativas eficaces para el control de las infecciones bacterianas, recurriendo de esta manera a la fotoquímica y fitofarmacología, logrando encontrar diversos compuestos bioactivos en plantas. Así, se acepta que, a pesar del avance alcanzado por la síntesis química, las plantas son una valiosa fuente de sustancias activas con propiedades antibacterianas²⁰, apoyados en que éstas producen un sin número de metabolitos secundarios, muchos de los cuales pueden ser antibacterianos¹⁸.

El Perú es un país que tiene una gran diversidad en cuanto a flora se habla, y cuenta con más de 30000 mil especies vegetales, donde más del 15% han sido estudiadas y reportan efectos beneficiosos para la salud²⁰.

1.2.4.2 Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana

No existe una reglamentación y/o estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de extractos de plantas (EP), como se establece para los antibióticos. La mayoría de los métodos están basados en los métodos utilizados para evaluar la resistencia y/o la sensibilidad a algún antibiótico²¹.

El método de difusión en agar o disco es uno de los más utilizados en el mundo científico, por la rapidez para obtener resultados²¹. Esta técnica ayuda a obtener datos tanto como cualitativos como cuantitativos²².

➤ **Evaluación de la actividad antimicrobiana por el método de Kirby Bauer**

Este método es conocido mundialmente, que consiste en aplicar un disco impregnado con algún compuesto antibiótico, en una placa que contiene un medio de cultivo nutritivo inoculado con un determinado microorganismo, el antimicrobiano crea una zona de inhibición, diciéndose de ese modo que el antibiótico o compuesto activo es eficaz, dicha zona de inhibición es medida y se relaciona inversamente a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)²³.

1.3 Definición de términos básicos

- **Actividad antibacteriana.** Capacidad de matar/destruir/inactivar microorganismos, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena.²⁴
- **Antibiótico.** Es un sustancia química natural o sintética, que mata o inhibe el crecimiento bacteriano.²⁴
- ***Calathea lutea*.** Nombre científico de la planta de nombre vulgar Bijao.⁵
- **Exposición aguda.** Es una exposición que dura muy poco tiempo, por eso el estudio con esta técnica es a corto plazo.⁹
- **Extracto acuoso.** Es una sustancia obtenida por maceración de una parte de una materia prima, utilizando como solvente agua.²⁴
- **Histopatología.** Es el examen microscopio que se realiza a un tejido con el fin de observar manifestaciones de enfermedad.¹⁶
- **Kirby Bauer.** Método utilizado para determinar la sensibilidad que presenta un agente bacteriano frente a un quimioterápico o un antibiótico.²³
- **Toxicidad.** La capacidad intrínseca que posee un agente químico de producir efectos adversos sobre un órgano.¹³

CAPÍTULO II: VARIABLES E HIPÓTESIS

2.1 Variables y su operacionalización

2.1.1 Variable independiente

➤ **Extracto acuoso de *C. lutea*.**

✓ **Definición conceptual.** Mezcla compleja de metabolitos secundarios con posible actividad farmacológica dentro de una solución acuosa de *C. lutea*.

✓ **Definición operacional.** Extracción por cocción del órgano del vegetal entre 70° y 80°C durante 2 horas. Posterior filtrado y secado

✓ **Indicadores.** Concentración del extracto *C. lutea*.

Clases tóxicas agudas: 25mg/kg, 200 mg/kg, 2000mg/kg.

Sensibilidad bacteriana: 1300 mg/mL, 1500 mg/mL, 1700 mg/mL

✓ **Instrumentos:** Ficha de registro de datos.

2.1.2 Variables dependientes

➤ **Actividad antibacteriana.**

✓ **Definición conceptual.** Acción farmacológica capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo bacteriano sin dañar la salud.

✓ **Definición operacional.** Determinación del halo de inhibición tras la aplicación del medio de cultivo, de los discos de sensibilidad impregnado con el extracto en estudios a 18 horas después de la incubación.

✓ **Indicadores.** Porcentaje de inhibición según el tamaño del diámetro del halo en los discos.

Inactivo: <40%, Poco activo: 40-50%, Moderado activo: 51-75%, Buena actividad: >76%.

✓ **Instrumentos.** Ficha de registro de datos.

➤ **Toxicidad aguda por el método de clases tóxicas agudas (CTA)**

- ✓ **Definición conceptual.** Ensayo según el método de las Clases Tóxicas Agudas, descrito por la Normativa N°423 de la OECD (Guideline For Testing of Chemical «Acute Oral Toxicity Acute Toxic Class Method»).
- ✓ **Definición operacional.** Evaluación de la toxicidad oral aguda de compuestos o extractos vegetales, mediante las Directrices para las pruebas de productos químicos OECD N°423 – Clases Tóxicas Agudas.
- ✓ **Indicadores.** Signos clínicos tóxicos: observación, tiempo de aparición, permanencia y/o reversibilidad.
- ✓ **Ítems.** Aquellos animales de experimentación que tengan por lo menos 01 signo clínico del cuadro de signos clínicos se considera positivo a la toxicidad. (Ver anexo cuadro de signos clínicos).
- ✓ **Instrumentos.** Ficha de registro de signos clínicos, y ficha de reporte de resultados histopatológicos.

2.2 Formulación de hipótesis

a) **H₀**: El extracto acuoso de *C. lutea* no presenta toxicidad en ratones albinos *Mus musculus* cepa Balb/C.

H₁: El extracto acuoso de *C. lutea* presenta toxicidad en ratones albinos *Mus musculus* cepa Balb/C.

b) **H₀**: El extracto acuoso de *C. lutea* no presenta efecto antibacteriano.

H₁: El extracto acuoso de *C. lutea* presenta efecto antibacteriano.

CAPITULO III: METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño de la investigación.

El estudio es de tipo experimental, prospectivo, longitudinal.

Experimental: En el presente estudio se realizaron comparaciones de la variable independiente, es decir, de la solución acuosa de *C. lutea*, con los grupos experimentales y de control y se analizaron los resultados.

Prospectivo: En este estudio el registro de la información y la recolección de los datos se tomó en cuenta a partir de la fecha de estudio hacia adelante.

Longitudinal: En el presente trabajo de investigación se recolectaron los datos de las variables de estudio en varios momentos durante el periodo de investigación.

3.2 Población y muestra.

El estudio toxicológico se realizó en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNAP y la actividad antibacteriana se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias.

Población

a) Población Vegetal:

Todas las plantas de *C. lutea* que habitan en la Región Loreto.

Hojas de *C. lutea* recolectadas del departamento de Loreto, Provincia Maynas, y distrito Indiana. Se utilizó un total de 300 g de muestra seca. Para la recolección de la muestra vegetal se tuvo en cuenta los siguientes factores: hábitat de la planta, diámetro de la hoja, hora de recolección durante las horas de luz natural.

Criterios de Inclusión:

- Hojas en buen estado sin presencia de hongos.
- Hojas con longitud mayor a 50 cm.

Criterios de Exclusión:

- Hojas dañadas o rotas.
- Hojas secas.

b) Población Animal:

Para este estudio se utilizaron ratones albinos *Mus musculus* cepa Balb/C, de sexo macho, con pesos entre 20 – 25 g procedentes del Centro Nacional de Producción de Biológicos del INS-MINSA, con sede en Lima.

Muestra animal

Se utilizaron 12 ratones albinos *Mus musculus* cepa Balb/C, formando grupos experimentales según protocolo de estudio, la muestra fue constituida por ratones de sexo macho, que cumplan el criterio de inclusión, fueron alimentados con una fórmula balanceada caracterizada por contener proteínas (48,40%), soya (22,20%), vitaminas y minerales (0,12%).

Criterios de Inclusión:

Se emplearon animales adultos jóvenes sanos de cepas de laboratorio de uso común, entre las 8 y 12 semanas de edad.

- Ratones albinos *Mus musculus* cepa Balb/C jóvenes y sanos.
- Ratones machos con peso corporal de 20 a 25 g.

Criterios de Exclusión:

- Ratones con peso menor de 20 g y mayor de 25 g.
- Ratones que hayan sido utilizados en evaluaciones anteriores.

c) Población bacteriana:

El estudio se realizó con cepas bacterianas de *E. coli* ATCC 25932, *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, provenientes del Instituto Nacional de Salud (INS), con sede en la ciudad de Lima.

Muestra bacteriana:

Se emplearon de 3 a 5 colonias de tamaño similar para la preparación del inóculo bacteriano.

Criterios de inclusión:

- Cepas que reunieron las características morfológicamente iguales.
- Cepas libres de contaminación.
- Cepas jóvenes.

Criterios de exclusión:

- Cepas con características morfológicamente diferentes.
- Cepas contaminadas con otras cepas de bacterias.

3.3 Técnicas e instrumentos.

3.3.1 Técnicas e instrumentos para el estudio toxicológico (Anexo N°2)

Para desarrollar el estudio toxicológico del extracto acuoso de *C. lutea*, se utilizó la técnica de Clases Tóxicas Agudas (CTA), descrito por la Normativa N°423 de la OECD (Guideline For Testing of Chemical «Acute Oral Toxicity Acute Toxic Class»); Como instrumentos se utilizaron una tarjeta de registro, ficha de signos clínicos, y un reporte de resultados histopatológicos.

3.3.2 Técnicas e instrumentos para la evaluación de la actividad antibacteriana.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se utilizó la técnica de difusión en disco o agar, de Kirby Bauer. Como instrumento se utilizó una ficha de registro de resultados.

3.4 Procedimientos de recolección de datos

➤ Obtención del Extracto Acuoso de Hojas de *C. lutea* “Bijao” (Anexo N°6-11)

✓ Recolección de la Muestra Vegetal

La muestra de las hojas de *C. lutea* “Bijao”, se recolectaron en el distrito de Indiana, Provincia de Maynas, Loreto, Perú.

El área de estudio fue el Distrito de Indiana que se encuentra geográficamente a 03°29'54” Latitud sur y 73°02'40” Latitud Oeste, ubicada en la Provincia de Maynas, Departamento de Loreto.

✓ Obtención del Extracto Acuoso de *C. lutea* “Bijao”

Las hojas de *C. lutea* “Bijao” se secaron a temperatura ambiente; al aire libre, por consiguiente, se procedió al secado de las mismas, las cuales después fueron molidas, envasadas y conservadas en un lugar seco y fresco. Se obtuvo 300 g de la muestra en polvo, y se maceraron con 2000 mL de agua destilada, sometidos a cocción a temperatura de 60 ° a 70 °C por dos horas hasta reducir el agua al 60% aproximadamente del volumen total. Se eliminaron el total de solvente (para mayor concentración) con la ayuda de la estufa a 40° a 50 °C.

El sobrante se dejó secar a temperatura ambiente por 2 días, una vez seco el extracto acuoso se pesó y se envaso en un frasco de vidrio hermético y estéril para su conservación y posterior utilización.

➤ **Evaluación toxicológica del extracto acuoso de hojas de *C. lutea* (Anexo 12-16)**

Determinación de la toxicidad aguda oral por el método de clases tóxicas agudas del extracto acuoso de *C. lutea*

La aplicación de los extractos se llevó a cabo, previo ayuno de 12 horas de todos los animales de experimentación, de acuerdo a las dosis determinadas por grupo experimental, se confeccionaron cuatro (04) grupos de tres (03) animales cada uno, por cada dosis, a los cuales se le administró por vía oral el extracto acuoso de *C. lutea* 25 mg, 200 mg, 2000 mg y cloruro de sodio 0,9% al grupo control negativo.

Los animales se observaron individualmente después de la dosificación al menos una vez durante los primeros 30 minutos, periódicamente durante las primeras 24 horas, con atención especial durante las primeras 4 horas y diariamente a partir de entonces, por un total de 14 días; se observó las reacciones tóxicas, el tiempo de inicio y la duración del período de recuperación. Todas las observaciones se registraron sistemáticamente con registros individuales para cada animal, además el peso corporal se anotó al inicio y cada tres días hasta finalizar el estudio. Al concluir el período experimental se sacrificaron los animales por dislocación cervical, para su posterior evaluación macroscópica de órganos internos y estudio histopatológico de órganos diana riñón e hígado.

Determinación de la alteración de órganos mediante la observación macroscópica (anatomo-morfológicas)

Se realizó la necropsia para extraer los órganos y/o tejidos (corazón, riñón, pulmón, hígado, bazo, estómago), de los animales de experimentación, previamente se registraron los pesos corporales de cada uno; los órganos extraídos fueron examinados macroscópicamente para registrar coloración, consistencia, tamaño y/o alteraciones macroscópicas, Se utilizó tablas de comparaciones con los órganos de los animales en experimento sin tratamiento.

Grupos experimentales	Dosis / Extracto acuoso	Cantidad animales
GRUPO I	Cloruro de sodio 0,9%	03 Ratones
GRUPO II	25 mg/kg de PC	03 Ratones
GRUPO III	200 mg/kg de PC	03 Ratones
GRUPO IV	2000 mg/kg de PC	03 Ratones

Determinación de la alteración de órganos mediante histopatología

Este procedimiento fue realizado en la ciudad de Lima en los laboratorios del Instituto Nacional de Salud. Se enviaron muestras de hígado y riñón de todos los grupos estudiados para observar los posibles daños a nivel celular.

➤ **Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto acuoso de las hojas de *C. lutea* (Anexo 17-22)**

La actividad antibacteriana se determinó utilizando el método de Difusión en Agar o disco o método de "Kirby Bauer".

A) Dilución del extracto

Para la dilución del extracto acuoso de las hojas de *C. lutea*, se procedió a pesar 0,65; 0,75 y 0,85 gramos del extracto en microtubos de tipo spondorf completamente estériles, y se añadió 0,5 mL de DMSO, luego se llevó al vortex hasta homogenizar completamente la dilución, llegando a obtener concentraciones del extracto de 1300 mg/mL, 1500 mg/mL y 1700 mg/mL, siguiendo el procedimiento, se procedió con ayuda de una micropipeta, a impregnar 20 µL del extracto ya diluido en discos de papel whatman estériles.

B) Preparación de los controles

Para las pruebas realizadas, se utilizaron discos con los antibióticos Gentamicina 10 µg/mL, Ciprofloxacino 5 µg/mL, Meropenem 10 µg/mL, y Vancomicina 30 µg/mL, como control positivo; para el control negativo se utilizó la solución de DMSO utilizada en la dilución del extracto.

C) Activación de cultivos en agar

Con ayuda del asa bacteriológica se procedió a activar las cepas bacterianas en congelación de *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, tomando una muestra, lo inoculamos en tubos con caldo nutritivo, e incubamos a temperatura entre 35 – 37 °C durante 18 a 24 horas, pasado el tiempo de incubación se realizó el aislamiento de colonias utilizando Agar Muller Hinton.

D) Preparación del inóculo

De las placas de agar Muller Hinton con colonias aisladas individuales, se procedió a seleccionar de 3 a 4 colonias, las cuales con un asa de siembra bacteriológica fueron transferidas a tubos que contienen 5 mL de cloruro de sodio al 0.9% comparando visualmente se llegó a la turbidez del estándar 0,5 de la escala de McFarland, pudiendo decir que la suspensión preparada contiene aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853¹¹.

E) Inoculación de las placas

Alrededor de los 15 minutos posteriores al ajuste de la turbidez del inóculo bacteriano, utilizando una micropipeta completamente estéril, se tomó 0.1 mL de la bacteria diluida en los tubos de cloruro de sodio, para inocularlas en placas que contenían agar Muller Hinton previamente preparadas, utilizando una espátula de drigalsky y en distintas direcciones se esparció el inóculo en toda la placa Petri, dejando reposar unos 3 a 5 minutos para quitar el exceso de humedad.

F) Aplicación de los discos

Se aplicaron los discos impregnados con el extracto en la superficie del medio de cultivo, con la ayuda de una pinza estéril, y asegurándose que el disco este en completo contacto con el agar. Se trató de distribuir los discos uniformemente, de modo de modo que se encontraron en una distancia de 25 mm uno del otro, es recomendable que a la hora de colocar los disco en el agar estos no superen la cantidad de 12 discos en placas de 150 mm y no más de 6 disco en placas de 10 mm, para evitar de esta manera que los halos de inhibición de cada disco choquen entre sí. Se tuvo en cuenta que los discos una vez que entró en contacto con el agar, no deben ser removidos, debido a la difusión rápida de los antibióticos o compuestos bioactivos que pueda haber en los discos.

G) Incubación

Una vez que se realizó la aplicación de los discos impregnados con el extracto acuoso de *C. lutea*, se dejó reposar por 15 minutos aproximadamente, para luego invertirlas e incubarlas a 35°C durante 18 – 24 horas.

H) Lectura de las placas e interpretación de los resultados

Pasado el tiempo de incubación se procedió a medir las zonas de inhibición incluyendo el diámetro del disco, utilizando una regla vernier. Con ayuda de una muy buena fuente de luz se ilumino la parte posterior de la placa Petri, en un fondo negro, para mejorar la lectura²⁵.

I) Procedimientos de recategorización

- Para los principales antibióticos, los valores críticos de las concentraciones bajas (c) y altas (C) y de sus diámetros correspondientes (d, D), permiten la categorización según los siguientes criterios²⁵:

Categorías	Concentración inhibitoria mínima (mg/L)	Diámetro del halo de inhibición (mm)
S	$CIM \leq c$	$DHI \geq D$
R	$CIM > C$	$DHI < d$
I	$c < CIM \leq C$	$d \leq DHI < D$

Fuente: Instituto Nacional de Salud.

- Por otra parte, la interpretación del antibiograma, se encuentra fundada en el conocimiento de los antibiogramas, los cuales son los patrones de resistencia o sensibilidad de cada bacteria, permite recategorizar un resultado inicialmente S en I o R debido al riesgo del fracaso terapéutico. Esta lectura interpretativa requiere la identificación correcta de la bacteria y una correcta realización del antibiograma²⁵.

Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición:

$$\% \text{ INHIBICION: } \frac{\text{Diámetro de la muestra} \times 100}{\text{Diámetro de control}}$$

Los ensayos se realizaron por triplicado y se realizarán cultivos de control de todas las cepas para comprobar su viabilidad.

Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición:

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	PORCENTAJE DE INHIBICION
Inactivo	<40%
Poco activo	40- 50%
Moderado activo	51- 75%
Buena actividad	>76%

3.5 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Los datos obtenidos fueron procesados en el programa Microsoft Excel 2016, con el cual se logró, obtener los cuadros de frecuencia, mediana, desviación estándar, gráficos.

3.6 Aspectos éticos

➤ Protección de los derechos de los animales de experimentación.

Hoy en día existen muchas investigaciones en el cual se intenta estudiar las propiedades que tienen muchas plantas que son conocidas como medicinales. Antes de sacar algún producto farmacológico al mercado, es de mucha importancia realizar estudios pre clínico en animales de experimentación o de laboratorio.

Es de gran importancia la necesidad de mantener una proyección adecuada en cuanto a las condiciones bioéticas con la manipulación y condiciones de vida de estos animales.

Al animal en estudio se le denomina modelo animal, quien actúa como un sustituto del ser humano. Los resultados de todas las pruebas realizadas; va a depender en una parte de la selección del animal de prueba, y de la naturaleza de la investigación

Para este estudio se siguieron las líneas que marcan el Comité para la Investigación y la Ética de la IASP en lo concerniente a los aspectos éticos de los experimentos que implican dolor o sufrimiento a los animales.

Las consideraciones éticas que se tendrá en cuenta serán:

- ✓ Los animales de experimentación serán expuestos al mínimo dolor necesario para alcanzar los objetivos de la investigación.
- ✓ La duración del experimento será la más corta posible.
- ✓ Se utilizarán pequeños grupos de animales, lo necesario para demostrar o rechazar la hipótesis de trabajo.

➤ **Protección de los Derechos Humanos (Principios Básicos de Bioseguridad)**

Se utiliza la palabra contención para explicar técnicas seguras para manejar o manipular materiales infecciosos dentro de un laboratorio. Con el objetivo de disminuir al máximo la exposición del personal que labora en los laboratorios u otras personas que estén en contactos con los materiales o agentes peligrosos.

Cabe recalcar que es de suma importancia el cumplimiento estricto de todas las reglas o procesos y técnicas microbiológicas en el laboratorio.

CAPITULO IV: RESULTADOS

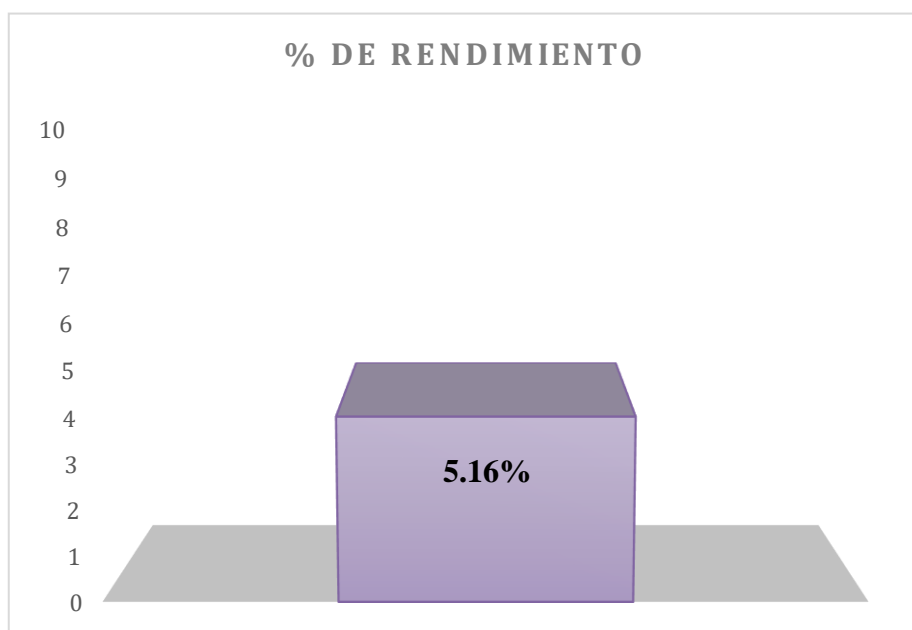
4.1 Rendimiento del extracto acuoso

Tabla N° 1: Rendimiento del extracto acuoso de *C. lutea*.

Parte de la planta	Cantidad de muestra vegetal	Cantidad de muestra seca para maceración	Cantidad obtenida de extracto etanólico	Porcentaje de rendimiento
HOJA	500 g	300 g	15.48 g	5.16%

En la Tabla N°1 observamos que se utilizó 500 gramos de muestra vegetal utilizada para obtener el extracto acuoso; asimismo, de 300 gramos de muestra seca macerada en agua se obtuvo 15.48 gramos de extracto etanólico, obteniéndose un rendimiento de 5.16%.

Grafico N° 1: Porcentaje de rendimiento del extracto acuoso de las hojas de *C. lutea*



4.2 Evaluación de la actividad toxicológica

Evaluación de la variación del peso corporal de *Mus musculus*

Tabla N° 2: Peso promedio de los ratones durante la experimentación.

GRUPOS EXPERIMENTALES	DIA 1 X ± SD	DIA 7 X ± SD	DIA 14 X ± SD
Control Negativo	22.83 ± 2.61	24.10 ± 7.55	25.60 ± 5.41
Dosis 2000 mg/kg	20.70 ± 1.80	23.37 ± 5.75	21.83 ± 3.63
Dosis 200 mg/kg	25.37 ± 0.76	24.43 ± 1.78	24.00 ± 1.73
Dosis 25 mg/kg	22.53 ± 0.58	25.13 ± 0.91	23.47 ± 0.47

La Tabla N°02, se muestra el promedio y desviación estándar de la variación de peso de los ratones albinos de todos los grupos experimentales, encontrándose.

Evaluación de los signos clínicos tóxicos en *Mus musculus*

Tabla N° 3: Observaciones macroscópicas de órganos blancos asociados a las acciones del agente Órgano/Sistema

GRUPOS Órganos y Sistemas	GRUPO 1 (Control Negativo)	GRUPO 2 (Experimental) 2000 mg/Kg	GRUPO 3 (Experimental) 200 mg/Kg	GRUPO 4 (Experimental) 25 mg/kg
Autónomo	NSP	NSP	NSP	NSP
Comportamiento	Leve Sedación	Leve Sedación	Leve Sedación	Leve Sedación
Sensorial	NSP	NSP	NSP	NSP
Neuromuscular	NSP	NSP	NSP	NSP
Cardiovascular	NSP	NSP	NSP	NSP
Respiratorio	NSP	NSP	NSP	NSP
Ocular	NSP	NSP	NSP	NSP
Gastrointestinal	NSP	NSP	NSP	NSP
Cutáneo	NSP	NSP	Leve Pilo erección	NSP

NSP = No Se Presentó.

En la Tabla N°3, se describe los signos clínicos observados en los animales de experimentación según cuadro de observaciones de toxicidad aguda para determinar los órganos blancos asociados a las acciones del extracto en los órganos/sistema de todos los grupos experimentales; se evidenció sedación leve a nivel de comportamiento y pilo erección en el grupo experimental N°03, a dosis de 200 mg/kg PC.

Tabla N° 4: Observación macroscópica de los órganos de los ratones.

ORGANOS	Control Negativo	(Experimental) 25 mg/kg	(Experimental) 200 mg/kg	(Experimental) 2000 mg/kg
CORAZON	Color : Rojo grisáceo Consistencia : Textura dura Tamaño : Normal	Color : Rojo grisáceo Consistencia : textura dura Tamaño : Normal	Color : Rojo grisáceo Consistencia : textura dura Tamaño : normal	Color : Rojo grisáceo Consistencia : textura dura Tamaño : normal
HIGADO	Color : Rojo vinoso Consistencia: suave Tamaño : Normal	Color : rojo vinoso Consistencia : suave y firme Tamaño : Normal	Color : rojo vinoso Consistencia : suave y firme Tamaño: ligeramente agrandado	Color : Rojo vinoso Consistencia : suave y firme Tamaño: ligeramente agrandado
RIÑON	Color : rojo grisáceo Consistencia : suave y firme Tamaño : Normal	Color : rojo grisáceo Consistencia : suave y firme Tamaño : Normal	Color : rojo grisáceo Consistencia : suave y firme Tamaño : normal	Color : rojo grisáceo Consistencia : suave y firme Tamaño : normal
ESTOMAGO	Color : crema amarillento Consistencia : suave y firme Tamaño : Normal	Color : crema amarillento Consistencia : suave y firme Tamaño : Normal	Color : crema amarillento Consistencia : suave y firme Tamaño : pequeño	Color : crema amarillento Consistencia : suave y firme Tamaño : pequeño

En la tabla N° 4 se observan los indicadores macroscópicos de los principales órganos de los ratones albinos sexo macho administrados con *C. lutea*.

4.3 Resultados histopatológicos de órganos diana (Riñón e Hígado)

***C. lutea* 2000 mg/Kg**

MUESTRA: HIGADO - TEJIDO

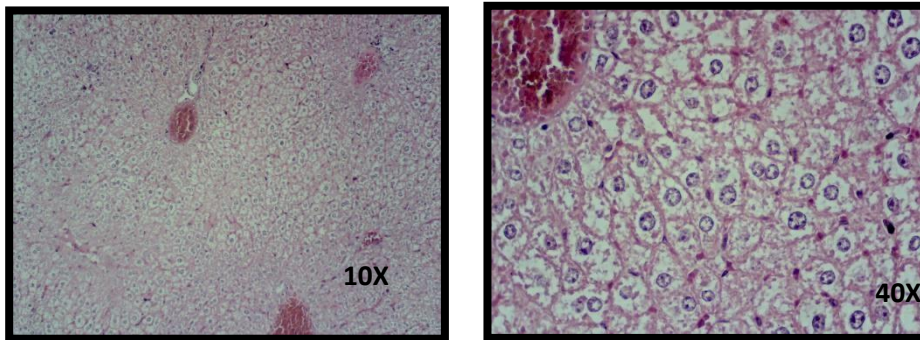


Figura N° 2: Resultados del estudio histopatológico del hígado a concentración de 2000 mg/kg de extracto de *C. lutea*.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

- ✓ A 10x se observa congestión en los vasos sanguíneos del hígado
- ✓ A 40x se observa el parénquima hepático con degeneración hidrópica*, la cual puede ser reversible si se retira la causa, caso contrario derivará en necrosis (muerte del tejido) del parénquima hepático

*Cambio morfológico reversible secundario a una causa.

DIAGNÓSTICO: Congestión sanguínea y degeneración hidrópica del hígado

***C. lutea* 2000 mg/Kg**

MUESTRA: RIÑON - TEJIDO.

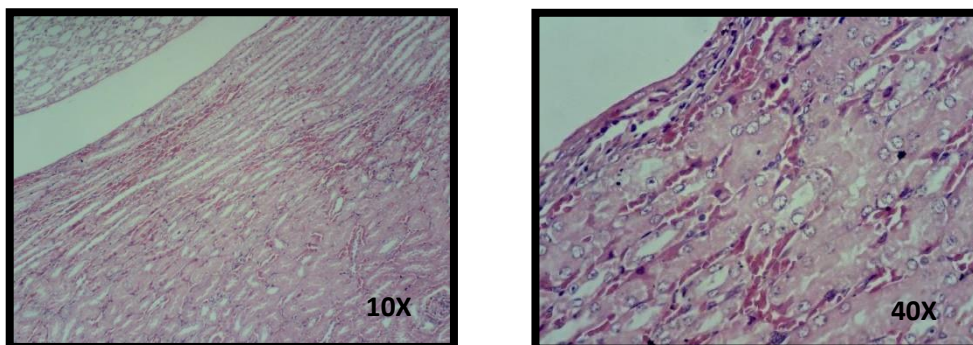


Figura N° 3: Resultados del estudio histopatológico del riñón a concentración de 2000mg/kg de extracto de *C. lutea*.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

- ✓ A 10x se observa congestión en los vasos sanguíneos en el intersticio del parénquima renal
- ✓ A 40x se observa la médula renal con hemorragia y congestión en el intersticio entre los túbulos renales.

DIAGNÓSTICO: Congestión sanguínea y hemorragia en médula renal.

***C. lutea* 25 mg/Kg**

MUESTRA: HIGADO - TEJIDO.

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:

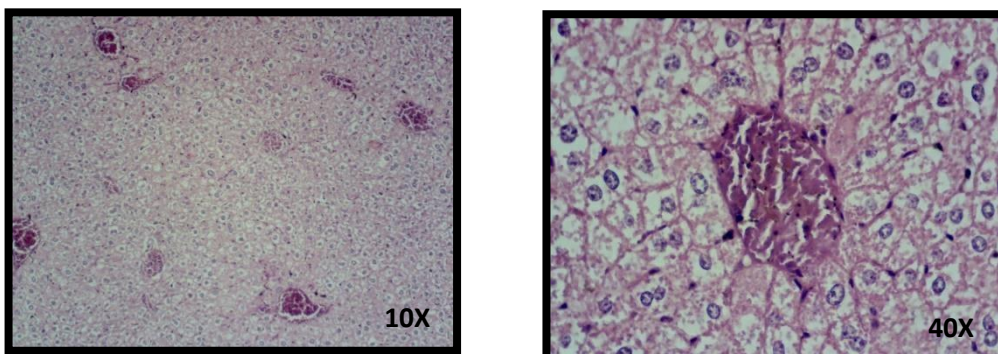


Figura N° 4: Resultados del estudio histopatológico del hígado a concentración de 25 mg/kg de extracto de *C. lutea*.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

- A 10x se observa congestión en los vasos sanguíneos del hígado
- A 40x se observa el parénquima hepático con degeneración hidrópica, la cual puede ser reversible si se retira la causa, caso contrario derivará en necrosis (muerte del tejido) del parénquima hepático

DIAGNÓSTICO: Congestión sanguínea y degeneración hidrópica del hígado

***C. lutea* 25 mg/Kg**

MUESTRA: RIÑÓN - TEJIDO.

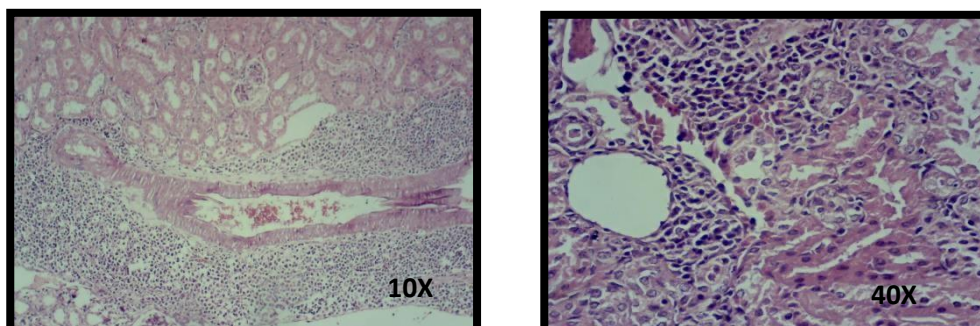


Figura N° 5: Resultados del estudio histopatológico del riñón a concentración de 25mg/kg de extracto de *C. lutea*.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

- ✓ A 10x se observa congestión en los vasos sanguíneos y presencia de infiltrado inflamatorio.

- ✓ A 40x se observa el parénquima renal con degeneración hidrópica, reversible si se retira la causa, además hay presencia de exudado inflamatorio (células inflamatorias).

DIAGNÓSTICO: Congestión sanguínea, degeneración hidrópica y leve nefritis

***C. lutea* 200 mg/Kg**

MUESTRA: HIGADO - TEJIDO.

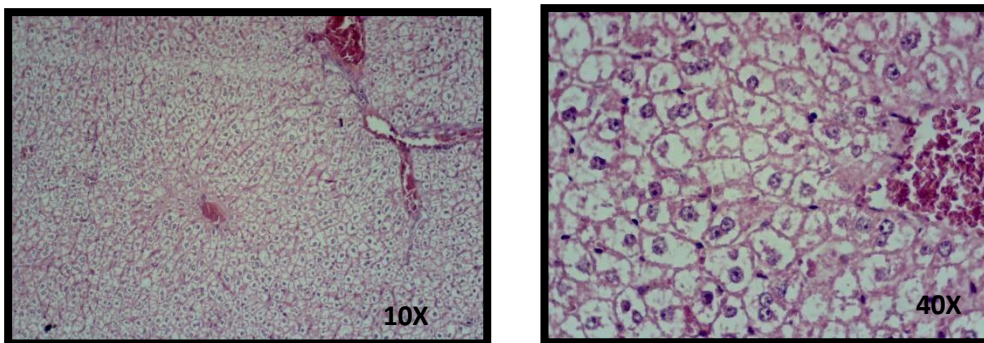


Figura N° 6: Resultados del estudio histopatológico del hígado a concentración de 200 mg/kg de extracto de *C. lutea*.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

- ✓ A 10x se observa congestión en los vasos sanguíneos del hígado
- ✓ A 40x se observa el parénquima hepático con degeneración hidrópica y congestión de vasos sanguíneos.

DIAGNÓSTICO: Congestión sanguínea y degeneración hidrópica del hígado

***C. lutea* 200 mg/Kg**

MUESTRA: RIÑON – TEJIDO

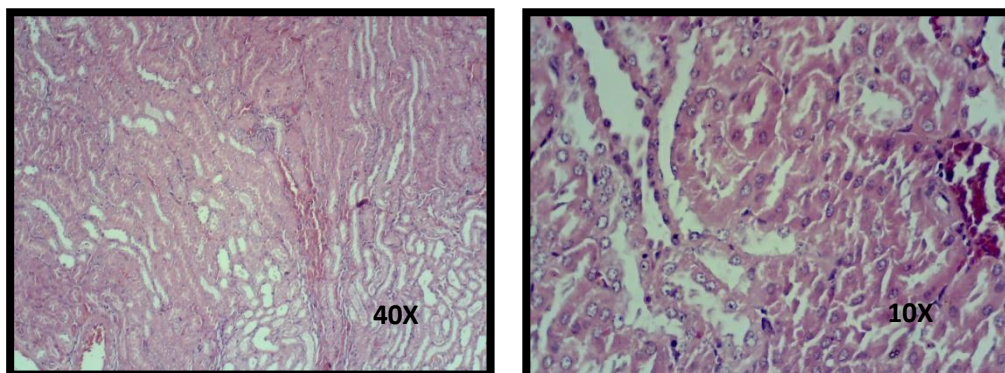


Figura N° 7: Resultados del estudio histopatológico del riñón a concentración de 200 mg/kg de extracto de *C. lutea*.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

- ✓ A 10x se observa congestión en el intersticio, entre los túbulos renales de la médula renal.

- ✓ A 40x se observa zonas múltiples de degeneración y necrosis tubular.

DIAGNÓSTICO:

Congestión en médula renal y zonas de necrosis tubular

C. lutea control negativo

MUESTRA: HIGADO - TEJIDO.

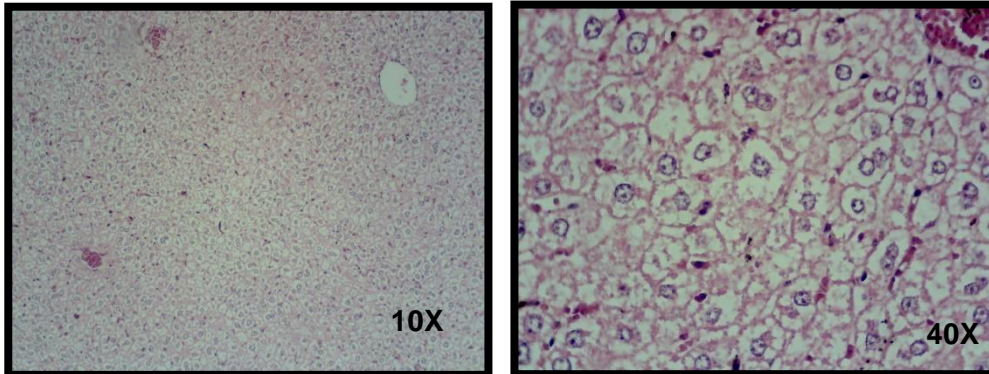


Figura N° 8: Resultados del estudio histopatológico del hígado control negativo.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

- ✓ A 10x se observa congestión en los vasos sanguíneos del hígado
- ✓ A 40x se observa el parénquima hepático con degeneración hidrópica además de congestión sanguínea en venas y sinusoides hepáticas.

DIAGNÓSTICO:

Congestión sanguínea y degeneración hidrópica del hígado.

C. lutea control negativo

MUESTRA: RIÑÓN -TEJIDO.

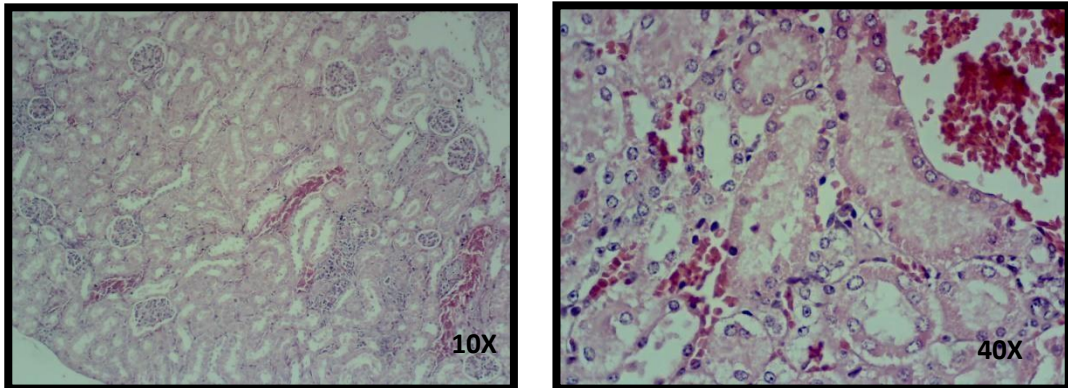


Figura N° 9: Resultados del estudio histopatológico del riñón control neutro.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

- A 10x se observa congestión en los vasos sanguíneos en el intersticio del parénquima renal y zonas con infiltrado inflamatorio.
- A 40x se observa túbulos renales de la médula renal con procesos degenerativos y hemorragia por diapédesis (hemorragia que resulta por una congestión permanente)

DIAGNÓSTICO:

Degeneración tubular y áreas de nefritis

4.4 Evaluación de la actividad antibacteriana

Tabla N° 5: Actividad antibacteriana del extracto acuoso de las hojas de *C. lutea* “Bijao” frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

BACTERIA	Extracto (1300 mg/mL)		Extracto (1500 mg/mL)		Extracto (1700 mg/mL)	
	Diámetro mm	Resultado	Diámetro mm	Resultado	Diámetro mm	Resultado
<i>Escherichia coli</i>	0 ± 0	Resistente	0 ± 0	Resistente	0 ± 0	Resistente
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0 ± 0	Resistente	0 ± 0	Resistente	0 ± 0	Resistente
<i>Staphylococcus aureus</i>	0 ± 0	Resistente	0 ± 0	Resistente	0 ± 0	Resistente

* Esquema de los Diámetros de la Zona de Inhibición:

Resistente: < 12 mm
 Intermedio: 13 a 14 mm
 Sensible: > 15 mm

Fuente: Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud del Perú. 2002²⁵.

Tabla N° 6: Actividad antibacteriana de los controles positivos Meropenem 10 µg, Ciprofloxacino 5 µg, Gentamicina 10 µg y Vancomicina 30 µg frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

BACTERIA	Meropenem 10 µG		Ciprofloxacino 5 µG		Gentamicina 10 µG		Vancomicina 30 µG	
	Diámetro mm	Resultado	Diámetro mm	Resultado	Diámetro mm	Resultado	Diámetro mm	Resultado
<i>Escherichia coli</i>	23.0 ± 0.0	Sensible	22.0 ± 0.0	Sensible	22.0 ± 0.6	Sensible	0	Resistente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25.3 ± 0.6	Sensible	31 ± 0.4	Sensible	16 ± 0.6	Sensible	0	Resistente
<i>Staphylococcus aureus</i>	28 ± 0.6	Sensible	34 ± 0.0	Sensible	22 ± 0.4	Sensible	20 ± 0.6	Sensible

* Esquema de los Diámetros de la Zona de Inhibición:

Resistente: < 12 mm

Intermedio: 13 a 14 mm

Sensible: > 15 mm

Fuente: Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud del Perú. 2002²⁵.

En la TABLA N° 6 observamos que los controles positivos Meropenem, Ciprofloxacino, y Gentamicina frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, tuvieron halos de inhibición con actividad antibacteriana Sensible, a excepción del antibiótico vancomicina, quien tuvo actividad antimicrobiana resistente frente a *E. coli*, y *P. aeruginosa*, y sensible para *S. aureus*.

CAPITULO V: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Este trabajo de investigación se realizó de acuerdo al protocolo descrito en la normativa N° 423 de la OCDE, método de Clases Tóxicas Agudas, desarrollado bajo las condiciones experimentales para demostrar la inocuidad del extracto acuoso de *C. lutea*, es una especie vegetal que es utilizado tradicionalmente como antiséptico, antibacteriano y otros usos tradicionales por la población loreana.

El extracto acuoso de *C. lutea* fue preparado a partir de 300 gramos de hojas secas, se obtuvo un Rendimiento de 5,16%, encontrándose la relación de que por cada 300 g de hojas se obtiene aproximadamente 15,48 g de extracto acuoso de *C. lutea*.

La *C. lutea* en el análisis fitoquímico se ha encontrado saponinas, flavonoides, cumarinas, alcaloides y compuestos fenólicos, se presentó altos porcentajes de taninos realizados por análisis volumétricos, y la literatura nos indica que estos tipos de compuestos tienen actividad farmacológica.

En el análisis toxicológico se determinó el factor peso corporal donde no podría atribuirse a la administración del extracto acuoso de *C. lutea*, debido a la no diferencia significativa observada durante el ensayo con respecto al basal, pudiendo asumirse este incremento a la composición del alimento caracterizado por contener proteínas (48,40%), soya (22,20%), vitaminas y minerales (0,12%).

Del mismo modo en los resultados hallados de signos clínicos de toxicidad no se observaron signos relevantes según el anexo 2 (ficha de observación de signos clínicos) en el sistema autónomo, sensorial, neuromuscular, cardiovascular, respiratorio, ocular, gastrointestinal y cutáneas, a excepción de una leve sedación o estado de inactividad en un corto tiempo en todos los grupos experimentales tratados con el extracto acuoso de *C. lutea* a dosis de 25, 200 y 2000 mg/kg ni en el grupo control negativo, esto puede deberse al agotamiento y/o cansancio de los ratones albinos durante la observación; un estudio similar realizado por Saldaña L, (2019)¹³, en donde estudio la toxicidad del extracto acuoso de hojas de *C. lutea* "Bijao", obteniendo resultados que

dicho extracto es posible que presente un efecto tóxico o nocivo en los animales de experimentación (a dosis de 2000 mg/kg) al manifestarse alteraciones clínicas significativas al nivel hepático observados en comparación con el grupo control negativo.

Al finalizar el estudio de la observación y registro de signos clínicos/tóxicos, se sacrificaron todos los animales de experimentación, mediante la técnica de dislocación cervical, posteriormente se realizó el estudio macroscópico observando la coloración, consistencia y tamaño de los principales órganos (corazón, hígado, riñones, estómago), los cuales fueron comparados con el grupo control negativo, no encontrándose alteración o cambio en los aspectos mencionados, por lo cual se procedió a la preparación de los dos principales órganos diana (hígado y riñón) para la realización del estudio histopatológico.

Para el estudio histopatológico se envió secciones del tejido de hígado y riñón de todos los grupos de experimentación y control, observándose congestión sanguínea, degeneración hidrópica del hígado y degeneración tubular y áreas de nefritis en todos los grupos de tratamiento incluyendo el control negativo, pudiendo indicar que dicha alteración podría no deberse al extracto acuoso de *C. lutea*.

La investigación nos muestra que el extracto acuoso de las hojas de *C. lutea* "Bijao" a concentración de 1300 mg/mL, 1500 mg/mL, y 1700 mg/mL frente a *S. aureus*, *E. coli*, y *P. aeruginosa*, no presenta halo de inhibición, pudiendo indicar que las bacterias en estudio son resistentes al extracto acuoso de *C. lutea* bajo las condiciones de experimentación.

El procedimiento para la obtención del extracto acuoso utilizado en la experimentación podría no ser el adecuado con respecto a la forma tradicional del uso de *C. lutea* en el arte culinario y como antiséptico, podemos deducir que se podría utilizar las muestras frescas y así obtener resultados distintos, pero de acuerdo al procedimiento y bajo las condiciones de este estudio el extracto acuoso de *C. lutea* no posee toxicidad ni actividad antibacteriana.

Así mismo se podría utilizar un protocolo diferente a lo descrito en la normativa N° 423 de la OCDE, como, por ejemplo, un estudio relacionado a la toxicidad crónica con un mínimo de 90 días de experimentación, para obtener datos que contribuyan a garantizar la inocuidad de esta especie.

CAPITULO VI: PROPUESTA

En la actualidad es muy común el uso de plantas medicinales para el alivio de distintas patologías y constituyeron una gran ayuda para la población. Sin embargo, poco se sabe respecto a los posibles efectos tóxicos que puede traer consigo el consumo de dichas plantas, considerando la dosis, el tratamiento o su mal consumo. Por ello es necesario que los estudios farmacológicos se complementen con los toxicológicos, considerando que la línea que limita lo beneficioso de lo adverso es la dosis.

Este trabajo investigación al ser un estudio toxicológico agudo nos proporciona datos solo de los 14 días de observación experimental de acuerdo a las condiciones de laboratorio, pudiendo aparecer algún signo de toxicidad después de ese periodo de estudio. Por ello se recomienda otros ensayos que contribuyan con resultados más específicos como por ejemplo estudios de toxicidad crónica a 90 días.

Es de gran importancia la necesidad de mantener una proyección adecuada en cuanto a las condiciones bioéticas con estos animales, la manipulación y sus condiciones de vida aplicando el principio de las 3 Rs, además la dificultad geográfica para la adquisición de animales y lo costoso del mantenimiento hace difícil este tipo de estudio.

Respecto al estudio de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso, sería conveniente realizar el estudio utilizando otros métodos, tales como macrodilución en caldo, método directo, sembrado en espiral, que son más específicos, pero costosos.

También es conveniente realizar estudios con otras cepas ATCC o salvajes, del mismo modo, utilizar otros antibióticos como control positivo, contribuyendo a la obtención de resultados diferentes, fortaleciendo al presente trabajo de investigación.

CAPITULO VII: CONCLUSIONES

Se determinó la toxicidad aguda del extracto acuoso de hojas de *C. lutea* "Bijao" el ensayo se realizó según el Método de las Clases Tóxicas Agudas, descrito por la Normativa N°423 de la OECD, aplicados en ratones albinos.

Se obtuvo el extracto acuoso de hojas de *C. lutea* "Bijao" y se determinó su rendimiento aproximadamente en 5,16%; lo cual manifiesta que, por cada 300 g de hoja seca, se obtuvo 5,16 g de extracto acuoso seco.

Se determinó que la toxicidad aguda oral según el método de Clases Tóxicas Agudas (CTA) del extracto acuoso de hojas de *C. lutea* "Bijao" a dosis de 2000 mg/kg PC, 200 mg/kg PC y 25 mg/kg PC aplicados en animales de experimentación no presentan signos tóxicos de acuerdo a las condiciones y al tiempo de duración del estudio.

En la observación macroscópica se encontró alteración de una pequeña protuberancia, quiste, apéndice en los hígados de los ratones tratados con dosis de 2000 mg/kg PC y 200 mg/kg PC, siendo en uno de los hígados del grupo experimental a dosis de 2000 mg/kg PC., un poco más pronunciado que el resto de los ratones.

A través del método de difusión en agar o disco, se evaluó la actividad antibacteriana del extracto acuoso de las hojas de *C. lutea* a concentraciones de 1300 mg/mL, 1500 mg/mL, y 1700 mg/mL frente a *S. aureus*, *E. coli*, y *P. aeruginosa*, no se reportaron diámetros de inhibición, diciendo de esta manera que las bacterias estudiadas son resistentes al extracto acuoso.

CAPITULO VIII: RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar otros estudios de extracción de metabolitos secundarios, utilizando otros solventes, con el fin de extraer compuestos secundarios, teniendo en cuenta la polaridad de estos.
- ✓ Realizar estudios más exhaustivos considerando principalmente los resultados macroscópicos del hígado, durante y después del tratamiento con el extracto acuoso de hojas de *C. lutea* "Bijao", para detectar los posibles daños que puedan presentarse con el extracto.
- ✓ Complementar el estudio con pruebas bioquímicas de TGO y TGP, para obtener resultados de mejor calidad.
- ✓ Aplicar el método de difusión en agar o disco, utilizando concentraciones diferentes del extracto acuoso de *C. lutea*, a las utilizadas en este trabajo de investigación.
- ✓ Realizar pruebas antibacterianas utilizando, un diluyente diferente al DMSO, como por ejemplo la mezcla de etanol-agua (1:1), con el fin de facilitar la dilución del extracto acuoso de *C. lutea*.

CAPITULO IX: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Leiva Acebey L, Raylen Escobar Román I, Ariel Morales Espinosa J, Dra Yanicel Sorí León I, Gilberto Eugenio Escobar Vázquez II. Intoxicaciones agudas por plantas tóxicas reportadas por Centro de Toxicología de Villa. *Rev Cuba Plantas Med.* 2014;19(1):399–406.
2. Lagarto Parra A, Tillán Capó J, Vega Montalvo R, Cabrera González Y. Toxicidad aguda oral de extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales. *Rev Cuba Plantas Med.* 1999;4(1):26–8.
3. Layne Valeria Saldaña Mora. TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *Calathea lutea* “Bijao” EN RATONES ALBINOS BALB/C. *J Chem Inf Model.* 2019;
4. Nguyen HC, Lin KH, Hsiung TC, Huang MY, Yang CM, Weng JH, et al. Biochemical and physiological characteristics of photosynthesis in plants of two *calathea* species. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):1–13.
5. González MA, Suspe PA. Servicios ecosistémicos asociados al Bijao (*Calathea lutea*) en el Municipio de Moniquirá, Boyacá. 2017;1–105.
6. Gustavo Del Aguila Torres C. COMPORTAMIENTO DEL BIJAO (*Calathea inocephala* (Kuntze) H. Kenn. & Nicolson) BAJO DIFERENTES TÉCNICAS DE PROPAGACIÓN RIZOMÁTICA Y FERTILIZACIÓN CON MOLIMAX EN CAMPO DEFINITIVO, TINGO MARÍA. 2014;
7. Biodiversifica-t - Pronaturaleza. DEL JUANE SU BIJAO. 2014;1–17.
8. Alvaro Cogollo, Luz Stella Suarez Suarez, Carolina Robles, Doris Benítez R., Joaquin Antonio Uribe. Identificación, caracterización del habitat, conservación y uso de plantas de la familia Marantaceae en la jurisdicción de CORANTIOQUIA. 2007;76.
9. Repetto Jiménez M, Repetto Kuhn G. Toxicología Fundamental. Cuarta Edición. 2009. 620 p.
10. Arencibia-Arrebola DF, Rosario-Fernández LA, López-Feria Y, Fariñas-

- Medina M, Infante-Bourzac JF, Díaz-Rivero D, et al. Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda. *Rev Tóxicol en Línea*. 2003;1:1–15.
11. José Bello Gutiérrez, Adela López de Cerain Salsamendi. Fundamentos de Ciencia Tóxicológica. In: Madrid(España). 2001. p. 110–23.
 12. Al O, Jj M, Mt D, Upcytes HH, Garc C, Chang M, et al. Revista de toxicología. 2019;2(2017):83–172.
 13. Reyes ER. Estudio De Casos De Toxicidad. Introducción a la toxicología. 2016. 79–82 p.
 14. Hodson E. Modern toxicology. Vol. 111, *The British Journal of Psychiatry*. 2008. 1009–1010 p.
 15. Quintana G, Díaz M, Toboada W, Ortíz J. Minimal Inhibitory Concentration and Minimal Bactericidal Concentration of ciprofloxacin in uropathogens isolated at Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Rev Med Hered*. 2005;16(1):39.
 16. Iglesias Ramírez B, Rodríguez Obaya T. Métodos De Estudio En Histología. *SldCu*. 2015;1–13.
 17. Marcelo Augusto Nunes Medeiros, Diana Carmen Nunes de Oliveira, Dalia dos Prazeres Rodrigues, Daniel Roberto Coradi de Freitas. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Rev Panam la Salud*. 2011;30(6).
 18. Domingo D, López-Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioter*. 2003;16(4):385–93.
 19. Avila Liliana, Baquero Eduar, Viña Amparo, Murillo Elizabeth. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (ASTERACEAE) FRENTE A *Staphylococcus aureus* ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (ASTERACEAE) AGAINST *Staphylococcus aures*. *Vitae*. 2006;13(1):55–60.
 20. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity

of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian J Microbiol.* 2000;31(4):247–56.

21. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(4):564–82.
22. Hammer KA, Carson CF, Riley T V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol.* 1999;86(6):985–90.
23. Bauer K. 1.2. Método de difusión en agar según Kirby Bauer. 2010;4:5–6.
24. Pardo J. Patentabilidad de los extractos vegetales. 2002;40.
25. Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN Organismo Público Descentralizado de Sector Salud.

ANEXO

ANEXOS

1. Instrumentos de recolección de datos

Ficha de observación de signos clínicos

Ficha de Observaciones de Signos Clínicos

Órgano/Sistema: Signos Clínicos.

- Autónomo: Salivación, descarga nasal, diarrea, urinación, piloerección, exoftalmo, membranas nictitantes relajadas, rinorrea, sudoración.
- Comportamiento: Sedación, cabeza caída, posición sentada con cabeza erguida, depresión severa. Inquietud, acicalamiento excesivo, irritabilidad, comportamiento agresivo, hostilidad defensiva, fiereza, actividad bizarra, confusión.
- Sensorial: Reflejo derecho, sensibilidad al dolor, reflejo corneal, reflejo de los miembros posteriores, sensibilidad al sonido y al tacto.
- Neuromuscular: Actividad disminuida o incrementada, fasciculaciones, temores, debilidad, reflejo de los miembros posteriores (ausente o disminuida), tono muscular, ataxia, convulsiones, postración, debilidad de miembros posteriores.
- Cardiovascular: Alteración (incremento o disminución) de la frecuencia cardíaca, vaso constricción, vasodilatación, hemorragia.
- Respiratorio: Jadeo, disnea, apnea, hipoapnea.
- Ocular: Lagrimación, ptosis, nistagmo, midriasis, miosis, cicloplejia, Reflejo pupilar luminoso.
- Gastrointestinal: Salivación, náuseas, diarrea, evacuaciones sanguinolentas, constipación, defecación.
- Cutáneas: Piloerección, alopecia, sacudidas (perro mojado), eritema, edema, hinchazón, necrosis.

Ficha de registro de signos tóxicos

Signostóxicos	Marca	Observaciones	Tiempo de aparición	Tiempo de permanencia	Tiempo de reversibilidad
Autónomo					
Comportamiento					
Sensorial					
Neuromuscular					
Cardiovascular					
Respiratorio					
Ocular					
Gastrointestinal					
Cutáneas					

Registro de Signos Tóxicos.

MACHOS

Ficha de registro de observaciones macroscópicas

Observaciones Macroscópicas de los Órganos

MACHOS

Órgano	Coloración	Consistencia	Alteraciones Macroscópicas
Cerebro			
Corazón			
Pulmones			
Bazo			
Hígado			
Riñones			
Estómago			
Intestino Delgado			
Testículos/ Ovários			
Glândulas Suprarrenales			

Reporte de resultados de observaciones histopatológicas

RESULTADOS DE LECTURA DE LAMINAS HISTOPATOLOGICAS

PROCEDENCIA: Iquitos

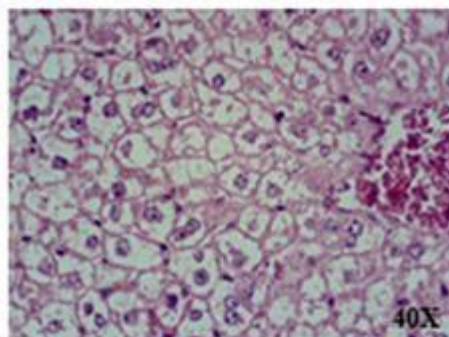
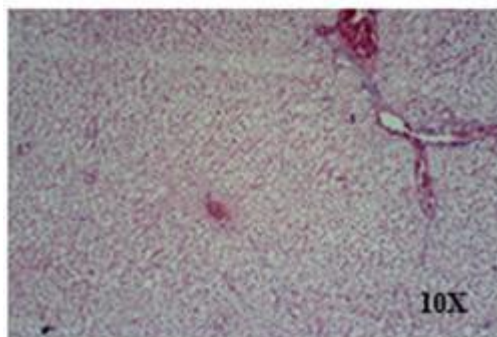
CÓDIGO DE LAMINA: Calathea lutea 200mg/kg Hígado

SOLICITADO POR:

A) MUESTRA: TEJIDO.

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA.

No refiere. Se remitió el órgano completo sumergido en formol. Se enviaron secciones del tejido para ser procesadas.



DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

- A 10x se observa congestión en los vasos sanguíneos del hígado
- A 40x se observa el parénquima hepático con degeneración hidrópica y congestión de vasos sanguíneos.

DIAGNÓSTICO: Congestión sanguínea y degeneración hidrópica del hígado



5

MV Cielo Llerena Zavala
CMVP 4200

➤ **Obtención del extracto acuoso**

Recolección de las hojas de Bijao



Secado de las hojas previamente lavadas



Pesado de las hojas secas y cortadas



Cocción a Temperatura de 60° y 70 °C



Filtración del extracto cocido



Extracto acuoso de *C. lutea*



➤ **Evaluación de la toxicidad**

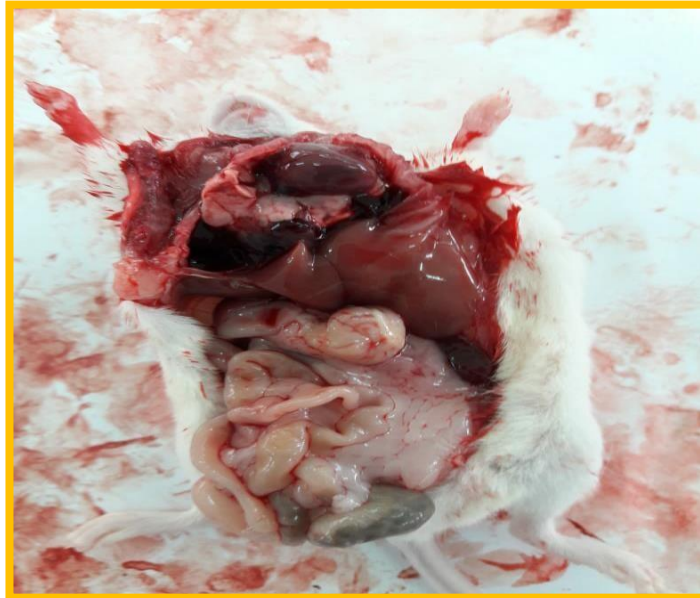
Solución de los extractos a concentraciones 2000 mg, 200 mg, 25 mg



Administración de las soluciones a diferentes concentraciones



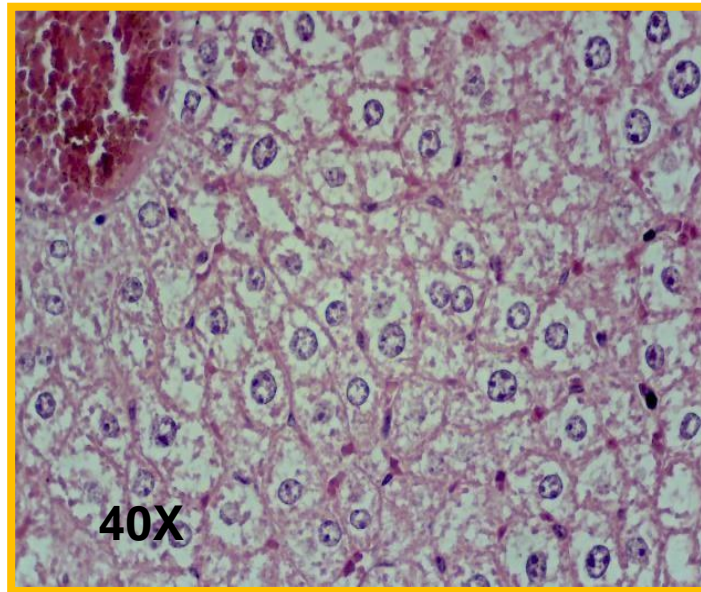
Realización de la autopsia a los 14 días de administración del extracto



Observación macroscópica de los órganos



Observación histológica de los órganos a 40x

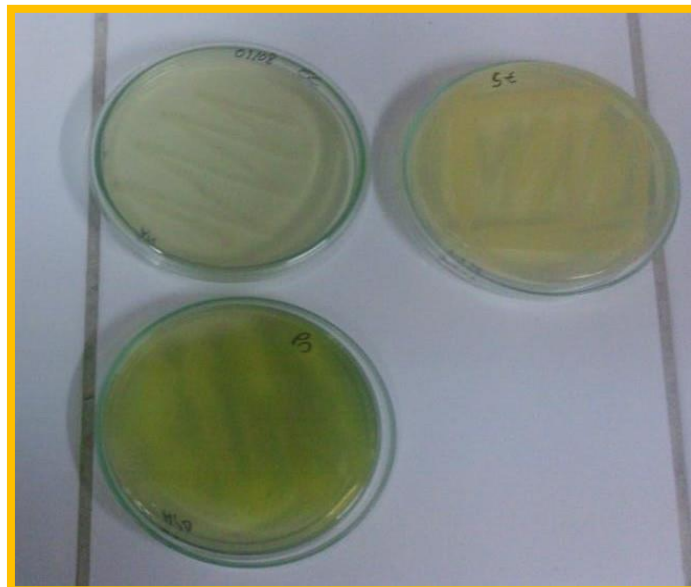


➤ **Evaluación de la actividad antibacteriana**

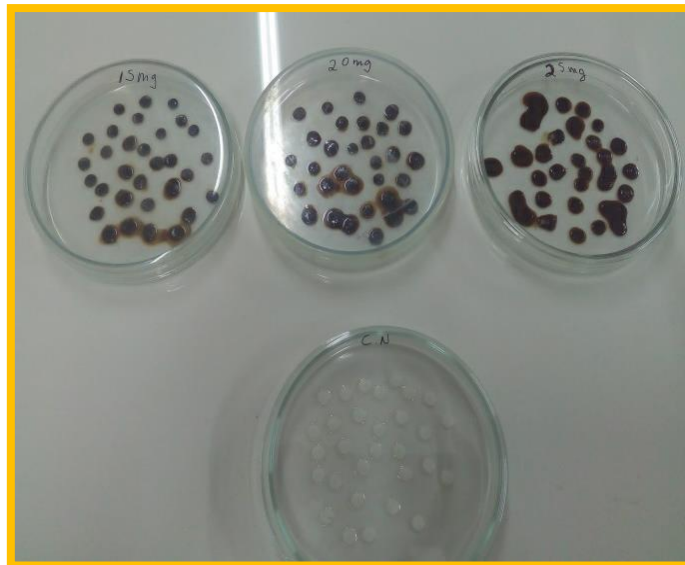
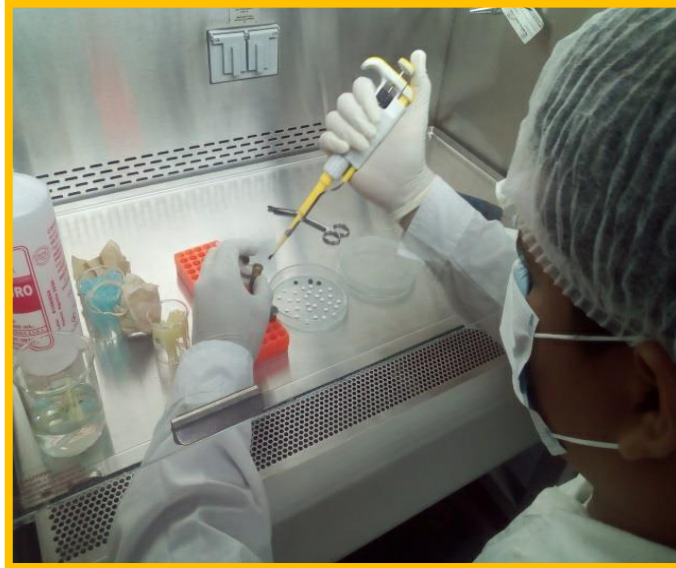
Materiales estériles, para la realizar la prueba antimicrobiana



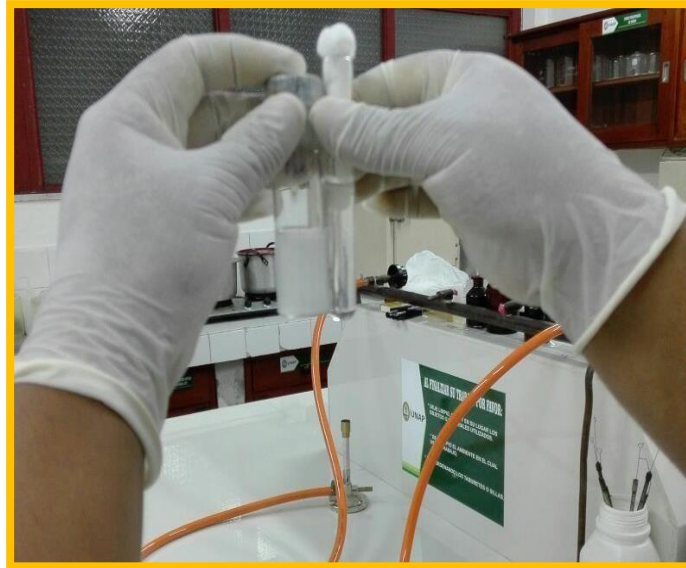
Activación de las bacterias



Impregnación de los discos con el extracto acuoso de *C. lutea* para la prueba de sensibilidad por el método de difusión en disco



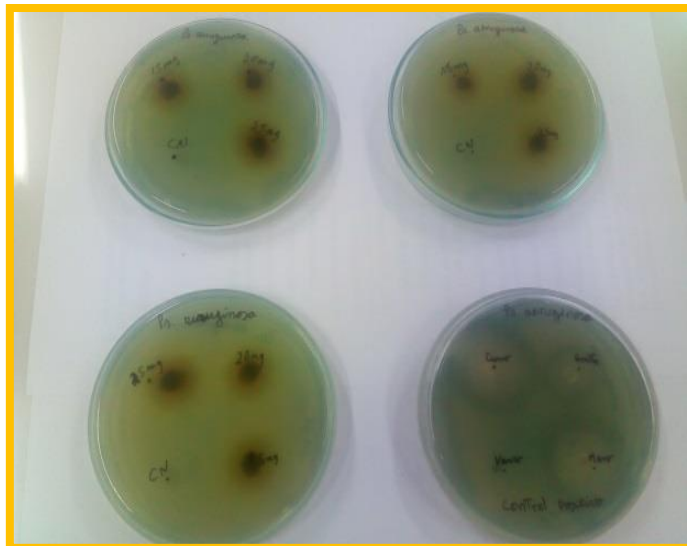
Preparación del inculo bacteriano



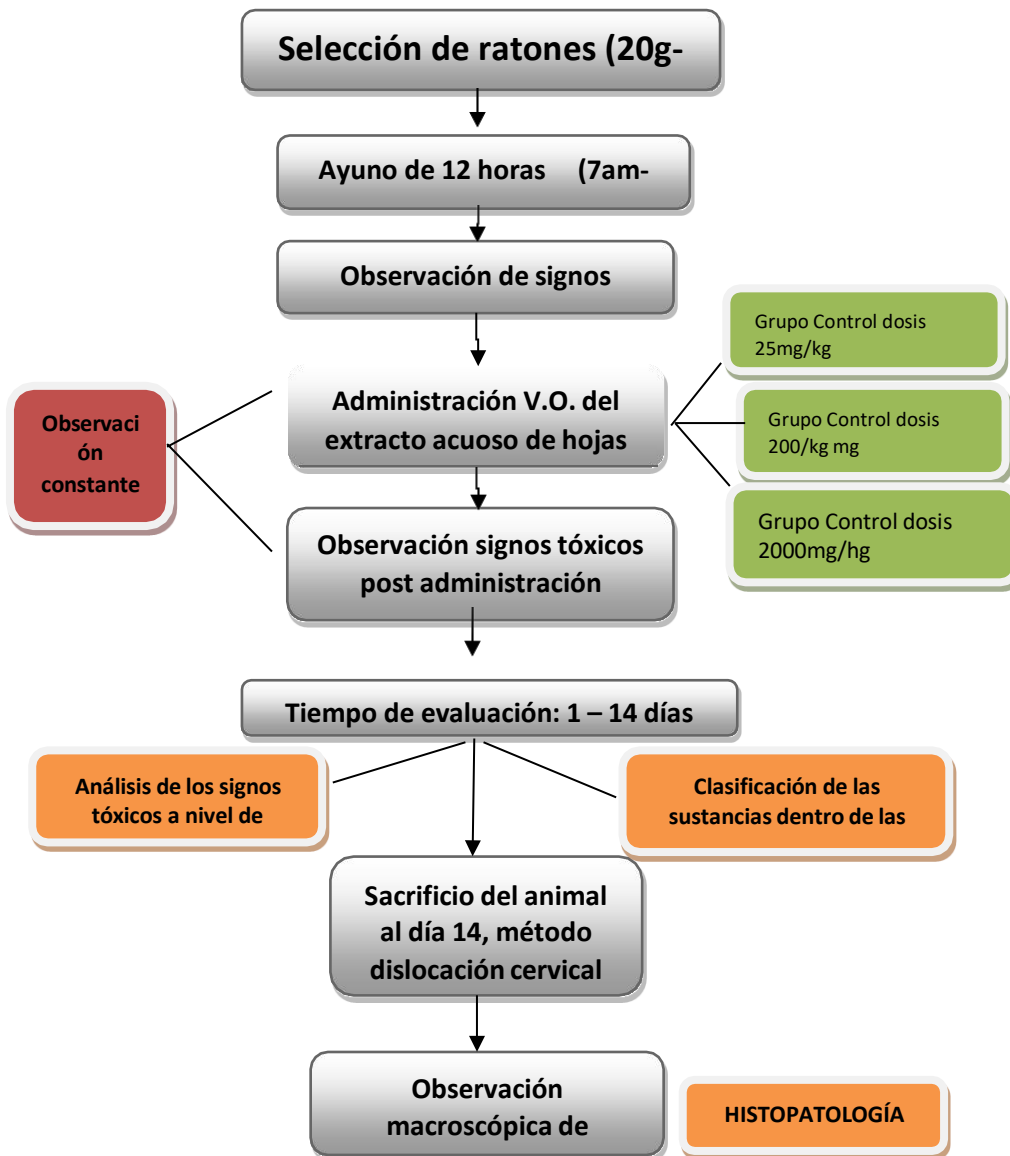
Aplicación de los discos impregnados con el extracto



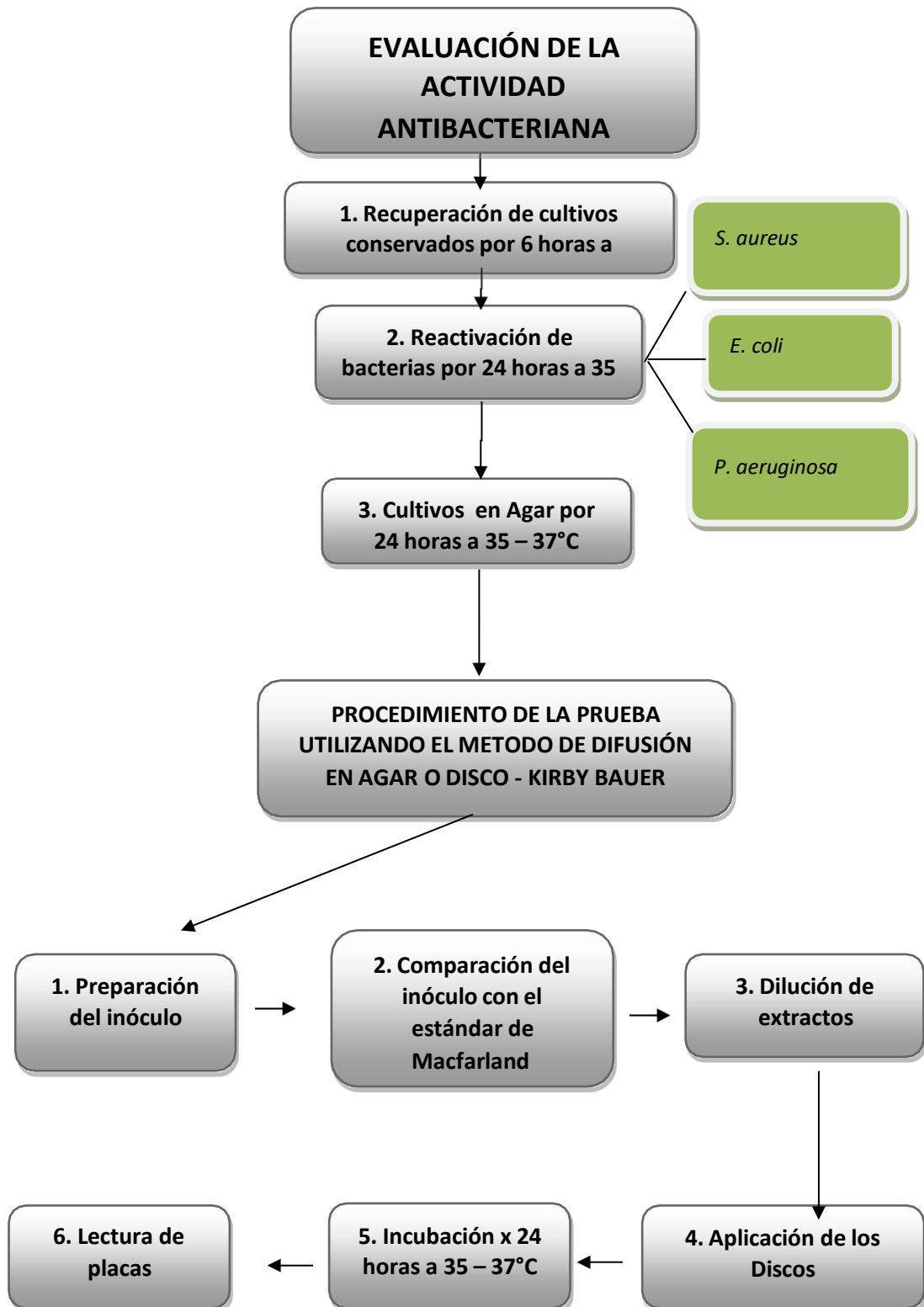
Resultados de los ensayos realizados, por el método de Kirby - bauer



Flujograma del proceso de evaluación de la toxicidad del extracto acuoso de *C. lutea*



Flujograma del proceso de evaluación de la actividad antibacteriana del extracto acuoso de *C. lutea*



Certificado sanitario de la muestra animal

184

**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS
COORDINACIÓN DE BIOTERIO**

CERTIFICADO SANITARIO Nº 184 - 2018

Producto : Raton albino	Lote N° : M-05-2018
Especie : Mus musculus	Cantidad : 120
Ejemplar : Faltan CNPB	Edad : 25-30 días
Peso : 15 - 24 g.	Sexo : 50 machos 70 hembras

Guía de remisión : 000007	Destino : UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA
----------------------------------	--

Chomillos : 20 - 00 - 2018

El Médico Veterinario, que suscribe: **Arturo Rosales Fernández**, Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias*.

*Referencia: PR T CNPB-153. Procedimiento para el Ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.

Chomillos, 20 de junio del 2018
(Fecha de emisión del certificado)

NOTA: El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales una vez que estos egresan del mismo.


M.V. Arturo Rosales Fernández
C.M.V.P. 155E



Constancia de Herbarium Amazonense de la muestra vegetal



Centro de Investigación de
Recursos Naturales
Herbarium Amazonense - AMAZ

INSTITUCION CIENTIFICA NACIONAL DEPOSITARIA DE MATERIAL BIOLÓGICO
CÓDIGO DE AUTORIZACION AUT-ICND-2017-005

CONSTANCIA

El coordinador del Herbarium Amazonense (AMAZ) del CIRNA, de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana

HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentado por Apagüeño Arévalo, Claudio Adriano y Tamant Guerra, Darwin Luciano, estudiantes de la Maestría en Salud Pública, de la Escuela de Postgrado, de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, perteneciente al proyecto de Investigación titulado: Estudio Toxicológico y Actividad Antibacteriana de hojas de *Coccoloba lutea* Schult. ("bija"); fue verificado y determinado en este Herbarium Amazonense (AMAZ), del Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA), de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP), como a continuación se indica:

N° Código AMAZ	Nombre científico	Familia	Nombre vulgar
003421	<i>Coccoloba lutea</i> Schult.	Marantaceae	"bija"

Se expide la presente constancia al interesado, para los fines que estime convenientes.

Atentamente,

Iquitos, 20 de septiembre, 2020


Bigo. Richard J. Huaranca Acosta
Coordinador de Herbarium AMAZ
CIRNA UNAP

