

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA**



**TESIS**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDIARREICA DEL  
EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE ACHIOTE (*BIXA  
ORELLANA*) EN RATAS ALBINAS, CEPA HOLTZMAN**

**Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico  
y Bioquímico**

**TESISTAS:**

**BACHILLER: ALAN GARCÍA LOPEZ**

**BACHILLER: AIDEE GUISELIA PARIACHI CASTRO**

**ASESOR:**

**MG. HENRY MONTELLANOS CABRERA**

**LIMA – PERÚ**

**2018**

**TÍTULO:**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDIARREICA DEL  
EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE ACHIOTE (*BIXA  
ORELLANA*) EN RATAS ALBINAS, CEPA HOLTZMAN**

## **DEDICATORIA**

Esta investigación la dedicamos a Dios por permitirnos llegar hasta este punto y habernos dado salud para lograr nuestros objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A nuestros padres y familiares por apoyarnos a lo largo de toda la carrera universitaria y de nuestras vidas; a todas las personas especiales que nos acompañaron en esta etapa, aportando a nuestra formación tanto profesional como personal; a todos ellos gracias por su apoyo para cumplir este objetivo.

**AIDEE – ALAN**

## **AGRADECIMIENTO**

La presente investigación se llevó a cabo gracias al apoyo de nuestro asesor Henry Montellanos, agradecer también a la Universidad Cayetano Heredia por abrirnos las puertas para que se lleve a cabo nuestra investigación y por supuesto a nuestra Universidad Inca Garcilaso de la Vega por habernos inculcado el espíritu investigador y la perseverancia para cumplir nuestras metas.

AIDEE – ALAN

## ÍNDICE GENERAL

Carátula	
Dedicatoria	
Agradecimiento	
Índice general	
Índice de tablas	
Índice de figuras	
Índice de anexos	
Resumen	
Abstract	
Introducción	1
<b>CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>3</b>
1.1 Descripción de la realidad problemática	3
1.2 Formulación del problema	4
1.2.1 Problema general	4
1.2.2 Problemas específicos	4
1.3 Objetivos de investigación	5
1.3.1 Objetivo general	5
1.3.2 Objetivos específicos	5
1.4 Justificación e importancia del estudio	5
<b>CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO</b>	<b>7</b>
2.1 <b>Antecedentes del estudio</b>	<b>7</b>
2.1.1 Nacionales	7
2.1.2 Internacionales	10

2.2	Bases teóricas	11
2.2.1	<i>Bixa orellana</i> L. (achiote)	11
2.2.1.1	Descripción general de la planta	11
2.2.1.2	Taxonomía	12
2.2.1.3	Origen de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote)	12
2.2.1.4	Características botánicas	13
2.2.1.5	Propiedades medicinales	15
2.2.1.6	Tipos de achiote	16
2.2.1.7	Composición química	17
2.2.1.8	Estudios de sus propiedades farmacológicas	19
2.2.1.9	Estudios toxicológicos	23
2.2.1.10	Estudios clínicos	23
2.2.2	Diarrea	24
2.2.2.1	Clasificación de la diarrea	25
2.2.2.2	Tratamiento de la diarrea	26
2.2.3	Loperamida	28
2.2.3.1	Mecanismos de acción	30
2.2.3.2	Farmacocinética	31
2.2.3.3	Tamizaje fitoquímico	33
2.2.3.4	Cromatografía de capa fina	34
2.3	Hipótesis	35
2.3.1	Hipótesis general	35
2.3.2	Hipótesis específicas	35
2.4	Variables	36
2.4.1	Tabla de operacionalización de variables	36
2.5	Marco conceptual	36
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA</b>		<b>39</b>
3.1	Tipo de estudio	39

3.2	Diseño de investigación	39
3.3	Población	40
3.4	Muestra	40
3.5	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	40
3.5.1	Tamizaje fitoquímico	40
<b>CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>		<b>54</b>
4.1	Presentación de resultados	54
4.2	Contrastación de hipótesis	62
4.3	Discusión y resultado	64
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>		<b>68</b>
5.1	Conclusiones	68
5.2	Recomendaciones	69
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>70</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1</b>	Marcha fitoquímica	54
<b>TABLA 2</b>	Prueba de solubilidad	55
<b>TABLA 3</b>	Tratamientos de experimentación de toxicidad aguda	56
<b>TABLA 4</b>	Tratamiento de experimentación con <i>Bixa orellana</i> L.(achiote) y loperamida	56
<b>TABLA 5</b>	Condiciones ambientales	57
<b>TABLA 6</b>	Resultados de toxicidad oral	58
<b>TABLA 7</b>	Resultados de la actividad antidiarreica	59
<b>TABLA 8</b>	Análisis estadístico de datos: actividad antidiarreica	60
<b>TABLA 9</b>	Análisis de varianza	60
<b>TABLA 10</b>	Análisis múltiple posterior: prueba de Tukey	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote)	13
<b>Figura 2</b>	Estructura química de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote)	18
<b>Figura 3</b>	Estructura química de la Loperamida	30
<b>Figura 4</b>	Mecanismo de acción de la Loperamida	31
<b>Figura 5</b>	Estructura básica de los flavonoides	32
<b>Figura 6</b>	Estructura química de los flavonoides más usuales	33
<b>Figura 7</b>	hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote)	42
<b>Figura 8</b>	Extracción acuosa de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote)	43
<b>Figura 9</b>	Evaluación Cromatografica	48
<b>Figura 10</b>	Cromatografía en capa fina “alcaloides”	49
<b>Figura 11</b>	Cromatografía en capa fina de “flavonoides”	50
<b>Figura 12</b>	Identificación de metabolitos.	55
<b>Figura 13</b>	Efectividad de los extractos de achiote y loperamida en porcentajes.	62

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Matriz de consistencia	78
Anexo 2	Testimonio fotográfico	79
Anexo 3	Constancia sobre la taxonomía de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote)	90
Anexo 4	Certificado del óptimo estado de ratas	91
Anexo 5	Ficha de recolección de datos	92

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar la actividad antidiarreica del extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) por inducción con aceite de ricino y a posterior la administración de carbón activado para la determinación del tránsito intestinal del extracto en estudio. El extracto se preparó mediante el método de extracción sólido líquido en continuo. Se determinaron los tipos de metabolitos mediante el tamizaje fitoquímico, cromatografía en capa fina y prueba de espectrofotometría en el UV – vis para la cuantificación total de alcaloides y flavonoides. Las concentraciones del extracto administrado fueron de 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg, En la prueba de actividad antidiarreica, la muestra fue administrada mediante sondas nasogástricas a un total de 25 ratas distribuidas de la siguiente forma: tres niveles de dosis en 5 ratas albinas que se administró 250 mg/kg.; 5 ratas albinas de 500 mg/kg.; 5 ratas albinas, de 1000 mg/kg. ; 5 ratas control positivo, tratadas con el medicamento Loperamida a la dosis de 20 mg/kg, y 5 ratas control negativo sin tratamiento alguno, animales normales sin tratamiento todo de la cepa Holtzman. El estudio duró 14 días, se analizaron estadísticamente los resultados para evaluar el efecto del producto con niveles de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ) por el test de ANOVA y luego por uno de comparación múltiple (Test de Tukey) para determinar si existen diferencias significativas. Los resultados muestran que el mayor efecto antidiarreico se dio con la dosis de 1000 mg/kg (66.621%), y con la dosis de 500 mg/kg (54.203%) comparable y casi semejante al control positivo loperamida (71.258%). Cabe precisar que a la dosis de 250 mg/kg de extracto acuoso no se produjo algún efecto antidiarreico significativo observable. La concentración de 1000 mg/kg presenta un porcentaje de mayor efecto antidiarreico a concentración de la Loperamida.

**Palabras claves:** actividad antidiarreica, *Bixa Orellana* L. (achiote)

## ABSTRACT

The objective of this research was to determine the antiarrhythmic activity of the aqueous extract of achiote leaves (*Bixa Orellana* L.) by induction with castor oil and subsequent administration of activated charcoal for the determination of intestinal transit of the extract under study. . The extract was prepared by continuous liquid solid extraction method. The types of metabolites were determined by phytochemical screening, thin layer chromatography and UV - vis spectrophotometry for the total quantification of alkaloids and flavonoids. The concentrations of the administered extract were 250mg / kg, 500mg / kg, 1000mg / kg. In the antidiarrheic activity test, the sample was administered by nasogastric tubes to a total of 25 rats distributed as follows: three dose levels in 5 albino rats that were administered 250mg / kg; 5 albino rats 500mg / kg; 5 albino rats, 1000mg / kg. ; 5 positive control rats, treated with the drug Loperamide at the dose of 20 mg / kg, and 5 negative control rats without any treatment, normal animals without treatment all of the Holtzman strain. The study lasted 14 days, the results were analyzed statistically to evaluate the effect of the product with significance levels of 95% ( $p < 0.005$ ) by the ANOVA test and then by a multiple comparison test (Tukey test) to determine if there are significant differences. The results show that the highest antidiarrheal effect occurred with the dose of 1000 mg / kg (24.62%), and with the dose of 500 mg / kg (33.78%) comparable and almost similar to the positive control (21.2%). It should be noted that at the dose of 250 mg / kg of aqueous extract there was no significant observable antidiarrheal effect. The concentration of 100mg / kg presents a percentage of greater antidiarrheal effect at the concentration of Loperamide.

**Keywords:** antidiarrheal activity, *Bixa Orellana* L.

## INTRODUCCIÓN

Las conocidas enfermedades diarreicas, de acuerdo con la OMS, son la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco años. Estas infecciones intestinales alcanzan hasta un 7% del total de causa de concurrencia a la asistencia médica, problemática que se mantiene entre otros aspectos debido, principalmente a la permanencia de factores asociados a la pobreza extrema: como la carencia de la dotación de un saneamiento básico y la desnutrición infantil. En el Perú, la morbilidad por EDA, en los últimos años, prácticamente no ha sufrido cambios significativos. Sin embargo, la mortalidad a causa de estas enfermedades se ha reducido significativamente, entre otras razones por los programas y actividades desarrolladas institucionalmente por el Ministerio de Salud del Perú (MINSA) sostenida por la participación de la comunidad organizada, que paulatinamente ha ido incorporando buenas prácticas en el tratamiento de los procesos diarreicos, como la rehidratación oral y otros<sup>(1)</sup>. Estas enfermedades tienen una raíz etiológica diversa siendo básicamente de carácter infecciosas originadas por la presencia de parásitos, bacterias, así como virus, relacionadas además por las condiciones de un país con precarias condiciones de atención de salud. La incidencia de estas enfermedades es de carácter estacional, de ese modo, los proceso diarreicos causados por agentes bacterianos tienen su mayor producción en los meses de enero a marzo, es decir, al verano; mientras que en los meses de invierno, se incrementan las enfermedades causadas por los virus.

En los últimos 20 años en nuestro país, se ha podido identificar un conjunto de agentes entero patógenos, y se ha observado la presencia de bacterias como la *Escherichia coli* (*E.coli* entero patógena-ECEP, *E.coli* enteroinvasiva-ECEI y *E. coli* enterotoxigénica ETEC), *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp. *Aeromonas* spp. Y *Vibrios* spp., de los denominados parásitos tales como *Giardia lamblia*, *Entamoeba hystolitica* y *Cryptosporidium* spp, entre otros; así como de Rotavirus<sup>(1)</sup>.

De otro lado, actualmente en nuestro país, la medicación a partir de plantas medicinales es ampliamente difundida, en cuyo espectro la *Bixa orellana* L. (achiote) es considerado una planta de mucha importancia. En diversas zonas del país, las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) son utilizadas para el tratamiento de la inflamación de la próstata y en su forma de infusión, para tratar los procesos de la gastritis y la úlcera, aun cuando esta última forma de tratamiento tiene poca difusión y es en la región de la selva alta donde tiene mayor uso.

En esta consideración, resulta de gran importancia e interés el estudio de *Bixa orellana* L. (achiote) en sus componentes fitoquímico, farmacológico y toxicológico, además se debe considerar las condiciones y características que debe poseer todo Fito medicamento, especialmente de ser seguro, ser eficaz y ser de calidad <sup>(2)</sup>.

En este contexto, el estudio, a través de determinar el efecto antidiarreico del extracto acuoso de la hoja de *Bixa orellana* L. (achiote), tiene el propósito de contribuir a su conocimiento científico y servir de fuente para la posibilidad de la elaboración y desarrollo de fármacos orales a partir del principio activo responsable de esta propiedad.

# **CAPÍTULO I:**

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **1.1 Descripción de la realidad problemática**

Un problema latente en temas de salud, a nivel mundial, son las enfermedades diarreicas, con mayor notoriedad en países en vías de desarrollo o en desarrollo, en estos lugares posee un índice de mortalidad en niños con edad inferior a los cinco años.

Son dos millones de muertes al año producto de enfermedades diarreicas agudas. Cabe resaltar que, fallecen 112 mil personas en América, al año, debido a este tipo de enfermedades <sup>(1)</sup>.

Durante el 2017, en el Perú, se detectaron más de 423 mil casos de enfermedades diarreicas agudas, el departamento con mayor índice sobre este tipo de enfermedades es Lima, el cual reportó más de 114 mil casos, la segunda fue Arequipa con casi 36 mil casos. En comparación con el 2016, los casos de enfermedades diarreicas agudas se redujeron en un 0,7% en La Libertad, que ya presentó un descenso de 14,2%, sin embargo, el aumento continúa en otros lugares como Lambayeque, el cual detectó un aumento de 19,6%. De igual forma, Moquegua posee el índice más alto de incidencia, posteriormente, se encuentra Tacna, Arequipa, Ucayali y Pasco<sup>(3)</sup>. Del total de episodios de EDA, casi el 59% fueron niños inferiores menores a cinco años, del cual, el 29% es de uno a cuatro años y el 18% prevalece en menos de un año. En referencia al 2016, se deduce que existe un impacto mayor en los niños mayores a cinco años en comparación con lo de 1 a 4 años <sup>(3)</sup>.

El alto índice de incidencias de enfermedades diarreicas agudas, principalmente en los niños, es un grave problema, de continuar así, la tasa de mortalidad aumenta, lo que significa un grave problema para la sociedad.

Por ello, se sugiere investigar con rigurosidad sobre las plantas que contribuyan con la mejora de estas enfermedades, para luego ser utilizadas en todas las partes del mundo, además el costo, en comparación a los fármacos es más accesible. Asimismo, el uso de achiote sugiere aliviar los malestares de diversas enfermedades, no obstante, es importante investigar los efectos secundarios que estas puedan producir.

## **1.2 Formulación del Problema**

### **1.2.1 Problema general**

- ¿El extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) poseerá actividad antidiarreica en ratas inducidas con aceite de ricino?

### **1.2.2 Problemas específicos**

- ¿Cuál es la actividad antidiarreica del extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) comparado con loperamida en ratas inducidas con aceite de ricino?
- ¿En qué concentración el extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) poseerá actividad antidiarreica en ratas inducidas con aceite de ricino?
- ¿Qué metabolitos secundarios presenta en mayor concentración el extracto acuoso de *Bixa orellana* L. (achiote) que genera la actividad antidiarreica?

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1. Objetivo general**

- Comprobar la actividad antidiarreica del extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) en ratas inducidas con aceite de ricino.

### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Comparar la actividad antidiarreica del extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) con loperamida en ratas inducidas con aceite de ricino.
- Determinar la concentración del extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) con actividad antidiarreica en ratas inducidas con aceite de ricino.
- Determinar algunos metabolitos secundarios con mayor presencia en el extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) que genera la actividad antidiarreica.

## **1.4 Justificación e importancia del estudio**

La investigación es de mucha importancia porque tiene el propósito de contribuir con el conocimiento sobre la seguridad y efecto del extracto acuoso de la hoja de *Bixa orellana* L. (achiote), en el tratamiento de antidiarreico. Esta es una de las patologías frecuentes en nuestro medio sobre todo en la población (niños), por esto, se contribuirá a dar una respuesta al uso seguro de esta hoja de achiote como una nueva alternativa de tratamiento.

El estudio, además, se justifica porque busca proporcionar evidencias científicas sobre el uso terapéutico adecuado, en las personas que padecen de diarreas, así como contribuir al desarrollo de su producción con fines terapéuticos.

Los resultados del presente estudio podrán beneficiar a la población en general, y directamente a quienes padecen de diarrea, ya que aportará bases científicas sobre el uso eficaz y seguro de la hoja de *Bixa orellana* L. (achiote). Asimismo, los que cultivan esta planta pueden beneficiarse con la investigación en cuanto se demuestra su actividad antidiarreica.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes del estudio

#### 2.1.1 Antecedentes nacionales

**Sumari, L (2008)** <sup>(4)</sup> Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos e hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de ocho ecotipos de *Bixa orellana* L. (achiote), frente a, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, a través de los métodos de Disco difusión y de macrodilución en medio líquido. Los resultados de la capacidad antimicrobiana revelaron actividad de los extractos acuosos a 50 mg/mL, frente a las bacterias Gram positivas (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*). La actividad de los ocho ecotipos fue moderada contra *Staphylococcus aureus*, mientras que con *Enterococcus faecalis* sólo fueron los ecotipos 3 y 6; los extractos hidroalcohólicos a 50 mg/mL de los ocho ecotipos de *Bixa orellana* L. (achiote) presentaron moderada actividad contra *Staphylococcus aureus*, con *Escherichia coli* sólo el ecotipo 3 fue moderadamente activo, y con *Enterococcus faecalis* los ocho ecotipos presentaron baja actividad antimicrobiana. En la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos acuosos contra *Enterococcus faecalis*, se evidenció baja actividad antimicrobiana para el ecotipo 3 y los ecotipos 4 y 6 (CMI de 6.67 y de 8.1 mg/mL respectivamente), mientras que con *Staphylococcus aureus* los ocho ecotipos mostraron moderada actividad, con valores de CMI entre 2.67 y 6.67 mg/mL; en cuanto a los extractos hidroalcohólicos de los ocho ecotipos de *B. orellana*. La actividad antimicrobiana fue moderada frente a *Staphylococcus aureus* (CMI entre 1.67 y 3.33 mg/mL), siendo los ecotipos-1, 2 y 5 quienes presentaron los menores valores (CMI de 1.67 mg/mL), sin embargo, los ecotipos

presentaron baja actividad contra *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con CMIs de 6.67 - 13.33 mg/mL y con CMI de 8-13.33 mg/mL.

**Rojas, R. (2012)** <sup>(5)</sup> Evaluó la actividad antioxidante in vitro y determinar la concentración de polifenoles totales, de extractos de *Bixa orellana* L. (achiote) en sus ocho morfotipos existentes en la ciudad. Se obtuvieron los extractos metanólicos a partir de las hojas que previamente fueron secados en estufa a 60°C por 24 horas y molidos. Para antioxidantes fue por maceración de 48 horas a temperatura ambiente y para polifenoles totales fue por maceración a 60°C. Se cuantificaron los polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu. La capacidad antioxidante se midió por el método de DPPH. Fue el morfotipo 5 de las ocho morfotipos el que presentó mayor porcentaje de inhibición frente al radical DPPH\*\*\* con  $86.171 \pm 0.611\%$ , y el de menor porcentaje de inhibición fue el morfotipo 3 con  $79.899 \pm 1.261$ . La capacidad antioxidante medida como IC50 (Concentración Inhibitoria al 50%) en cuanto a los polifenoles totales el morfotipo 3 fue el que presentó mayor cantidad de polifenoles totales con  $48,719.738 \pm 0,3581$  mg de CTQ\*\*/100g y el que tuvo menor cantidad de polifenoles totales fue el morfotipo 4 con  $43,445.673 \pm 0,523$  mg de CTQ\*\*/100g. La correlación entre el promedio de la concentración de polifenoles totales y la capacidad de inhibición al 50% de los extractos *Bixa orellana* L en los 8 morfotipos fue negativa porque no existió diferencia estadística significativa corroborados en la prueba t con nivel de significancia de 0,05.

**Troncoso, H. (2014)** <sup>(6)</sup> determinó el efecto in vitro de los extractos acuosos y etanólicos de *Bixa orellana* L. (achiote) para darle un valor agregado a dicho cultivo. Se obtuvieron los extractos secos acuosos y etanólicos del material vegetal (hojas y corteza) de *Bixa orellana* L. (achiote) mediante los métodos de maceración e infusión. Obteniendo rendimientos de 15,02 % para hojas y 4,00 % para corteza por el método de maceración y rendimientos de 17,78 % para hojas y 10,50 % para corteza por el método

de infusión. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) por el método de dilución en tubo y dilución en placa de los extractos frente a *Staphylococcus aureus*. Mediante la marcha Fitoquímica que se realizó a los extractos acuosos y etanólicos de *Bixa orellana* L. (achiote); se observa la presencia de metabolitos secundarios como Taninos, Flavonoides, Alcaloides, Fenoles y Saponinas. Los extractos etanólicos de hojas y corteza con actividad antibacteriana poseen dos de los metabolitos secundarios que influyen en la actividad antibacteriana como son los flavonoides y taninos. El extracto etanólico de hojas posee también compuestos fenólicos que se considera el por qué tiene mayor actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*. Los resultados obtenidos justifican el uso de hojas y corteza dándole un valor agregado al cultivo de *Bixa orellana* L. (achiote).

**Muñoz, L. (2015)** <sup>(7)</sup> determinó los fitoconstituyentes mediante reacción de coloración, precipitación y cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales presentes en las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote). Los métodos utilizados son los que describen la Norma Ramal para drogas crudas del MINSAP y los resultados se encuentran dentro de los rangos permisibles de ésta. Se preparó el extracto por reflujo, al cual se le determinó: tamizaje fitoquímico propuesta por Olga Loock (alcaloides, triterpenos/esteroides, antocianidinas, flavonoides, saponinas y taninos.), así mismo se cuantificó los flavonoides totales expresados como quercetina mediante espectrofotometría UV/Visible a 256 nm (longitud de onda de máxima absorción), encontrándose en un porcentaje promedio de 1.25%. Los resultados obtenidos fueron evaluados en el programa Microsoft Excel 2010 de Microsoft Office para la realización del análisis estadístico correspondiente.

**García, M. (2016)** <sup>(8)</sup> Determinó el efecto del extracto hidroalcohólico de *Bixa orellana* L. (achiote), comparada con Metformina, sobre los niveles de glicemia en *Rattus rattus*, mediante estudio experimental, prospectivo, longitudinal, comparativo y analítico. Se utilizaron 20 ratas macho tipo *Rattus rattus*, variedad albinos, adultos, en 2 grupos de 10 cada uno, a los

cuales se les inyectó vía intraperitoneal aloxano. Resultados: grupo *Bixa Orellana* L. (achiote): preprueba:  $439.8 \pm 77.2$  mg/dl, post-prueba:  $408.8 \pm 143.1$  mg/dl, significancia 0.56. ( $p > 0.05$ ). Grupo Metformina: pre-prueba:  $426.1 \pm 122.6$  mg/dl, post-prueba:  $411.4 \pm 110.7$  mg/dl, significancia 0.69. ( $p > 0.05$ ). La diferencia de grupos fue, achiote:  $408.8 \pm 143.1$  mg/dl, Metformina  $411.4 \pm 110.7$  mg/dl, significancia 0.97. ( $P > 0.05$ ). Conclusión: El extracto hidroalcohólico de *Bixa Orellana* L. (achiote) y Metformina, disminuyen los niveles de glicemia en ratas.

**Huamán O, et al. (2017)** <sup>(9)</sup> Determinaron el efecto del extracto hidroalcohólico de hojas *Bixa Orellana* L. (achiote) sobre los niveles de grupos sulfidrilos no proteicos (GS-NP), moco gástrico, pH y acidez total de la secreción gástrica. Para evaluar el efecto del extracto sobre la mucosa gástrica se utilizó el modelo de la ligadura pilórica, propuesto por Vissher y modificado por Sandoval. En la determinación de GS-NP se utilizó el método de Sadlak y Lindsay; la producción de moco gástrico fue según Corne, el pH por potenciómetro y la acidez total por titulación con NaOH. Resultados: El extracto hidroalcohólico de hojas de *Bixa Orellana* L. (achiote) incrementó los GS-NP en 133 y 168% ( $p < 0,01$ ), a las dosis de 100 y 200 mg/kg, y la producción de moco, en 39,4% y 44,9 %, respectivamente, a las dosis de 200 y 400 mg/kg.

### 2.1.2 Antecedentes internacionales

**Robalino, et al. (2014)** <sup>(10)</sup> Evaluaron el efecto antidiarreico y cicatrizante de la infusión y del extracto etanólico de *cyclosporum leptophyllum*, Sprague en ratones (*mus musculus*) y conejos (*oryctologus cuniculus*)". Los resultados fueron que el *Cyclosporum leptophyllum* presenta actividad cicatrizante eficaz y eficiente en heridas incisas, con relación al control positivo (Lamoderm), al presentar menor tiempo de cicatrización, y menor longitud de la cicatriz. Así también la infusión de *Cyclosporum leptophyllum* es eficaz en el tratamiento contra la diarrea en una

concentración del 5% en agua e ineficaz a una concentración de 10% en comparación con la Loperamida.

**Astacio, J. (2011)** <sup>(11)</sup> Determinó el efecto citoprotector del extracto acuoso de hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) en úlceras gástricas inducidas por indometacina en un modelo de ratones”. Resultados: A la hora del análisis de las muestras enviadas a patología, se deduce que el uso del achiote disminuyó las lesiones gástricas, protegiendo mucosa. Se concluyó que el *Bixa orellana* L. (achiote) presenta tendencia a disminuir MDA en comparación de otros factores citoprotectores.

**Ancheta, J (2011)** <sup>(12)</sup> Determinó el efecto cicatrizante del extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) en úlceras gástricas inducidas por indometacina en ratones. Las hojas de achiote son ricas en: taninos, compuestos fenólicos, quercetina, alcaloides, como bixina y nor bixina, y los flavonoides, es por esa razón, por lo cual se concluye que el efecto gastroprotector del macerado de achiote que fue utilizado aumentando los niveles de prostaglandinas. Conclusiones: El macerado de *Bixa orellana* L. (achiote) tiene tendencia a ser citoprotector. El macerado de *Bixa orellana* L. (achiote) mantiene valores de ph gástrico cercanos a los valores normales.

## **2.2 Bases Teóricas**

### **2.2.1. *Bixa orellana* L. (achiote)**

#### **2.2.1.1 Descripción general de la planta** <sup>(13)</sup>

La *Bixa orellana* L. (achiote) es una especie vegetal de la familia *Bixaceae* de tipo arbustiva, es una planta cultivada de carácter perenne, que alcanza la altura de entre 3 y 10 metros. Sus hojas se caracterizan por ser simples, grandes, de forma acorazonada y dispuesta de manera alterna de bordes lisos y con largos pecíolos.

Las flores tienden a ser de coloración rosada con tonación descendente, de acuerdo a los diferentes tipos de planta, además, es hermafrodita. El fruto

tiene forma ovoide, el cual mide entre dos a cinco centímetros de diámetro. Asimismo, es de colación diversa y en diversas tonalidades, tales como rojo, verde, naranja, amarillo. El fruto posee entre diez a cincuenta semillas de forma triangular, tienden a adoptar una coloración roja y es de tamaño pequeña con una viscosidad del mismo color de la semilla.

El achiote se desarrolla con amplitud en zonas tropicales y puede adaptarse a diversos suelos y también a climas de distintos tipos. El achiote se desarrolla, por lo general, en lugares bajos. Puede desarrollarse en lugares de entre 24 hasta 35 °C, esto quiere decir que el achiote no se desarrolla adecuadamente en lugares de bajas temperaturas. Los arbustos comerciales tienen una edad de tres a cuatro años. Con respecto a su cosecha, los frutos del achiote son cortados con el propósito de separarlos de las semillas. En relación al tiempo de secado varía entre tres a cuatro días o puede usarse la secadora industrial para luego ser comercializados.

#### **2.2.1.2 Taxonomía**

**Phyllum:** *Bixa Orellana L.*

**Subphyllum:** *Spermatophyta*

**Clase:** *Magnoliophytina*

**Subclase:** *Magnoliopsida*

**Orden:** *Dilenidas*

**Familia:** *Violales*

**Subfamilia.** *Bixaceas*

#### **2.2.1.3 Origen del *Bixa orellana* L. (achiote)**

Especie que tiene sus orígenes en la zona tropical de América, posiblemente del suroeste de la Amazonía. Esta planta se produce desde el Caribe hasta Argentina y Brasil, y son distribuidos a los países tropicales.



**Figura 1.** Hojas de *Bixa orellana* L. (achiote).

Fuente: Centro de Información Ambiental de la Cuenca (CIAC)<sup>(13)</sup>.

#### **2.2.1.4 Características botánicas**

##### **a) Forma**

Es un arbusto que llega a crecer hasta una altura de diez metros, y de veinte a treinta centímetros de diámetro<sup>(14)</sup>.

##### **b) Hojas**

Las hojas son de tamaño grande y ovaladas con pecíolos delgados, miden entre nueve a diecinueve centímetros de largo por seis a once de ancho<sup>(14)</sup>.

##### **c) Tronco / Ramas**

El tronco tiene una forma cilíndrica, con respecto a las ramas, estas son delgadas y de coloración verde y café<sup>(14)</sup>.

##### **d) Corteza**

Posee una savia naranja y viscosa. Es de coloración café en la parte externa, ya que internamente tiene un color amarillo o amarillo naranja<sup>(14)</sup>.

### **e) Flor(es)**

Son de inmensas, de coloración blanca, rojo o rosado, mide entre cuatro a seis centímetros de diámetros. Sus pétalos suelen ser redondos y anchos<sup>(14)</sup>.

### **f) Fruto(s)**

Tiene forma ovoide, puede medir de tres a cinco centímetros de largo y de tres a cinco centímetros de diámetro. Es de color pardo-rojiza y puede llegar a albergar hasta cincuenta semillas <sup>(14)</sup>.

### **g) Semilla(s)**

Tienen forma triangular y de tamaño pequeño, mide de 5 a 5.5 mm de largo y de 4 a 5 mm de ancho. Posee una testa roja y pulposa, y su albumen es carnoso <sup>(14)</sup>.

### **h) Raíz**

La raíz de esta planta tiende a ser muy extensa <sup>(14)</sup>.

### **i) Sexualidad**

Hermafrodita

### **j) Número cromosómico.**

$2n = 14, 16.$

### **k) Hábitat**

El achiote puede desarrollarse en zonas de diferentes tipos de climas, especialmente debe ser húmedos, cálido o semi cálidos, es decir, la temperatura puede variar entre veinte y treinta grados centígrados. En relación al tipo de suelo, esta planta se adapta con facilidad a diversos tipos de suelo. No obstante, también puede desarrollarse en zonas con poca fertilidad <sup>(15)</sup>.

### 2.2.1.5 Propiedades medicinales

**Antiemético** (contra los vómitos de sangre): Se recomienda consumir el achiote a través de infusiones u hojas molidas o machacadas <sup>(16)</sup>.

**Remedio contra el cianuro y ácido cianhídrico:** Se recomienda consumir esta planta a través del consumo de frutos o infusiones.

**Homeostático:** El achiote sirve para contrarrestar los síntomas de las hemorroides, angina y abscesos <sup>(16)</sup>.

**Cefálico:** Su forma de utilización es a partir de las hojas machacadas, en forma de pasta las que se aplican en la sien y en la frente.

**Para dolencias del aparato respiratorio y afecciones de la garganta:** Se recomienda las infusiones provenientes de las semillas y hojas <sup>(16)</sup>.

**Para Malestares hepáticos:** Se utiliza sus semillas y su tinte, y también se toma el cocimiento de los cogollos <sup>(16)</sup>.

**Dolor de riñones:** Se recomienda consumir las hojas sancochadas.

**Inflamación de la piel y malestares de la zona vaginal:** Se debe añadir el macerado acuoso a partir de sus hojas.

**Para la malaria, diurético y asma:** ingerir la raíz cocida.

**Sirve como cicatrizante,** con la utilización de las hojas maceradas, luego se deberá limpiar la zona afectada con las hojas cocidas <sup>(17)</sup>.

**Hipertensión:** Ingerir el macerado acuoso de sus hojas.

**Conjuntivitis:** Aplicación en los ojos del macerado acuoso del tallo o de las hojas <sup>(17)</sup>.

**Vómitos y fiebre:** Se toman las hojas en infusión utilizando tres hojas por taza y beber tres tazas por día <sup>(17)</sup>.

**Quemaduras:** Añadir la trituración de sus semillas frescas <sup>(17)</sup>.

**Como Tónico estomacal:** Se debe consumir sus semillas en forma de macerado acuoso <sup>(17)</sup>.

**Acarosis (caracha):** Preparar en base de aceite de higuierillas un macerado de las semillas machacadas para su aplicación <sup>(17)</sup>.

**Depurativo:** Beber el cocimiento de la corteza raspada <sup>(18)</sup>.

**Expectorante:** Ingerir la infusión de las semillas <sup>(18)</sup>.

**Cardiotónico:** Tomar la infusión de las semillas o de las hojas <sup>(18)</sup>.

**Amigdalitis:** Beber preparado de miel de abejas combinadas con el polvo de sus semillas <sup>(18)</sup>.

**Sedante:** Ingerir el preparado en mezcla de las hojas o de la corteza cocidos, con las hojas de toronjil, rosáceas y rosas <sup>(18)</sup>.

**Inflamación ocular:** Preparar un macerado acuoso de la corteza, cuyo resultado de mucilago debe ser instilado <sup>(18)</sup>.

**Digestivo:** Beber el cocido de la corteza del tallo o de sus hojas.

**Lepra:** preparación de una pasta de las hojas que debe ser aplicada con sulfato de magnesio o también tomar el aceite de las semillas <sup>(19)</sup>.

**Infecciones a la piel:** Preparación de las hojas en macerado, que luego serán colocadas sobre la piel en forma de emplasto. Para su proceso dejar hasta el día siguiente de 9 a 12 hojas en un litro de agua, para su posterior aplicación en la zona lesionada <sup>(19)</sup>.

**Antiséptico vaginal:** Restregar las hojas en un litro de agua y dejar hasta el día siguiente. Este líquido debe ser aplicado en forma de lavados vaginales.

**Hepatitis:** Ingerir las yemas florales en forma de decocción <sup>(19)</sup>.

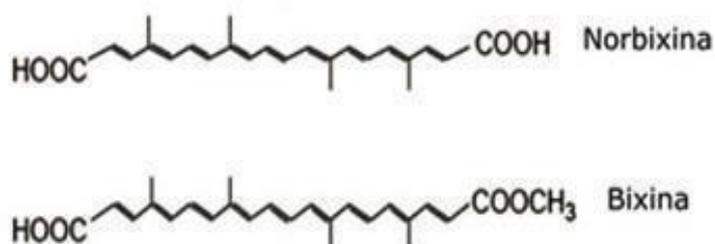
#### 2.2.1.6 Tipos de achiote

- **Por el color de las flores y cápsulas:** Se diferencian en que hay árboles que producen flores blancas con cápsulas verdes y árboles con flores rosadas y cápsulas en diferentes tonos rojizos <sup>(16)</sup>.

- **Por la forma de las cápsulas:** Los árboles se diferencian unos de otros por la forma de las cápsulas, siendo estas redondas, oblongas, acorazonadas, lancetadas con mucho, poco o ningún apéndice o setas <sup>(16)</sup>.
- **Por el color del pigmento:** la coloración del pigmento es una característica que puede diferenciarse en estos árboles y se presenta de color rojo o anaranjado <sup>(16)</sup>.
- **Por la época de floración y cosecha:** generalmente la floración y la cosecha de la mayoría de variedades ocurren en julio y diciembre. Hay otras variedades en las cuales ocurre en octubre y abril <sup>(16)</sup>.
- **Por su tolerancia al mildiú:** debido a su tolerancia natural a la enfermedad del mildiú polvoriento, causado por el hongo *Oidium bixae* Viegas, las variedades de achiote pueden clasificarse en susceptibles o tolerantes.
- Por su contenido de bixina.
- Por el color del tallo: Rojo, café y amarillo <sup>(16)</sup>.

#### **2.2.1.7 Composición química**

La *Bixa orellana* L. (achiote) posee un alto contenido de carotenoides, con mayor énfasis en apocarotenos, tales como la bixina, isobixina y norbixina. Además, caracterizan al beta-caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina, orellina, y demás. De igual forma, las semillas poseen ácido linoleico, alfa-linólico y (estos dos últimos en menor cantidad), oleico; aminoácidos como el glutamato, aspartato y leucina; posee un alto índice de concentraciones de fósforo y escasas de calcio y gran cantidad de hierro y zinc <sup>(20)</sup>.



**Figura 2:** Estructura química de *Bixa orellana* L. (achiote)

Fuente: Rev. Cubana Farm. v.44 n.2 La Habana abr.-jun. 2010

Los extractos de achiote se caracterizan por ser aceites alcalinos que son adquiridos luego de desechar la capa externa provenientes de sus semillas por medio de varios procesos. En un primer momento el extracto del achiote está en estado sólido a través del polvo, líquido (solución) o suspensión. La obtención de extractos liposolubles de la planta proviene de la zona exterior de la semilla, este se extrae por los siguientes procesos:

- 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 <sup>(21)</sup>.

El achiote es una de las plantas más apropiada para la elaboración de extracción de pigmentos, ya que son absorbidos de sus semillas. El producto final son el colorante soluble en aceite y en agua. El pigmento que prevalece con un ochenta por ciento corresponde a la bixina, ya que de este se obtiene los pigmentos como la norbixina, sal de norbixina y otras sustancias provenientes de la degradación térmica representada en un color amarillo recomendado para los tallarines, espaguetis y demás variantes <sup>(21)</sup>.

Con respecto a la sal de norbixina, esta se consigue a través de la extracción alcalina (con hidróxido sódico o potásico) de los pigmentos de la semilla del achiote. Este proceso tiene como objetivo transformar la bixina en sal, ya que esta es soluble en soluciones acuosas alcalinas.

El extracto liposoluble de achiote tendrá que poseer como mínimo un 0,2 % de carotenoides, manifestados como norbixina.

La sección liposoluble es insoluble en agua y es poco soluble en etanol, por otro lado, la otra sección sí es soluble en agua y presenta poca solubilidad en etanol <sup>(21)</sup>.

**Semillas:** bixinato de sodio, ácido tomentósico, bixina, beta caroteno, pectina, vitamina A, cryptoxantina, luteína, metilbixina, norbixina, zeaxantina<sup>(22,23)</sup>.

**Hojas:** Bixahaneno, ishwarano, 7-bisulfato de epigenina, 7-bisulfato de luteolina, 8-bisulfato de hipolaetina <sup>(22, 23)</sup>.

**Carotenoides:** Bixina, norbixina, orellina, betacaroteno, criptoxantina, metilbixina, zeaxantina, luteína, mono y sesquiterpenos <sup>(22, 23)</sup>.

**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>(22, 23)</sup>.

#### **2.2.1.8 Estudios de sus propiedades farmacológicas**

Las numerosas investigaciones sobre las cualidades del achiote, catalogada como medicina tradicional, establecieron beneficios y propiedades de la misma, entre las más destacable están:

**A) Acción cicatrizante:** Para comprobar esta cualidad fue necesario aplicar el extracto alcohólico de *Bixa orellana* L. (achiote) en la zona sensible de la muestra, luego de tres días, la piel de la conejos, en su totalidad, se recuperó.<sup>(24)</sup>

Además, se realizó una crema, la cual tuvo como ingrediente principal al achiote, acto siguiente se añadió a las zonas lastimadas y la intensidad se cicatrización fue alto <sup>(25)</sup>.

**B) Acción antioxidante:** Con el propósito de determinar el efecto de norbixina frente a las lesiones sufridas por la radiación ultravioleta, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno) sobre las células de *Escherichia coli*. Este estudio concluyó que la norbixina posee la capacidad de aumentar, hasta en diez veces, el tiempo de vida de las células, es decir, la norbixina protege a las células <sup>(26)</sup>.

Otros estudios evidenciaron que el componente bixina funcionó como antioxidante, ya que interceptó radicales libres ocasionados por la lesión cromosómico inducido por el agente clastogénico cisplatino <sup>(27)</sup>.

### **C) Acción antimicrobiana y antiparasitaria**

Las diversas investigaciones evidenciaron que el achiote posee efectos inhibidores ante el *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, y *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 0,08, 0,31, y 0,16 % (v/v) respectivamente <sup>(28)</sup>.

A concentraciones de un 0,63 % (v/v) inhibe el crecimiento del *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* y *Paenibacillus polymyxa*, y las concentraciones para la inhibición de *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus durans* fueron de 1,25 y 2,5 % (v/v), respectivamente. No se detectó actividad de la *Bixa* ante *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum*, levaduras y algunas bacterias gram negativas. Otras indagaciones evidenciaron la actividad del achiote ante el *Cryptococcus neoformans* (CMI de 0,078 mg/ml). Además, se identificó la actividad ante la *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomona vaginalis*, *T. faecalis*, la *Leishmania* y múltiples hongos patógenos. De manera general la actividad fue superior contra gérmenes gram positivos, sin embargo, se demostró también contra gramnegativos <sup>(28)</sup>.

Se considera que la 9'-cis-norbixina y todo-trans-norbixina son los principales causantes de propiedades antimicrobianas, asimismo el achiote tiene una gran capacidad para adquirir agentes antimicrobianos <sup>(28)</sup>.

**D) Acción hipoglicemiante:** Múltiples investigaciones ejecutadas en animales evidenciaron que la el achiote tiene incidencia en los episodios hipoglicémicos, los cuales son mediados por un aumento en la concentración de la insulina en plasma, de igual forma, la aceleración de la unión de la insulina a sus receptores por un aumento de la afinidad entre ambos <sup>(29)</sup>.

**E) Acción hipolipemiante, vasorelajante y hepatoprotectora:** Diversas investigaciones recomiendan que el uso de extractos de *Bixa Orellana* L. (achite) utilizados para el tratamiento del síndrome metabólico debido a estas propiedades de la planta. Probablemente esas propiedades se las confieren a las altas concentraciones de flavonoides, vitaminas y quelantes que contiene <sup>(27)</sup>.

En referencia a las propiedades hipocolesterolémicas se estudió sobre las propiedades y funciones del achiote con relación a las dificultades cardiovasculares. Para ello fue necesaria la investigación en animales, tales como: conejo, perro y ratón, los mismos que evidenciaron la disminución sustancial de las concentraciones de colesterol. Los resultados del estudio determinaron que después de diez días de la aplicación hubo una mejora notoria, esto quiere decir que los pigmentos tienen la capacidad de aumentar el metabolismo de las grasas <sup>(27)</sup>.

**F) Acción antimutagénica y antígenotóxica:** Existen estudios que tiene propósito evaluar al potencial antimutagénico de la norbixina contra mutágenos oxidantes en *Salmonella typhimurium*, el cual determinó que una inhibición superior a un 86 % contra la mutagenicidad provocada por peróxido de hidrógeno; no obstante, a pesar de que los indicadores señalan que la norbixina protege ante el daño oxidativo, cabe la posibilidad de tener consecuencias prooxidantes. De otro lado, otros investigadores encontraron características óptimas para prevenir el deterioro al ADN que yace en cultivos de linfocitos humanos con el uso de un extracto de bixina. Mientras

que otra investigación, aplicada en ratas, recomienda un posible efecto quimiopreventivo del achiote por medio de la modulación de la proliferación de las células criptales; sin embargo, no se da durante el período inicial de la carcinogénesis de colon <sup>(30)</sup>.

Investigaciones afirman las ventajas de achiote para prevenir las características (mutación) que ocasionan el cáncer.

Además, se describieron y explicaron las virtudes de achiote como es la antimutagénicas, ya que evidenciaron la importancia de la bixina durante la eliminación de la peroxidación lipídica (producido por los radicales libres) y la proliferación de células causantes de tumores. En conclusión, las investigaciones coinciden en que esta planta cumple la función de un suplemento antitumoral <sup>(30)</sup>.

**G) Acción como antiagregante plaquetario:** La investigación de la *Bixa Orellana* L. (achiote) forma parte de otros estudios realizados para determinar y evidenciar la capacidad de prevención de la suma de plaquetas <sup>(31)</sup>.

**H) Acción inmunomoduladora:** La bixina y demás colorantes solubles en líquido (agua) suman la producción de IgM a concentraciones tan bajas como 1mmol/L. Los investigadores dedujeron que este colorante tiene la capacidad de parametrizar el aumento de inmunoglobulinas <sup>(31)</sup>.

**I) Acción como revelador de placa dentobacteriana:** Una investigación que tuvo como muestra a canes Beagle evidenció las cualidades del achiote frente a la tinción de la placa dentobacteriana, con productos parecidos a la tinción identificada con el revelador convencional <sup>(32)</sup>.

### **2.2.1.9 Estudios toxicológicos**

Los estudios de toxicidad aguda realizados para extractos de Achiote han demostrado su baja toxicidad <sup>(33)</sup>. Un estudio realizado en ratas Wistar a las cuales se les administró una dosis 2 000 mg/kg/día de achiote, demostró que era prácticamente inocuo <sup>(34)</sup>. Por otra parte, un estudio de tolerancia cutánea en conejos realizados con un extracto de *Bixa orellana* L. (achiote), no mostró alteraciones significativas, lo cual fue confirmado mediante estudios histológicos de muestras de piel y cabello. Otros investigadores emplearon en su estudio un extracto alcohólico de *Bixa orellana* L. (achiote) en piel rasgada de conejos Nueva Zelanda y concluyeron que el producto no es un irritante dérmico primario <sup>(32)</sup>.

De manera similar un estudio de irritabilidad en mucosa oral de un extracto de bixa, realizado en Hámsteres, no mostró alteraciones en la mucosa oral de los animales analizados; durante el ensayo el índice de irritación agudo fue de 0,0 y no se observaron otros signos clínicos en los animales <sup>(33)</sup>.

Los estudios subcrónicos de toxicidad oral de un extracto de *Bixa Orellana* L. (achiote) administrados durante trece semanas en ratas Sprague-Dawley tampoco presentaron signos tóxicos o letalidad <sup>(34)</sup>.

### **2.2.1.10 Estudios clínicos**

Existen pocas investigaciones que hacen alusión a los extractos del achiote para tratar las afecciones hacia las personas. Una publicación académica tuvo como principal propósito desarrollar un proceso para detectar la bixina y la norbixina, situada en el plasma humano y se hizo ahínco en la absorción de una sola dosis de 1 mL de un extracto del achiote utilizado como colorante de alimentos comercial. Se determinó que los pigmentos que poseían diferencias entre uno y otro, en diversas situaciones al día con una aclaración plasmática completa de la bixina a las ocho horas y de la norbixina a las veinticuatro horas del consumo, sin detección de efectos adversos entre los individuos estudiados <sup>(35)</sup>.

Los animales y humanos evidenciaron los pigmentos de achiote, los cuales son absorbidos por medio del intestino y es más veloz la aclaración de la sangre <sup>(36)</sup>.

Durante el 2007, se llevó a cabo un procedimiento clínico en personas, el que se utilizó el extracto de achiote en la hiperplasia prostática benigna, los individuos estudiados no mostraron ningún beneficio con respecto a los tratados con placebo, pero ningún efecto adverso fue detectado durante el estudio <sup>(37)</sup>.

La Organización Mundial de la Salud señaló que el límite permitido de consumo periódico, es decir, al día es de 0-0,065 mg/kg de peso corporal. En los Estados Unidos, el cincuenta por ciento de los extractos de bixa (20 toneladas) se emplean con el propósito de sumarlos a los quesos. El consumo estándar corresponde a 0,38 mg por individuos al día, esto representa el diez por ciento del consumo periódico sugerido <sup>(38)</sup>.

En diversos países europeos, como Reino Unido, Alemania y Francia el consumo promedio es inferior (diez veces) a los Estados Unidos. En Francia, Alemania y el Reino Unido el consumo estimado corresponde a diez veces inferior que, en los Estados Unidos, aproximadamente 1 % de la dosis al día sugerido, sin embargo, el setenta por ciento se ingiere a través de colorantes (bixina/nor-bixina) sumados al queso en comparación con Estados Unidos, donde el colorante consumido, el cual deviene de quesos es solo el cinco por ciento <sup>(37)</sup>.

### **2.2.2 Diarrea**

Se define como el descenso de la consistencia de las heces, tiende a darse en repetidas ocasiones, este puede darse por diversos factores y es frecuente en las personas. El número de deposiciones sobrepasa las 3 veces por día, esto suele producir fastidio en la zona del abdomen, además es muy difícil de controlar por la premura e inconsistencia de las deposiciones de heces, asimismo este puede darse conjuntamente con otros síntomas, como: náuseas, cólicos, mucosidad y otros <sup>(38)</sup>.

Es considerada como diarrea aguda cuando los síntomas mencionados duran aproximadamente por 2 semanas <sup>(39)</sup>.

Esta clase de diarrea es más usual en los infantes y segundo motivo de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. Esta última se da con mayor frecuencia en países en desarrollo. <sup>(40)</sup> De acuerdo a informes elaborados por la Organización Mundial de la Salud y el Fondo de las Naciones Unidas, señala que son casi 2 millones los episodios de diarrea al año en el mundo, de cual, 1,9 millones de niños con edad inferior a los cinco años mueren debido a ello <sup>(41)</sup>.

### **2.2.2.1 Clasificación de la diarrea**

La diarrea se clasifica de la siguiente manera, de acuerdo con el aspecto fisiopatológico secretoras o motoras, osmóticas. Mientras que, desde aspecto terapéutico, se divide en dos: crónica y aguda <sup>(42,43)</sup>.

#### **a) Diarrea aguda**

Esta clase de diarrea tiene como causa principal: la infección, alteración hidroelectrolítica, los cuales deben ser atendidos. Se sugiere consumir líquidos y electrolitos para contrarrestar la pérdida de esta en las constantes deposiciones <sup>(42,43)</sup>.

#### **b) Diarrea crónica**

Son numerosos los motivos de este tipo de diarrea, usualmente es de origen motórica y etiológica. Si no se tiene conocimiento sobre la causa de la diarrea, entonces será muy complicado tratarla. El tratamiento ante este problema es la ingesta de medicamentos que ayuden a corregir las zonas, por ende, contribuye con la alivio de los síntomas. Las enfermedades más usuales que pueden desencadenar este tipo de diarrea son: colitis ulcerosa, enfermedades crónicas intestinal y la enfermedad de Crohn <sup>(41)</sup>.

### **c) Diarrea osmótica**

Se distingue por la mala absorción de las sustancias de la luz intestinal. Esto es notorio, por lo general, en la enfermedad celiaca <sup>(42)</sup>.

Tiene como origen la inadecuada distribución soluto en la luz intestinal, esto evidencia la deficiente absorción de hidratos de carbono y de la diarrea ocasionada por múltiples laxantes <sup>(42,43)</sup>.

### **d) Diarrea secretora**

Denota un descenso significativo con respecto a la absorción o luz intestinal y electrolitos. Usualmente este tipo de diarrea es evidencia de un tumor en la zona intestinal producto de las toxinas de bacterias <sup>(42,43)</sup>.

### **e) Diarrea inflamatoria**

Se da con un aumento de permeabilidad de la mucosa intestinal. Por lo general, es evidencias de enfermedades del tracto gastrointestinal, tales como el cáncer de colon, colitis ulcerosa, etc. o en patologías los cuales no tiene la capacidad de absorción de los ácidos biliares, los cuales ingresarán en el colon con un ascenso de la afluencia de electrolitos. Puede manifestarse incluso con el hipertiroidismo <sup>(43)</sup>.

## **2.2.2.2 Tratamiento de la diarrea**

El tratamiento más usual para evitar la diarrea es evitar la deshidratación, por ello, es necesario el consumo de sales de rehidratación o la ingesta de agua, a estos procesos se les denomina rehidratación oral <sup>(44)</sup>.

Esta es un mecanismo que usa con mucho éxito, ya que es capaz de rehidratar el cuerpo hasta en un 95%, esto quiere decir que puede llegar a disminuir el 50% de tasa de letalidad intrahospitalaria. Sin embargo, el costo

de la sal de rehidratación es muy costosa, pero eficaz y su uso puede evitar y disminuir significativamente las intervenciones hospitalarias <sup>(44)</sup>.

Cabe destacar que el tratamiento de rehidratación oral está elaborado por preparados que contienen potasio, cloruro, sodio, citrato y glucosa. Como medida alternativa está el consumo de plátano, agua de arroz, infusiones y papa <sup>(44)</sup>.

### **A) Antidiarreicos**

Los antidiarreicos tienen la posibilidad de utilizar con seguridad en pacientes con diarrea aguda de intensidad suave a moderada, pero no se tienen que utilizar en pacientes con diarrea sanguinolenta, fiebre elevada o patologías tóxicas sistémicas debido al compromiso de poder agravar la condición subyacente. Los antidiarreicos además se utilizan para vigilar la diarrea crónica ocasionada por patologías como el Trastorno del Intestino Irritable (SII) y la Patología Inflamatoria Intestinal (EII) <sup>(45)</sup>.

El peligro primordial de la diarrea aguda es la deshidratación, por consiguiente, los tratamientos que acostumbran a aplicarse tienen la intención de achicar la pérdida fecal del agua y restituir los líquidos y electrolitos perdidos. El régimen de rehidratación por vía oral, iniciado poco luego de haber iniciado la diarrea es un ingrediente eficiente del régimen, independientemente del origen del inconveniente. La piedra angular en el régimen farmacológico inespecífico de las diarreas sigue siendo los agonistas de los opioides como la Loperamida y Difenoxilato. El subsalicilato de bismuto ofrece alivio importante en caso de diarreas leves o moderadas y tienen herramienta para profilaxis de la diarrea del viajero ocasionada por distintos agentes infecciosos <sup>(39)</sup>.

Los constipantes son drogas que disminuyen la continuidad de las deposiciones en las diarreas. Los grupos más destacables son los opiáceos, los adsorbentes, los astringentes y los compuestos de bismuto. En la actualidad, tienen indicación en cuadros de diarrea de diferentes orígenes

logrando usarse en diarreas infecciosas con o sin concomitante de antibióticos, mientras que no se sospeche la existencia de gérmenes enteroinvasivos <sup>(46)</sup>.

## **B) Opioides**

Son los constipantes más frecuentes usados. La morfina fue el primer opiáceo utilizado como antidiarreico, el desarrollo de opiáceos con escasos efectos sobre el sistema nervioso central (SNC) desplazó las drogas clásicas y, en la actualidad, los dos opiáceos más frecuentemente utilizados como antidiarreicos son el difenoxilato y la loperamina (derivado de la meprimina) <sup>(47)</sup>.

Las acciones farmacológicas de ambas drogas son las de opiáceos. Son agonistas  $\mu$ , probablemente o aumentan las contracciones tónicas, pero disminuyen las peristálticas y disminuyen el contenido de agua y electrolitos de las heces por dos mecanismos.

- Disminución de las secreciones digestivas.
- Enlentecimiento del tránsito intestinal con mayor reabsorción de agua y electrolitos <sup>(47)</sup>.

Los agonistas de los opioides pueden afectar la función gastrointestinal por medio de sitios centrales y periféricos. Hoy en día para tratar las diarreas se usa los opioides sintéticos Difenoxilato y Loperamida. Un motivo de esta preferencia consiste en que estos agentes penetran en SNC y pueden tener efectos antidiarreicos en dosis que tienen muy pocos efectos centrales <sup>(48)</sup>.

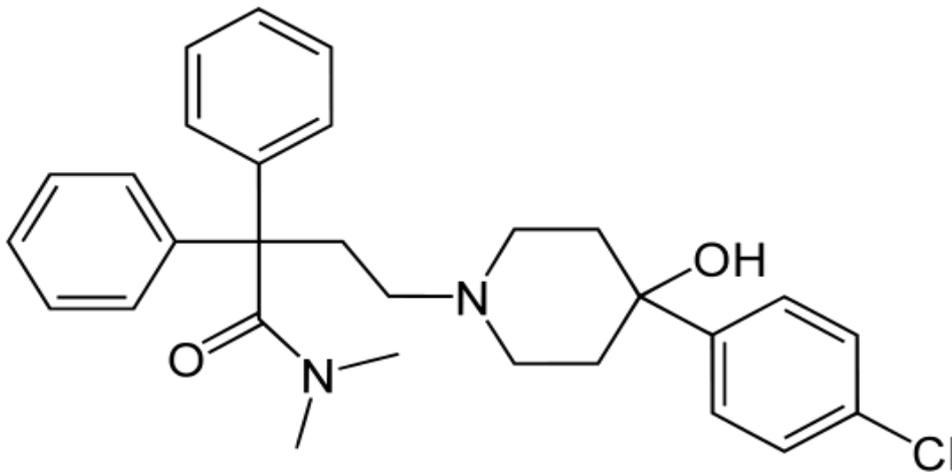
### **2.2.3 Loperamida**

Es un antagonista opioide, derivado estructural de la petidina, de venta libre no tiene propiedades analgésicas ni potencial de adicción. No se ha reportado tolerancia con el uso a largo plazo. Típicamente, se administra en dosis de 2mg de 1 a 4 veces al día <sup>(33)</sup>. Es poco probable que se abuse de

este fármaco por vía parenteral, a causa de su baja liposolubilidad; las grandes dosis de loperamida administradas o voluntarios no producen los efectos placenteros típicos de los opioides. El régimen de dosificación ordinaria es de 4 a 8 mg/día; la dosis diaria no debe pasar de 16mg <sup>(42)</sup>.

En jóvenes, las dosis terapéuticas altas tienen la posibilidad de ocasionar efectos centrales, siendo conveniente no usarla. Con la acción antipropulsora exhibe un efecto antisecretor muy profundo, inhibiendo la liberación de prostaglandinas y la respuesta a la toxina colérica. Algunos de estos efectos no son antagonizable por naloxona, por lo cual puede deberse a acciones plus opiáceas; en este sentido, es relevante su relación estructural con el verapamilo, fármaco que con continuidad ocasiona estreñimiento <sup>(42)</sup>.

La loperamida aumenta, además, el tono del esfínter anal y optimización la continencia fecal en pacientes con diarrea. La loperamida se absorbe por vía oral, con un tiempo más alto de cuatro horas, y se centra en el tubo digestivo y en el hígado. Su semivida es de siete a quince horas, por lo cual su acción es muy prolongada. La supresión urinaria es escasa. En la diarrea aguda, las dosis iniciales son de 4 mg, seguida de 2 mg siempre que habido defecación hasta un más alto de 16 mg/día. En la crónica la dosis es de 2mg, tres ocasiones al día; puede aumentarse hasta achicar la continuidad 1\_2 defecaciones del día a día. En los jóvenes superiores de 8 años 0.08mg/kg/día. En jóvenes muy chicos no hay que utilizar las reacciones adversas más usuales son mal abdominal de origen difuso y estreñimiento marcado <sup>(48)</sup>.



**Figura 3:** Estructura química de la Loperamida

Fuente: <https://www.estructura quimica loperamida-pdf>

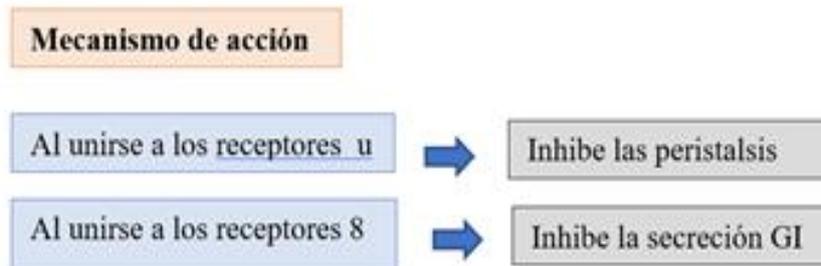
Los constipantes no opiáceos como los adsorbentes, tienen la propiedad de acumular moléculas (por ejemplo: tóxicos, toxinas) en su superficie. Por este motivo, se utilizan finamente divididos. Son ejemplos de este grupo el carbón activado y el caolín. El primero es especialmente eficaz en el tratamiento de intoxicaciones. También, absorben toxinas bacterianas, pero su uso en diarreas bacterianas no es conveniente, pues absorben, también al fármaco bacteriano. Los compuestos de bismuto, no se conoce claramente su mecanismo de acción. Tendrían un efecto protector de la mucosa, antisecretor, antiinflamatorio y, además, el bismuto tiene efecto antibacteriano. Se ha propuesto que el salicilato de bismuto podría tener efecto antidiarreico, pues las prostaglandinas pueden producir diarrea; sin embargo, no hay evidencias clínicas de que el subsacilato sea superior a otros compuestos de bismuto <sup>(47)</sup>.

### 2.2.3.1 Mecanismo de acción

La loperamida aumenta el tono del esfínter anal y de esta forma disminuye la incontinencia y la urgencia. La loperamida se une a los receptores opiáceos en la pared intestinal. Como resultado, inhibe la secreción de acetilcolina y prostaglandinas, por consiguiente, disminuye el peristaltismo

propulsivo, incrementando el tiempo de tránsito intestinal. Inhibe de manera directa la secreción de líquidos y electrolitos <sup>(47)</sup>.

## LOPERAMIDA



**Figura 4: Mecanismo de acción de la loperamida**

Fuente: [www.janssen.com/bolivia/sites/2017.pdf](http://www.janssen.com/bolivia/sites/2017.pdf)

### 2.2.3.2 Farmacocinética

#### a) Absorción

El más grande porcentaje de loperamida ingerida se absorbe en el intestino, como producto de un importante metabolismo de primer paso, la biodisponibilidad sistémica es de precisamente sólo el 0,3%. Las formulaciones de CIH de loperamida (cápsulas duras o blandas, comprimido recubierto y no recubierto, comprimido masticable y orodispersable, satisfacción oral) son bioequivalentes desde el criterio del índice y nivel de absorción de la loperamida <sup>(49)</sup>.

#### b) Distribución

Las investigaciones sobre la estructuración en ratas señalan un nivel alto de afinidad en las paredes del intestino, con una relevancia para añadirlos a los receptores de la parte superior de la zona muscular longitudinal. Las proteínas plasmáticas de la loperamida unidas representan el noventa y cinco por ciento. La información preclínica indicó que la loperamida corresponde a un sustrato de la glicoproteína P <sup>(49)</sup>.

### c) Metabolismo

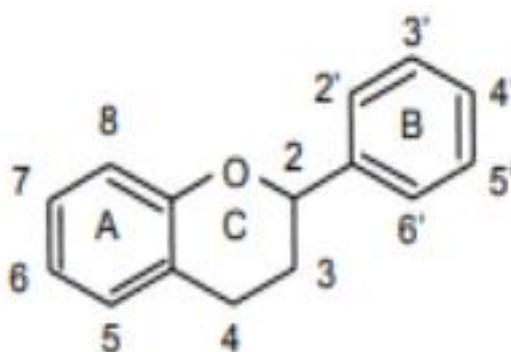
La loperamida es, en su mayoría, obtenido del hígado, ya que es ahí donde se re conjuga, metaboliza y excreta por medio de la bilis. La N-demetilación oxidativa es la fuente fundamental de la vía metabólica para la loperamida, y se la manera para definir la medida es por medio de: CYP3A4 y CYP2C8, ya que sus efectos, en un primer momento, fue muy alto, las concentraciones plasmáticas de la droga inalterada permanecen no son significativas <sup>(49)</sup>.

### d) Eliminación

El tiempo de vida promedio de la loperamida en el hombre es, aproximadamente, de once horas, con un rango de nueve a catorce. La excreción de la loperamida desnivela y de los metabolitos ocurre usualmente por medio de las heces. <sup>(49)</sup>

### e) Flavonoides

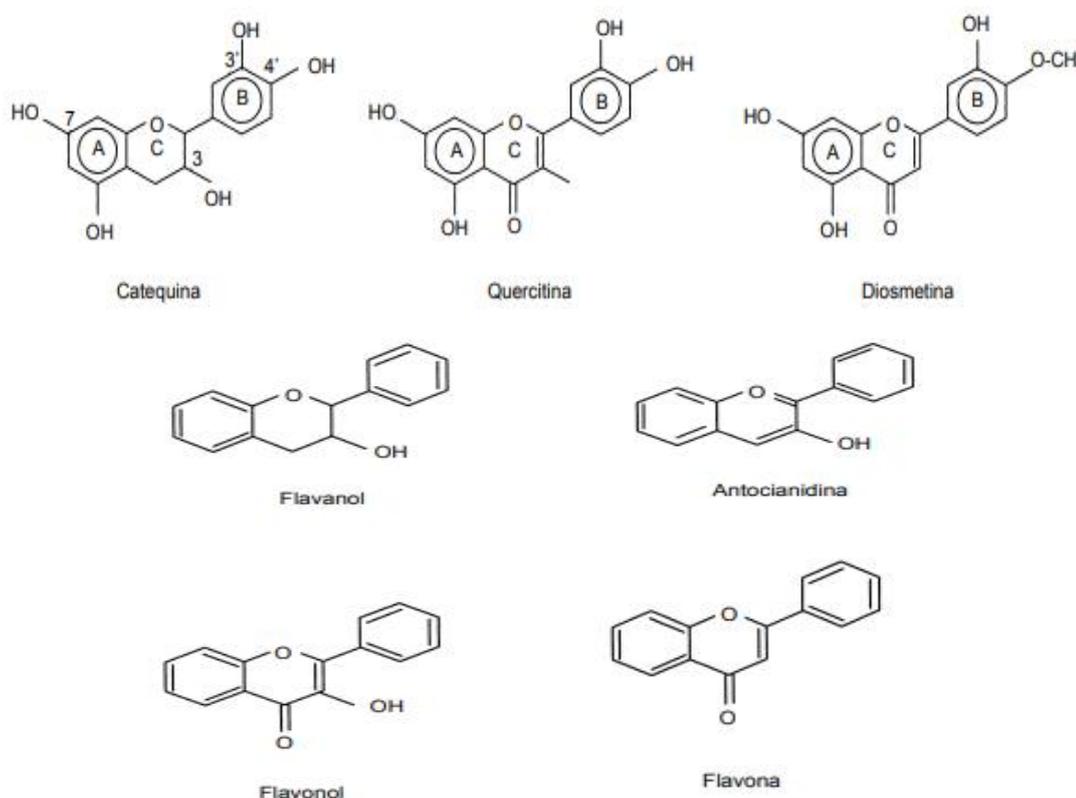
Forman parte de uno de los subgrupos de los componentes fenólicos con mayor relevancia, esto es producto de la actividad antioxidante. Este tiene una alta presencia en los vegetales que yacen la savia vacuolar, es decir, en las flores, raíces y hojas. Estos pueden estar clasificados en función a los grupos funcionales añadidos e isomerizaciones <sup>(50)</sup>.



**Figura 5:** Estructura básica del flavonoide

Fuente: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>

Para su estudio sistemático, más de 4000 flavonoides naturales se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presentan la cadena central C3. De acuerdo con estos flavonoides se clasifican en varios grupos: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, etc <sup>(50)</sup>.



**Figura 6:** Estructura química de los flavonoides más usuales

Fuente: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>

### 2.2.3.3 Tamizaje fitoquímico <sup>(51)</sup>

Estos ensayos se pueden verificar sobre la misma droga; en forma entera, pulverizada o como es más frecuente en extractos que se pudieron obtener

de diferentes procedimientos de extracción de la planta y con diferentes solventes.

Son ensayos de tipo cualitativo que permiten la identificación de la droga a estudiar, es por lo general la presencia de determinados compuestos específicos derivados del metabolismo secundario de la planta. También para los ensayos de metabolitos secundarios se les hace prueba pero van a hacer comunes a todas las plantas es por eso que carece de interés diagnóstico. Las pruebas para el screening fitoquímico comprenden reacciones de identificación (coloreadas, de precipitación, fluorescencia, microsublimación).

#### **2.2.3.4 Cromatografía de capa fina <sup>(52)</sup>**

Se le denomina de esta forma a las técnicas de análisis básico, ya que para la ejecución la muestra no debe ser mucha. Por lo general la utilizan para medir indicadores en los productos naturales.

También es usado para el ensayo semicuantitativo contrastando el nivel de manchas vistas con estándares apropiados.

La localización de estos elementos, de forma aislada, usualmente es producto de métodos particulares o generales, pues la luz ultravioleta detecta los compuestos que se encargan de absorber la longitud de onda larga 365nm y de onda corta a 254 nm.

##### **a) Valor de Rf**

Se define como distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación. La distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente

**Rf =** Distancia recorrida desde el origen por el compuesto (X)

Distancia recorrida desde el origen por el eluyente

El valor Rf depende de las condiciones en las cuales recorre la muestra <sup>(52)</sup>.

## **2.3 Hipótesis**

### **2.3.1 Hipótesis general**

El extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) posee actividad antidiarreica en ratas inducidas con aceite de ricino.

### **2.3.2 Hipótesis específicas**

- 1) El extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) posee actividad antidiarreica comparada con la loperamida en ratas inducidas con aceite de ricino.
- 2) Una dosis de concentración del extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) posee actividad antidiarreica en ratas inducidas con aceite de ricino.
- 3) El extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) posee presencia de metabolitos secundarios que generan la actividad antidiarreica.

## 2.4 Variables

### 2.4.1 Tabla de Operacionalización de variables

VARIABLE INDEPENDIENTE		
VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADORES
Extracto acuoso de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote)	Metabolitos Secundarios Del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote). <ul style="list-style-type: none"> <li>• alcaloides</li> <li>• compuestos fenólicos</li> <li>• taninos</li> <li>• flavonoides</li> </ul> (FITOQUÍMICO).	-Identificación de los metabolitos secundarios.  -Dosis de la concentración del extracto acuoso de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote)  250 mg/ kg 500 mg/kg 1000 mg/kg
VARIABLES DEPENDIENTES		
VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES
Actividad antidiarreica.	Actividad antidiarreica experimental con carbón activado. (FARMACOLÓGICO)	Recorrido en centímetros del carbón activado en el intestino de la rata.

## 2.5 Marco conceptual

- a) **Achiote:** el achiote es un pigmento natural, de coloración rojo-amarilla, ampliamente utilizado en la industria alimentaria y cosmética, del género *bixa* dentro de la familia *Bixaceae* <sup>(53)</sup>.

- b) **Extracto:** sustancia adquirida por la extracción de una sección de materia prima, usualmente se utiliza un solvente como etanol o agua. Los extractos tiene la posibilidad de distribuirse a través de tinturas o con apariencia de polvo <sup>(53)</sup>.
- c) **Diarrea:** es una reducción de la rigidez de las heces, que acostumbra a añadirse de un incremento de veces de deposiciones. Es un trastorno recurrente que posee diversas causas. De acuerdo a la definición médica, la diarrea quiere decir más de 200g/24h en personas adultas.<sup>(38)</sup>
- d) **Metabolitos primarios:** cualquier compuesto químico implicado en el metabolismo o que es producto del metabolismo <sup>(54)</sup>.
- e) **Fundamento químico de marchas fitoquímicas:** “el tamizaje fitoquímico o Screening fitoquímico se encuentra dentro de las fases iniciales de la exploración fitoquímico que facilita saber cualitativamente primordiales sectores químicos latentes en una planta y desde ahí, dirigir la extracción o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de más grande interés” <sup>(54)</sup>.
- f) **El tamizaje fitoquímico:** “es la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de oposición de color y precipitación. Debe de aceptar la evaluación ligera. Los resultados del tamizaje fitoquímico conforman solamente en una orientación y debe de interpretarse en grupo con los resultados del screening farmacológico” <sup>(54)</sup>.
- g) **El screening fitoquímico:** “proporciona información previa de los compuestos químicos de la planta, adjuntado con los resultados del tamizaje farmacológico, tienen la posibilidad de guiar el seguimiento de las investigaciones. Algunos consideran un reducido número de grupos de sustancias, en compensación, otros determinan la existencia de compuestos de poco interés, como ácidos grasos, azúcares reductores, polisacáridos y mucilagos” <sup>(54)</sup>.
- h) **Rutas metabólicas:** “series de reacciones bioquímicas, catalizadas por las enzimas de una célula, en donde el producto de una de las reacciones es el sustrato de la siguiente. las rutas metabólicas se

usan para transformar un complejo en otro, para sintetizar micro moléculas enormes desde entidades más pequeñas o para degradar compuestos con el objetivo de conseguir energía utilizable” <sup>(53)</sup>.

- i) **Cromatografía:** “desunión de compuestos de una mezcla basado en la afinidad por un solvente no polar y por su migración con dicho solvente, como el agua en un soporte polar, como el papel o a través de una columna de diversos materiales” <sup>(55)</sup>.
- j) **Efecto farmacológico:** Es usual que tenga relación con los efectos de un químico a un sistema vivo, como lo es el hombre <sup>(56)</sup>.
- k) **Tiempo de vida media:** Se define como el lapso de tiempo necesitado para que la concentración plasmática del fármaco disminuya a la mitad.
- l) **Concentración:** “cantidad de oxígeno (O<sub>2</sub>) disuelto en un volumen determinado de agua a una temperatura y presión dadas, usualmente se manifiesta como una concentración de oxígeno en partes por millón de agua” <sup>(56)</sup>.

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **3.1 Tipo de estudio**

El presente estudio según su propósito es una investigación aplicada, ya que busca dar la explicación y propuesta de solución a un problema común y extendido como son las diarreas.

Según su enfoque la investigación presenta un enfoque cuantitativo ya que se busca dar respuestas objetivas y expresadas además en índices numéricos puntuales del objeto de estudio.

La Investigación además es de carácter transversal; ya que en su desarrollo se propuso evaluar farmacológicamente por única vez a cada unidad muestral, es decir se midió la actividad antidiarreica.

#### **3.2 Diseño de investigación**

Esta investigación responde a un diseño experimental, debido a que se manipula las variables deliberadamente, es decir en su proceso el estudio hará variar en forma intencional la variable independiente para ver su efecto sobre la otra variable. De este modo se manipula las distintas concentraciones del extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) para medir el efecto que tienen en otra variable de interés que es la actividad antidiarreica.

### **3.3 Población**

- Hojas *Bixa orellana* L. (achiote) 2 kg de muestra que se obtuvo, procedente de la zona de la selva, región Junín, cultivada a una altitud aproximada de 1'400msnm.
- Los animales utilizados fueron 31 ratas albinas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Holtzman machos de 2 meses, provenientes del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

### **3.4. Muestra**

Extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) 250g para las pruebas de Screening Fitoquímico, Cromatografía en capa fina y Prueba de Solubilidad.

### **3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

Para la recolección de la información, se utilizó la ficha Ad hoc elaborados por el investigador. (Ver anexo N° 4)

#### **3.5.1 Tamizaje fitoquímico**

El tamizaje fitoquímico por la metodología reportada por Payo, Sandoval y Peña <sup>(57-59)</sup>. Se utilizaron los siguientes materiales:

##### **a) Materiales**

- Alimento balanceado de la Universidad Agraria La Molina
- Viruta de pino procesada
- Jaulas de polipropileno con tapa de acero inoxidable.
- Jeringas de 1ml
- Material estéril de Laboratorio
  - Papel Kraft
  - Matraz Erlenmeyer
  - Embudo de vidrio

- Papel filtro
- Tubos de ensayo
- Pipetas
- Fiolas de 50 mL
- Pera de bromo de 250 mL
- Estándar de Quercetina
- Estándar de Cafeína

### **b) Reactivos**

Se utilizaron los siguientes reactivos:

- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de ácido Fosfowolframio
- Reactivo de Sonneschein
- Reactivo de Reineckato
- Reactivo de Shinoda (magnesio + ácido clorhídrico concentrado)
- Reactivo de Cloruro Férrico
- Degelatina al 1%
- Hidróxido de sodio al 5% (Reacción de Bortranger)
- Reactivo de Ninhidrina
- Reactivo de Fehling A
- Reactivo de Fehling B
- Reactivo de Lugol
- Reactivo 2,4 DNPH
- Alcohol de 96 °C
- Metanol
- Etanol
- Cloroformo
- Agua destilada
- Isopropanol
- De Tricloruro de Aluminio al 2%

- De Metanol : Agua (25:75)
- Reactivo BAW (Butanol : Agua : Ácido acético glacial - AAG) (4:3:1)
- Ácido sulfúrico 2 N
- Hidróxido de sodio al 10%

### **c) Procedimiento experimental**

El screening fitoquímico, cromatografía en capa fina, prueba de cuantificación de flavonoides totales por espectrofotometría UV-VIS, prueba de solubilidad y ensayos preliminares así como también el estudio de la actividad Antidiarreica se ejecutaron en los laboratorios de Control de Calidad y Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

#### **c.1) Procedimiento Experimental (etapa I)**

##### **- Recolección de las hojas**

Las hojas de *Bixa Orellana* L. (achiote) recolectadas para el estudio, proceden de la zona de selva de la región Junín, cultivadas a una altitud aproximada de 1,400 msnm

##### **- Secado de las hojas**

Se procedió a separar las hojas con cuidado y colocarlas en papel Kraft, para luego ser llevado a la estufa a una temperatura de 40 °C; se utilizó esta temperatura para no alterar los metabolitos que queremos evaluar.



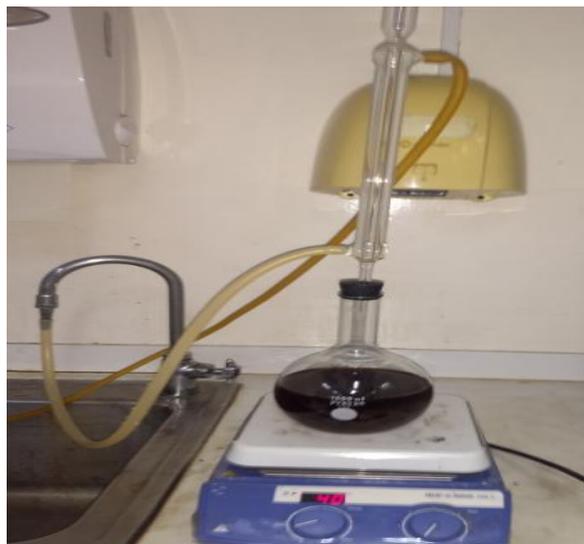
**Figura 7.** Hojas de *Bixa orellana* L. (achiote)

Fuente: Elaboración propia, 2018.

### - **Extracción acuosa de las hojas**

Se colocaron las hojas en un balón de fondo plano para luego ser llevado a una plancha de calentamiento a una temperatura de 45 °C, y mediante una extracción de reflujo (24 horas) se extrajeron sus metabolitos.

Una vez culminada la extracción acuosa se filtró la muestra. Aquí se obtiene el extracto líquido de las hojas.



**Figura 8.** Extracción Acuosa de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote)

Fuente: Elaboración propia, 2018.

### - **Extracto seco de las hojas**

Una vez obtenido el extracto líquido, una gran parte es destinada para la prueba de Solubilidad y la dosis para la parte farmacológica, es decir el extracto líquido es vertido en unos recipientes de porcelana para ser llevado a la estufa a una temperatura de 40° C, por un tiempo de 24 horas, al transcurrir el tiempo es sacada de la estufa y recolectada en un recipiente hermético protegido de la luz y guardada a temperatura de 2 a 8 °C hasta su utilización.

## - **Screnning Fitoquímico**

Estos ensayos se pueden verificar sobre la misma droga; en forma entera, pulverizada o como es más frecuente en extractos que se pudieron obtener de diferentes procedimientos de extracción de la planta y con diferentes solventes.

Son ensayos de tipo cualitativo que permiten la identificación de la droga a estudiar, es por lo general la presencia de determinados compuestos específicos derivados del metabolismo secundario de la planta. También para los ensayos de metabolitos secundarios se les hace prueba pero van a hacer comunes a todas las plantas es por eso que carece de interés diagnóstico. Las pruebas para el screnning fitoquímico comprenden reacciones de identificación (coloreadas, de precipitación, fluorescencia, microsublimación).

El procedimiento es poner de 2 a 5 mL del extracto líquido en los tubos de ensayo para luego agregar de tres (03) a cinco (5) gotas de los reactivos para la identificación de los metabolitos.

## - **Metabolitos Secundarios** <sup>(60)</sup>

### **Prueba para Identificación de Alcaloides**

Para la prueba de identificación de alcaloides se hacen ensayos generales como son (Wagner, Mayer, Dragendorff, Scheibler, Sonneschein y Reineckato) sobre el extracto, se considera que hay presencia de alcaloides si se obtienen cuatro resultados positivos de los ya citados.

### **Reactivo de Mayer**

(Yoduro de mercurio y potasio) es de color blanco o crema en el momento en el que se agrega tres o cinco gotas de acidulada del extracto

### **Reactivo de Wagner**

(yodo-yoduro de potasio), cuando se le añade tres o cinco gotas se pone de color marrón.

### **Reactivo de Dragendorff**

(Yoduro de bismuto y potasio), en el momento en el que agrega tres a cinco gotas de solución acidulada del extracto, entonces se pondrá de color rojo a naranja.

### **Reactivo de Scheibler**

(Ácido fosfortungstico), cuando se le añade de tres a cinco gotas, entonces adquiere un color blanco.

### **Reactivo de Sonneschein**

(Ácido fosfomolibdico), en el momento en el que se añade de tres a cinco gotas, cambia de coloración a naranja.

### **Reactivo de Reineckato**

( $\text{NH}_4[\text{Cr}(\text{NH}_3)_2(\text{SCN})_4]2\text{H}_2\text{O}$ ), da un precipitado floculante color rosa cuando se agrega de tres a cinco gotas.

## **- Prueba de Identificación de Flavonoides y Compuestos Fenólicos <sup>(56)</sup>**

Las plantas condensan una gran pluralidad de elementos fenólicos dadas en la etapa del desarrollo, estos compuestos productos de la ruta biosintética del ácido fenilpropanoico.

Es interesante señalar que este tipo de metabolitos, caracterizada por su organización posee a las antraquinonas, naftoquinonas y taninos, este último es condensado de un flavonoide como la antocianidina y si es hidrolizable de ácidos fenólicos.

### **Reactivo de Shinoda**

(Limaduras de magnesio + HCl concentrado) presenta una coloración de amarillo a rojo a magenta, en el caso de los flavanoles. Serán flavonas si se presenta una coloración roja, azul o violeta. Si en caso la coloración fuera amarilla, entonces sería isoflavonas. Se deduce que son isoflavononas, chalconas y auronas si en caso fueran incoloras.

### **Reactivo de Cloruro Férrico**

(Cloruro férrico disuelto en agua), emanarán un color azul, verde o negra cuando se agrega de tres a cinco gotas, prueba general.

### **Reactivo de Gelatina al 1%**

(Gelatina + cloruro de sodio), cuando se le añade de tres a cinco gotas, entonces será de color blanco para identificar taninos.

### **Reactivo de Hidróxido de sodio al 5% (Reacción de Bortranger)**

Para detecta Antraquinonas y Naftoquinonas, se le añadirá de tres a cinco gotas y luego se pondrá de color rojo.

### **- Metabolitos Primarios <sup>(57)</sup>**

#### **Prueba para Glúcidos**

Son polisacáridos más comunes en las plantas, se encuentran asociados a las ligninas e integran el material estructural de la pared celular.

#### **Reactivo de Fehling A y B**

A la muestra de le añade 5 mL de Fehling A y B y se lleva a baño maría la presencia de un precipitado anaranjado ladrillo nos da la presencia de Glúcidos en la muestra.

#### **- Prueba para Almidón**

El almidón es la mezcla de dos polímeros como son la Amilosa y la Amilo pectina.

#### **Reactivo de Lugol**

Si existe almidón en la muestra, entonces adquirirá el color oscuro luego de añadir tres gotas de Lugol.

## **-Prueba para Cetonas**

### **Reactivo de 2,4 Dinitrofenilhidrazina (DNPH)**

A la muestra se le agrega una gota de DNPH si presenta un precipitado amarillo o naranja rojizo nos da la presencia de cetonas en la muestra

### **-Prueba de Solubilidad**

Para la prueba de Solubilidad tenemos que contar con el extracto seco, tomamos una pequeña cantidad de muestra seca y la colocamos en los tubos de ensayo para luego verter unos 3 a 5 mL de los solventes como (Alcohol de 96°, Metanol, Etanol, Cloroformo, Agua y Isopropanol) esta prueba nos da referencia en que solventes es más soluble la muestra a tratar.

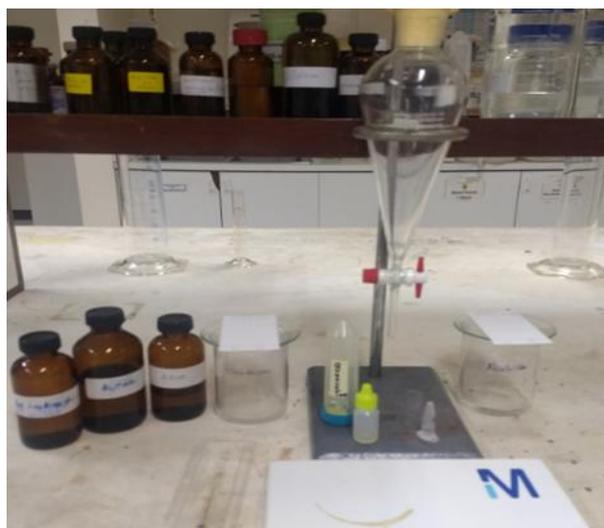
Debemos tener en cuenta la Polaridad del disolvente porque este le da propiedades de solubilización en diferentes solutos.

### **- Evaluación Cromatográfica en capa fina (CCF)**

Son técnicas analíticas simples, se puede realizar con muy poca muestra, es una técnica ampliamente usada en los controles de toda clase de productos naturales.

También puede ser empleado como ensayo semi cuantitativo comparando las intensidades de las manchas visualizadas con patrones adecuados.

La detección de los compuestos separados generalmente se realiza por métodos generales o específicos, la luz UV permite detectar sustancias que absorben a la longitud de onda larga 365nm y de onda corta a 254 nm <sup>(63)</sup>.



**Figura 9.** Evaluación Cromatográfica

Fuente: Elaboración propia, 2018.

### **Cromatografía en capa fina para Alcaloides**

Para la ejecución de este tipo de prueba es necesario el uso de capa fina para alcaloides, para lo cual se utilizó la placa cromatográfica de la marca Merck (TLC Silica del F254) como fase no permanente, para la fase móvil se usó el diluyente de elución de metanol: agua en proporción de (25:75) respectivamente.

Para la comparación se usó un estándar de Cafeína en concentración de 10 mg/ mL el cual se inyectó 5  $\mu$ l, caso similar con la muestra <sup>(63)</sup>.

En la placa cromatografía se aplicó 5  $\mu$ l del estándar y de muestra y una vez concluida la corrida se seca la placa en la plancha de calentamiento hasta la evaporación de todo el solvente, para luego aparecer las manchas de desplazamiento en la luz UV 254 nm. Para determinar los alcaloides encontrados se procede a rociar el ácido sulfúrico al 2 % y luego el reactivo de Dragendorff, como revelador, para una evidencia positiva aparecerá manchas naranjas. La muestra dio positivo para alcaloides <sup>(63)</sup>.



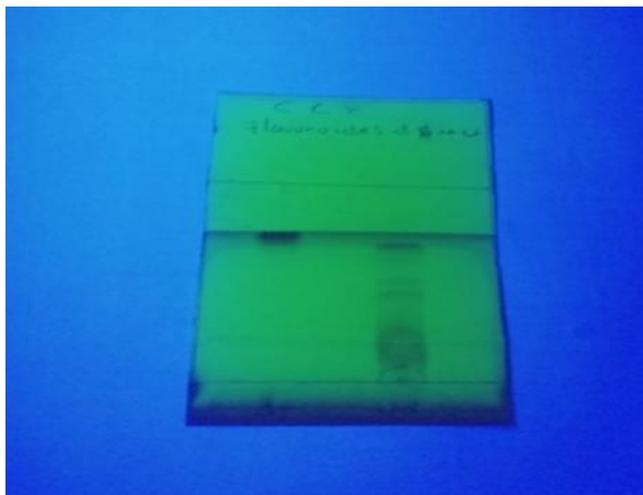
**Figura 10.** Cromatografía en Capa Fina “Alcaloides”

Fuente: Elaboración propia, 2018.

### **Cromatografía en capa fina para Flavonoides**

Para la aplicación de la prueba de cromatografía en capa fina para flavonoides, durante la etapa temporal, fue necesario la utilización de la placa cromatográfica. Mientras que para la etapa permanente se incluyó el solvente de elución de Butanol: Agua: Ácido acético glacial en proporción de (20:15:5) respectivamente, esta mezcla se distribuyó en una pera de bromo de 250 mL para luego agitarlo. Se estableció que la etapa temporal fue más compacta que la permanente <sup>(58,59)</sup>. Para la comparación fue necesario la utilización del estándar de Quercetina en una concentración de 10 mg/ mL, el cual se inyectó 5  $\mu$ l a la placa cromatográfica, situación parecida sucedió con la muestra de “Achiote”.

En la placa cromatográfica se aplicó 5  $\mu$ l del estándar y de muestra luego de haber finalizado la corrida. Acto siguiente, la muestra se secó dentro de una plancha de calor, hasta evaporarse los solventes. Destaca la luz ultravioleta a 254 nm, y utiliza como indicador de tricloruro de aluminio, para una muestra positiva, lo cual es particular de las manchas amarillas. La muestra dio positivo para flavonoides.



**Figura 11.** Cromatografía en Capa Fina “Flavonoides”.

Fuente: Elaboración propia, 2018.

#### **d) Procedimiento Experimental (etapa II)**

El presente trabajo tuvo como objetivo primero la determinación de la toxicidad aguda oral en ratas, para analizar si el extracto acuoso de *Bixa orellana* L. (achiote) causa mortalidad o signos adversos en los animales de experimentación y segundo la determinación de la actividad antidiarreica por inducción con aceite de ricino y la posterior administración de carbón activado <sup>(61-63)</sup> para la determinación del tránsito intestinal del extracto en estudio.

En el ensayo farmacológico, la administración del extracto acuoso fue por la vía oral.

En la prueba de actividad antidiarreica, la muestra fue administrada mediante sondas nasogástricas a un total de 25 ratas distribuidas de la siguiente forma: tres niveles de dosis en 15 ratas albinas machos (250, 500 y 1 000 mg/kg de peso corporal), 5 ratas control positivo, tratadas con el medicamento Loperamida a la dosis de 2 mg/kg y 5 ratas control negativo, animales normales sin tratamiento todos de la cepa Holtzman.

## - **Parte experimental**

Se determinó la toxicidad aguda por vía oral en ratas, según Guía OECD – Test 423 (método de clases) <sup>(60)</sup> y la determinación de la actividad antidiarreica por vía oral del extracto acuoso de *Bixa orellana* L. (achiote) mediante la técnica citada en el Manual del Cytel .

### **Animales de experimentación**

Fueron usadas ratas albinas machos (cepa Holtzman) de 8 - 10 semanas de edad con un peso promedio de 220 - 240 g; provenientes de las instalaciones del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. El proceso de cuarentena para la aclimatación a las condiciones ambientales y conductuales fue de cinco días.

El total de animales para todo el ensayo fueron distribuidos de la siguiente forma:

- ❖ Para la prueba de toxicidad aguda oral: un grupo de 3 ratas con una repetición y un control (total 9).
- ❖ Otros 5 grupos de 5 animales por cada tratamiento, que incluye un grupo control positivo y uno control negativo, ratas normales, para el ensayo farmacológico.

### **Dosificación y tratamiento**

#### **Evaluación de la toxicidad aguda oral - Método de Clases (DL50)**

Se evaluó la toxicidad aguda oral del extracto acuoso de *Bixa orellana* L. (achiote) que fue administrado oralmente de acuerdo con la guía OECD Test 423, mediante el uso de una sonda nasogástrica a dos grupos de tres ratas cada uno (un grupo con una repetición) y un grupo control (agua destilada).

Se realizaron observaciones diarias, buscando signos o síntomas de toxicidad o efectos adversos y mortalidad en los animales de

experimentación. Además, se hizo control visual del suministro del agua y alimento ad libitum.

La prueba incluyó un tratamiento del extracto con una repetición con la dosis de 2000 mg/Kg de peso corporal. El volumen de administración de la muestra diluida en agua destilada fue de 1 mL, al grupo control se le administró el diluyente. La mortalidad fue observada diariamente hasta los 14 días.

Luego de la administración de la dosis, se hizo un seguimiento a los animales hasta 14 días para observar si hay mortalidad y si existen conductas anormales (como alteración en la actividad motriz, postración, depresión, irritabilidad) o presencia de signos de toxicidad (como salivación, convulsión, piloerección, disnea, diarrea, entre otros).

Se realiza registros de peso corporal a los animales de experimentación, antes de iniciada la prueba e interdiariamente hasta el final de la prueba (14 días). Se evaluó si hubo pérdida de peso en los animales ensayados.

- **Determinación de la Actividad Antidiarreica**

Se utilizaron 25 ratas albinos machos de la cepa Holtzman.

La prueba incluyó un total de cinco tratamientos. Los tratamientos del extracto acuoso y sus respectivos valores de concentración ensayados son detallados en la Tabla siguiente. (Tabla N° 7)

La muestra es administrada en sus tres concentraciones 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg por catorce (14) días. El día quince (15), se administra por vía oral, aceite de ricino a la dosis de 0.5 ml/kg para la generación del aumento del tránsito o motilidad intestinal a todos los grupos incluyendo el control. A la hora, se administró carbón activado al 10% (marcador, 0,1 mL/10 g de peso) por vía oral. Todos los animales se sacrificaron al cabo de dos horas, por dislocación cervical.

Se seccionó el intestino por las cardias y la válvula ileocecal de todos los animales y fue medida la distancia en centímetros a partir del píloro hasta el sitio del intestino a donde logró llegar el carbón activado, marcando su recorrido. Para la cuantificación de los resultados se tomó la dosis de loperamida (2 mg/kg) y se calculó el porcentaje correspondiente al avance marcado del carbón tomando el largo del intestino como el 100 %.

- **Condiciones de Ensayo**

Las condiciones de temperatura, humedad y fotoperiodo en el tiempo de experimentación se registraron en los siguientes rangos: temperatura = 22 +/-2°C; humedad = < 70 % y fotoperiodo: 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El acceso al agua y alimento fue *ad libitum*.

- **Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos, en los diferentes tratamientos, se analizaron estadísticamente para evaluar el efecto del producto sobre los diferentes tratamientos con niveles de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ) por un test de ANOVA y luego por uno de comparación múltiple (Test de Tukey) para determinar si existen diferencias significativas. El análisis estadístico se realizó con el uso de los programas Excel y el software SPSS, versión 22 para Windows.

## CAPÍTULO IV:

### PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 4.1 Presentación de resultados

**TABLA N° 1.** Marcha fitoquímica del extracto acuoso de *Bixa orellana* L. (achiote)

<b>IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRIMARIOS</b>		
Metabolitos Primarios	Reactivo de identificación	Resultado
Glúcidos	Fehling A y B	Precipitado anaranjado ladrillo (+++)
Almidón	Lugol	Coloración oscura (-)
Cetonas	2,4 DNPH	Formación de un anillo rojizo (+++)
<b>IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS</b>		
Metabolitos secundario	Reactivo de identificación	Resultado
Alcaloides	Mayer	Precipitado blanco (-)
	Wagner	Precipitado marrón (++)
	Dragendorff	Precipitado rojo o naranja (+++)
	Scheibler	Precipitado o Color blanco (+)
	Sonneschein	Precipitado naranja (-)
	Reineckato	Color rosa (+++)
Compuestos fenólicos y Flavonoides	Shinoda	Color rojo (+)
	Cloruro férrico	Color verde (+++)
	Gelatina al 1%	Precipitado blanco (-)
	Reacción de Bortranger	Color rojo (+)
Aminoácidos	Ninhidrina	Color rosado (+++)

Donde:

(-) La coloración o precipitado no se evidencia, (+) La coloración o precipitado se evidencia poco, (++) La coloración o precipitado se evidencia moderadamente, (+++) La coloración o precipitado se evidencia notablemente.



**FIGURA 12.** Identificación de metabolitos.

Fuente: Elaboración propia, 2018.

**TABLA N° 2.** Prueba de solubilidad

<b>PRUEBA DE SOLUBILIDAD</b>	
<b>Solventes</b>	<b>Resultado</b>
Agua	(+++)
Alcohol 96° C	(++)
Metanol	(+)
Cloroformo	(-)
Isopropanol	(-)

Fuente: Elaboración propia, 2018

Leyenda:

(-) La solubilidad no se visualiza (+) La solubilidad en menor grado

(++) La solubilidad es moderada (+++) La solubilidad es mayor.

La muestra que mayor solubilidad tiene es con el agua (+++), alcohol (++) , metanol (+).

**TABLA 3.** Tratamientos de Experimentación toxicidad aguda.

Dosis (mg / Kg rata)	Nº de animales	Peso promedio (g)
2000 mg/kg	3	220,65 g
2000 mg/kg (repetición)	3	225.98 g
Control	3	229.42 g

Fuente: Elaboración propia, 2018

- **Determinación de la Actividad Antidiarreica**

Se utilizaron 25 ratas albinos machos de la cepa Holtzman.

La prueba incluyó un total de cinco tratamientos. Los tratamientos del extracto acuoso y sus respectivos valores de concentración ensayados son detallados en la siguiente tabla.

**TABLA N° 4.** Tratamientos de experimentación con *Bixa orellana* L. (achiote) y loperamida.

Grupo	Animales	Dosis (mg de extracto/kg rata)
Control	5	-----
Loperamida	5	2 mg/kg
Dosis 1	5	250 mg/kg
Dosis 2	5	500 mg/kg
Dosis 3	5	1000 mg/kg

Fuente: Elaboración propia, 2018

La muestra es administrada en sus tres concentraciones 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg por catorce (14) días. El día quince (15), se administra por vía oral, aceite de ricino a la dosis de 0.5 ml/kg para la generación del aumento del tránsito o motilidad intestinal a todos los grupos incluyendo el control. A la hora, se administró carbón activado al 10% (marcador, 0,1 mL/10 g de peso) por vía oral. Todos los animales se sacrificaron al cabo de dos horas, por dislocación cervical.

Se seccionó el intestino por el cardias y la válvula ileocecal de todos los animales y fue medida la distancia en centímetros a partir del píloro hasta el sitio del intestino a donde logró llegar el carbón activado, marcando su recorrido. Para la cuantificación de los resultados se tomó la dosis de loperamida (2 mg/kg) y se calculó el porcentaje correspondiente al avance marcado del carbón tomando el largo del intestino como el 100 %.

- **Condiciones Ambientales**

Durante la duración de la prueba, los parámetros ambientales registrados en el área donde se desarrolló la prueba corresponden a los siguientes:

**TABLA N° 5.** Condiciones ambientales.

<b>CONDICIONES</b>	<b>VALORES</b>
Temperatura (°C)	21.5
Humedad (%)	62
Luz, Oscuridad:	12L : 12O

Fuente: propia.

- **Toxicidad Aguda Oral**

El extracto acuoso de *Bixa Orellana* L. (achiote) y el control no produjeron mortalidad en la dosis administrada con la repetición durante las 72 horas de observación hasta los 14 días de evaluación del ensayo. La DL<sub>50</sub> por vía oral del extracto acuoso es mayor a 2000 mg de producto/Kg de rata (> 5,0 g/ Kg de rata).

Con base a las observaciones realizadas, no se presentó pérdida de peso, alteraciones en la actividad motriz, convulsiones, diarrea, etc., ni efectos adversos en las ratas tratadas a las dosis ensayadas. No se produjo disminución de peso corporal.

**TABLA N° 6.** Resultados de la Toxicidad Aguda Oral.

<b>Dosis (mg/Kg rata)</b>	<b>Mortalidad Machos Muertos/Total</b>
2000 mg/kg	0/3
2000 mg/kg (repetición)	0/3
Control	0/3

Fuente: Elaboración propia, 2018

- **Actividad Antidiarreica**

El extracto acuoso de *Bixa orellana* L. (achiote) analizado, presenta Actividad Antidiarreica en el modelo estudiado, a las dosis de 500 y 1000 mg de muestra/Kg de rata. Los datos son mostrados en la tabla y el gráfico a continuación:

**TABLA N° 7:** Resultados de la Actividad Antidiarreica*Bixa orellana* L. (achiote) - Loperamida.

Grupo	Animales	Dosis (mg / Kg rata)	Longitud intestinal media (cm)± DS	Distancia Promedio recorrida por el carbón activado (cm) ± DS	% Inhibición del transito	Nivel de Significancia
Control	5	-	78.72 ± 5.07	73.76 ± 4.15	-	-
Loperamida	5	2 mg/kg	78.76 ± 5.32	21.2 ± 2.58	71.25%	* p < 0.05
Dosis 1	5	250 mg/kg	76.24 ± 5.06	68.82 ± 4.54	6.70%	p > 0.05
Dosis 2	5	500 mg/kg	79.10 ± 5.20	33.78 ± 3.91	54.20%	* p < 0.05
Dosis 3	5	1000 mg/kg	77.54 ± 4.47	24.62 ± 3.86	66.62%	* p < 0.05

Fuente: Elaboración propia, 2018

\* p &lt; 0.005= Existen diferencias significativas con respecto al control.

En la tabla N°7 se evidencia los resultados en promedios de todas las concentraciones de *Bixa orellana* L. (achiote) y su control positivo (Loperamida) en la distancia recorrida del carbón activado en el intestino.

También se evidencia la efectividad en porcentajes comparado con el control negativo, siendo así el de mayor actividad el de 1000 y 500 mg/Kg, no superando al fármaco de Loperamida.

**TABLA N° 8.** Análisis estadístico del tratamiento de la actividad antidiarreica de *Bixa orellana* L. (achiote) vs Loperamida.

N° de Animal	250mg/kg	500 mg/kg	1000mg /kg	Loperamida	Control
1	66.8	31.1	24.3	20.1	75.2
2	62.5	29.6	19.7	19.8	79.7
3	71	38.5	29.5	18.6	68.4
4	69.2	32.4	22.4	25.1	73.3
5	74.6	37.3	27.2	22.4	72.2
<b>Promedio</b>	68.820	33.780	24.620	21.200	73.760
<b>Desviación Estándar</b>	4.537	3.912	3.864	2.578	4.145

Fuente: Elaboración propia, 2018

En la tabla N°8 se evidencia los promedio de todos los grupos ensayados, donde podemos decir que el control positivo es el que reduce mejor la actividad antidiarreica seguido de 1000 y 500 mg/Kg de concentración de *Bixa orellana* L. (achiote), dejando un poco actividad para la concentración de 250 mg/Kg.

**TABLA N° 9.** Análisis de varianza.

1. ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	12503.062	4	3125.7654	209. 378	0.000	2.866
Dentro de los grupos	298.576	20	14.9288			
Total	12801.638	24				

Fuente: Elaboración propia, 2018

En la tabla N° 9 se demuestra que las concentraciones ensayadas junto con el control positivo (Loperamida) son estadísticamente diferentes en sus medias.

## 2. Análisis Múltiple Posterior: Prueba de Tukey

Se halla la Diferencia Honestamente Significativa (HSD) utilizando la Prueba de Tukey,  $HSD = 7,31$  los valores mayores a este dato son los grupos que hacen la diferencia (como valor absoluto), por lo tanto, son los que mostrarían inhibición mayor.

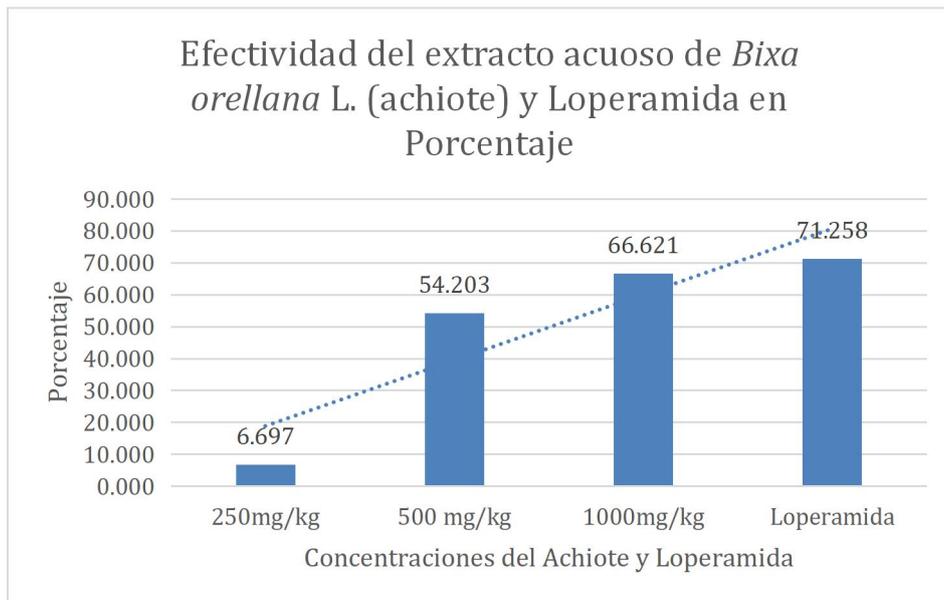
**TABLA N° 10.** Análisis múltiple posterior: Prueba Estadística de Tukey.

	Control	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	Loperamida 2 mg/kg
Control		4.94	39.98	49.14	52.560

Fuente: propia.

En la tabla N° 10 se ve evidenciado que las concentraciones de 500 y 1000 mg/Kg del extracto acuoso de *Bixa orellana* L. (achiote) tienen actividad Antidiarreica por que el valor absoluto de la diferencia de la medias de sus resultados es mayor al HSD que es 7.31

**CONCLUSIÓN:** Con un nivel de confianza del 95%, las dosis con mayor inhibición son 500 y 1000 mg/Kg.



**Figura 13.** Efectividad del extracto acuoso de *Bixa orellana* L. (achiote) y loperamida en Porcentajes.

Fuente: Elaboración propia, 2018

En la figura 11 se realizó la comparación del porcentaje de inhibición de los grupos experimentales y control positivo (Loperamida) con respecto al control negativo. Obteniendo como resultado un mayor índice de actividad antidiarreica del grupo control (71.258%), le segunda la dosis de 1000 mg/kg con (66.621%) y a la dosis de 500 mg/Kg (54.203%).

## 4.2 Contrastación de hipótesis

### Hipótesis específica I

El extracto acuoso de las hojas de *Bixa Orellana* L. (achiote) posee actividad antidiarreica comparada con loperamida en ratas inducidas con aceite de ricino.

**H<sub>0</sub>** El extracto acuoso de las hojas de *Bixa Orellana* L. (achiote). No posee actividad antidiarreica comparada con loperamida en ratas inducidas con aceite de ricino.

**H<sub>1</sub>** El extracto acuoso de las hojas de *Bixa Orellana* L. (achiote). Si posee actividad antidiarreica comparada con loperamida en ratas inducidas con aceite de ricino.

- Según el P valor  $p > 0.05$  se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ).
- P valor  $< 0.05$  se acepta la hipótesis alterna ( $H_1$ ).

**Resultado:** en la prueba estadística del test de ANOVA se obtuvo un  $p < 0.05$

**Decisión:** el extracto acuoso de *Bixa Orellana* L. (achiote) si posee actividad antidiarreica comparada con loperamida en ratas inducidas con aceite de ricino.

### **Hipótesis específica II**

Una dosis de concentración del extracto acuoso de las hojas de *Bixa Orellana* L. (achiote) posee actividad antidiarreica en las ratas inducidas con aceite de ricino.

**H<sub>0</sub>** Una dosis de concentración del extracto acuoso de las hojas de *Bixa Orellana* L. (achiote). No posee actividad antidiarreica en ratas inducidas con aceite de ricino.

**H<sub>1</sub>** Una dosis de concentración del extracto acuoso de las hojas de *Bixa Orellana* L. (achiote). Si posee actividad antidiarreica en ratas inducidas con aceite de ricino.

- Una dosis de concentración  $< 1000$  mg/kg y 500 mg/kg del extracto acuoso de *Bixa Orellana* L. (achiote). No posee actividad antidiarreica se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ).
- Una dosis de concentración de 1000 mg/kg del extracto acuoso de *Bixa Orellana* L. (achiote). Si posee actividad antidiarreica se acepta la hipótesis alterna ( $H_1$ ).

**Resultado:** En prueba estadística de % en efectividad del extracto acuoso se obtuvo los valores de 1000 mg/kg (66.6%) y 500 mg/kg (54.2%).

**Decisión:** una dosis de concentración del extracto acuoso de *Bixa Orellana* L. (achiote). Si posee actividad antidiarreica en ratas inducidas con aceite de ricino.

### Hipótesis específica III

El extracto acuoso de las hojas de *Bixa Orellana* L. (achiote) posee presencia de metabolitos secundarios que generan la actividad antidiarreica.

**H<sub>0</sub>** El extracto acuosos de las hojas de *Bixa Orellana* L. (achiote). No posee presencia de metabolitos secundarios que generan la actividad antidiarreica.

**H<sub>1</sub>** El extracto acuoso de las hojas de *Bixa Orellana* L. (achiote). Si posee presencia de metabolitos secundarios que generan la actividad antidiarreica.

- Según la marcha fitoquímica no posee metabolitos secundarios. Se acepta la hipótesis nula (H<sub>0</sub>)
- según la marcha fitoquímica si posee metabolitos secundarios. Se acepta la hipótesis alterna (H<sub>1</sub>)

**Resultados:** en la marcha fitoquímica observamos la presencia de los siguientes metabolitos secundarios alcaloides, compuestos fenólicos, taninos y flavonoides.

**Discusión:** si presenta metabolitos secundarios.

Finalmente después de realizar todos los análisis la hipótesis general y hipótesis específica queda resuelta que el producto del extracto acuoso de *Bixa Orellana* L. (achiote) si posee actividad antidiarreica.

### 4.3 Discusión de Resultados

En cuanto a la propuesto a la hipótesis específica 1, referente a que el achiote posee efectos inhibidores respecto de la diarrea, existen diversos estudios que ratifican esta afirmación, entre los que podemos mencionar: **Troncoso, H.** <sup>(6)</sup> en su estudio determinó que el extracto acuoso del *Bixa orellana* L. (achiote) posee actividad antibacteriana, de igual forma, **Sumari, L** <sup>(4)</sup> en su investigación, la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico del *Bixa orellana* L. (achiote) fue moderada frente a *Staphylococcus aureus*, sin embargo, aún con los ocho ecotipos el extracto acuoso del *Bixa orellana* L. (achiote) presentó una actividad baja contra el *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con CMis

de 6.67 - 13.33 mg/mL y contra *Enterococcus faecalis* con CMIS de 8-13.33 mg/mL. Estos resultados confirman la presencia de la actividad antibacteriana de *Bixa Orellana L. (achiote)*, lo cual apoya a la presente investigación, la cual determinó que el extracto acuoso del *Bixa Orellana L. (achiote)* posee actividad antidiarreica, asimismo reduce los síntomas de la diarrea.

En relación a lo señalado en la hipótesis específica 2, respecto del nivel de concentración del extracto acuoso de *Bixa orellana L. (achiote)*, se pueden mencionar los estudios siguientes: De acuerdo con los resultados de **Troncoso, H.**, <sup>(6)</sup> la difusión en placa de los cuatro extractos en estudio (extracto acuoso de hojas, extracto acuoso de corteza, extracto etanólico de hojas y extracto etanólico de corteza) solo los extractos etanólicos de hojas como de corteza tuvieron actividad consideraba frente a una cepa en estudio *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición de 20,3 mm y 28 mm respectivamente. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) por el método de dilución en tubo y dilución en placa de los extractos frente a *Staphylococcus aureus*. Las cepas de *Staphylococcus aureus* son más susceptibles al extracto etanólico de hojas con valores promedio de CIM 200 mg/mL, CBM 225mg/mL en comparación al extracto etanólico de corteza con valores de CIM 240 mg/mL, CBM 270 mg/mL. De igual forma, se puede determinar en los valores promedio del extracto, en la investigación realizada por **Sumari, L**<sup>(4)</sup> ya que, los resultados de la capacidad antimicrobiana revelaron actividad de los extractos acuosos a 50 mg/mL, frente a las bacterias Gram positivas (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*). Con respecto a la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos acuosos contra *Enterococcus faecalis*, se evidenció baja actividad antimicrobiana para el ecotipo 3 y los ecotipo 4 y 6 (CMI de 6.67 y de 8 1 mg/mL respectivamente), mientras que con *Staphylococcus aureus* los ocho ecotipos mostraron moderada actividad, con valores de CMI entre 2.67 y 6.67 mg/mL; en cuanto a los extractos hidroalcohólicos de los ocho ecotipos de *B ore/lana*, la actividad antimicrobiana fue moderada frente a *Staphylococcus aureus* (CMis entre 1.67 y 3.33 mg/mL). Estos resultados ratifican los obtenidos

en la presente investigación, la cual determinó que el extracto *Bixa orellana* L. (achiote) a dosis de 500 y 1000 mg/kg de peso de rata, demostró tener actividad antidiarreica y tener capacidad de reducir los síntomas del aumento del tránsito o motilidad intestinal atenuando los procesos generados por la inducción con aceite de ricino, comparado con el control, siendo estadísticamente significativo ( $p < 0.005$ ).

En referencia a la hipótesis específica 3, referente a la presencia de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides, aminoácidos, existen varios estudios que señalan que estos actúan como antioxidantes, infiriendo así un efecto citoprotector, que en diferentes plantas ya se han comprobado su efecto gastroprotector, ansitesecretor, antiinflamatorio e inhibidor de la migración de las células inflamatorias y actividad ante los radicales libres; los flavonoides son considerados protectores celulares. **Ancheta, J.**,<sup>(12)</sup> también refiere que las hojas de achiote son ricas en: taninos, compuestos fenólicos, quercetina, alcaloides, como bixina y nor bixina, y los flavonoides, es por esa razón, por lo cual se concluye que el efecto gastroprotector del macerado de achiote que fue utilizado aumentando los niveles de prostaglandinas, se concluye que el macerado de *Bixa orellana* L. (achiote) tiene tendencia a ser citoprotector. De otro lado también **Muñoz, L.**<sup>(7)</sup> preparó el extracto por reflujo de *Bixa orellana* L. (achiote), al cual se le encontró, a través de un tamizaje fitoquímico porcentajes promedios sobre alcaloides; triterpenos/esteroides, antocianidinas, flavonoides, saponinas y taninos, así mismo, se cuantificó los flavonoides totales expresados como quercetina mediante espectrofotometría UV/Visible a 256 nm (longitud de onda de máxima absorción), encontrándose en un porcentaje promedio de 1.25%. Del mismo modo, en la investigación de **Troncoso, H.**,<sup>(6)</sup> con respecto a la marcha fitoquímica realizada al extracto acuoso y etanólicos de *Bixa orellana* L. (achiote); se observa la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, compuestos fenólicos y aminoácidos, no obstante, el extracto etanólico de hojas posee también compuestos

fenólicos que se considera el por qué tiene mayor actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*.

Los resultados obtenidos justifican el uso de hojas y corteza dándole un valor agregado al cultivo de *Bixa orellana* L. (achiote). De otro lado la presente investigación determinó la presencia moderada de alcaloides, compuestos fenólicos y flavonoides; y la presentó una evidencia notable de aminoácidos. Habiéndose encontrado estos compuestos en el estudio, efectivamente el extracto acuoso del achiote puede tener efecto antidiarreico, debido a que estos compuestos, metabolitos atribuyen esta condición.

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **5.1 Conclusiones**

- Los metabolitos secundarios del extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) fueron identificados como: taninos, alcaloides, compuestos fenólicos y flavonoides como posibles responsables de la actividad antidiarreica.
- El grado de concentración de la dosis de 1000 mg/kg del extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) presentó mayor actividad antidiarreica.
- La actividad antidiarreica del extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) presentó un porcentaje de inhibición 66.62% en comparación con loperamida 71.25%

## 5.2 Recomendaciones

- A partir de los resultados encontrados con relación al grado de concentración del extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote), que presenta un efecto antidiarreico sumamente sensible, se realicen otras investigaciones en la misma orientación a fin de ampliar la información, a fin de que puedan ser utilizados adecuadamente.
- Se desarrollen estudios complementarios sobre otras propiedades curativas de las hojas de *Bixa Orellana* L. (achiote), con el propósito de encontrar alternativas en el tratamiento antidiarreico.
- Dar a conocer más sobre los beneficios de extractos de la especie de *Bixa orellana* L. (achiote) a fin de que pueda ser considerado en la elaboración de productos antidiarreicos.
- se recomienda según los resultados obtenidos utilizar *Bixa orellana* L. (achiote) como un producto natural en el tratamiento antidiarreico.
- Realizar charlas sobre *Bixa orellana* L. (achiote) para dar a conocer más como producto antidiarreico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. La Torre, R. Valor predictivo del recuento de leucocitos en material fecal para el diagnóstico de Salmonella shiguela y E. coli en lactantes y preescolares con enfermedad diarreica aguda atendidos en el hospital María Auxiliadora 2013-2014 (Tesis para optar el título profesional de médico cirujano). Lima: Universidad Ricardo Palma; 2016.
2. Gonzáles K, Valencia J. Programa de química: Tamizaje fitoquímico preliminar del extracto etanólico de las hojas de Kalanchoe gastroni-bonnieri. Colombia: Universidad de Quindío; 2015. Consultado el 14 de mayo del 2018. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S102555832009000200003&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S102555832009000200003&script=sci_arttext&tlng=en)
3. Ministerios de Salud. Boletín epidemiológico del Perú. Perú: 2017 (26); 537-539.
4. Sumari, L. Actividad antimicrobiana de los extractos acuosos e hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de ocho ecotipos de B. ore/lana L., frente a, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y Candida albicans (Tesis para obtener la titulación). Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2009.
5. Rojas R. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación de polifenoles totales in vitro, de las hojas de ocho morfotipos de bixa orellana l. (Tesis para optar el título de químico farmacéutico). Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2012.
6. Troncoso, H. Evaluación de la actividad antibacteriana, concentracion minima inhibitoria y concentracion bactericida minima in vitro de los extractos acuoso y etanolico de hojas y corteza frente al crecimiento de escherichia coli, klebsiella oxytoca, proteus mirabilis, pseudomona aeruginosa y staphylococcus aureus (Tesis de grado). Arequipa: Universidad Católica de San María; 2014.

7. Muñoz, L. Estudio farmacognóstico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *bixa orellana* (achiote) proveniente del distrito de usquil, provincia de Otuzco, región La Libertad (Tesis para obtener el grado). Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2015.
8. García, M. Efecto del extracto hidroalcohólico de la *bixa orellana* "achiote" comparado con metformina sobre los niveles de glicemia en *rattus rattus* (Tesis de grado). Trujillo: Universidad César Vallejo; 2016.
9. Huamán, O, Anao I, Béjar E, Sandoval M. Efecto del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Bixa orellana* (achiote), en la secreción gástrica de ratas. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
10. Robalino, C. Evaluación del efecto antidiarreico y cicatrizante de la infusión y del extracto etanólico de *Cyclosporum leptophyllum* (Pers.) Sprague en ratones (*Mus musculus*) y conejos (*Oryctolagus cuniculus*) (Tesis para obtener título de bioquímica farmacéutica). Chimborazo: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2014.
11. Astacio J. Efecto citoprotector del extracto acuoso de hojas de *Bixa Orellana* (achiote) en úlceras gástricas inducida por indometacina en un modelo de ratones (Tesis para optar el título de doctor en medicina). El Salvador: Universidad José Matías Delgado; 2011.
12. Ancheta JR, Guzmán Santamaría MG. Efecto citoprotector del extracto acuoso de hojas de *Bixa Orellana* L.(achiote) en úlceras gástricas inducidas por indometacina en un modelo de ratones. [Tesis doctoral] Antiguo Cuscatlán (El Salvador): Universidad Dr. José Matías Delgado; 2011.
13. Pérez S, Cuen M y Becerrar R. El achiote. *Biodiversitas* 46: 7-11. Consultado (10 de junio del 2018). Disponible en: <http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv46art2.pdf>
14. *Species Plantarum*. *Bixa orellana* L. *Species Plantarum* 1: 512-1753.
15. Magallanes C, Aucasime L. Magallanes M. Conservación de plantas alimenticias y medicinales nativas de la provincia de Huamanga.

- Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Instituto Superior Mons. Víctor Álvarez Huapaya. Ayacucho - Perú. 1995.
16. Rojas, R. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación de polifenoles totales, in vitro, de las hojas ocho morfotipos de *Bixa orellana* L. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2012.
  17. Brack E. Diccionario Enciclopédico de plantas útiles del Perú, PNUD, Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. 1999.
  18. 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.
  19. Mejía K, Rengifo E. Plantas medicinales de uso popular en la Amazonía Peruana. Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) y el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP). Lima: 2000.
  20. Huamán O. Efecto anti ulceroso del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Bixa Orellana* (achiote), en ratas. Available from: <http://ateneo.unmsm.edu.pe/ateneo/handle/123456789/1131>
  21. 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.
  22. Ulloa C. J. L. Zarucchi; Leon B Alnaldoa. edición especial 2004, 1-242
  23. Aguirre Z; et al *Botánica Austro ecuatoriana*, Abya Yala, 2002.
  24. González Y; et al. Estudio de la irritación dérmica primaria en piel dañada de conejos tras la exposición a un extracto alcohólico de *Bixa Orellana* L. *Rev. Cubana Estomatol.* 1989.
  25. Pérez F; et al. Pomada de *Bixa Orellana* en el tratamiento de heridas quirúrgicas y accidentales. *VET-UY. Agro y veterinaria* 2004. Disponible en: <http://www.vetuy.com/articulos/laboratorio/050/009/lab009.htm>
  26. Junior A; et al Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. *Genet Mol Res* 2005.

27. Antunes L; et al. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 2005.
28. Lourido Pérez Hetzel de la C., Martínez Sánchez Gregorio. La Bixa orellana L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. *Rev Cubana Farm [Internet]*. 2010 Jun [citado 2018 Nov 1] ; 44( 2 ): 231-244. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152010000200012&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152010000200012&lng=es).
29. Russell K; et al. Hypoglycaemic activity of Bixa Orellana extract in the dog. *Methods Find Exp. Clin Pharmacol*. 2008.
30. Agner A; et al. DNA damage and aberrant crypt foci as putative biomarkers to evaluate the chemopreventive effect of annatto (Bixa Orellana L.) in rat colon carcinogenesis. *Mutat Res*. 2005.
31. Kroes R; Verger P. *Who Food Additives Series: 52. Annatto Extracts*. World Health Organization, Safety evaluation of certain food additives and contaminants. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2004; 922:1-176. Erratum in: *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2005; 928:157. Available from: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v52je03.htm#ref>
32. Gutiérrez M. "Bixadent", nuevo producto natural como revelador de placa dentobacteriana. VI Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería. La Habana, 2005. Disponible en: <http://www.memsoctbio.sld.cu/habana2005/arrepdf/T078.PDF>
33. Bautista A; et al. Subacute toxicity assessment of annatto in rat. *Food Chem Toxicol*. 2004; 42(4):625-9
34. Levy L; et al. Bixin and norbixin in human plasma: determination and study of the absorption of a single dose of Annatto food color. *Analyst*. 1997.
35. Eighteenth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 1997.
36. Zegarra L; et al. Double-blind randomized placebo-controlled study of Bixa Orellana in patients with lower urinary tract symptoms associated to benign prostatic hyperplasia. *Int Braz J Urol*. 2007.

37. Germano MP; et al. Drugs used in Africa as dyes: 1. Skin absorption and tolerability of Bixa Orellana L. *Phytomedicine*. 1997.
38. Moreira V, López A. *Revista española de enfermedades digestivas*. Servicio de S.L.Madrid.2006.
39. Velásquez P. L, et al. *Farmacología básica y clínica*. 17 ediciones. Editorial Médica Panamericana. 2004.
40. Román E, Barrio J, López J. *Diarrea aguda*. Hospital Universitario puerta de hierro majadahona. Madrid. [revista en internet].2008. [acceso 22 de diciembre de 2014]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/advwired/diarrea-ag>.
41. Rocío, t. *Efecto antidiarreico del extracto hidroalcohólico de las hojas de Schinus molle L molle - Ayacucho -2014*.
42. Goodman, S. y Gilman, A. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Edit. Me Graw Hill interamericana- México.1996.
43. Farthing M, Salam M. *Diarrea aguda en adultos y niños: una perspectiva mundial*. Guía práctica de la Organización mundial de Gastroenterología. Disponible en: <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/acute-diarrheaspainish-2012.pdf>.
44. Tovar Acero C. *Enfermedad diarreica: una enfermedad de países en desarrollo*, [Revista de investigación]. 2008. [http://www.unisinu.edu.co/investigacion/revistas\\_en\\_pdf/revistas\\_semillas\\_pdf/enfermedad%20\\_diarreica.pdf](http://www.unisinu.edu.co/investigacion/revistas_en_pdf/revistas_semillas_pdf/enfermedad%20_diarreica.pdf).
45. Litter, M. *Compendio de Farmacología*. Quinta Edición. Edit. El ateneo. Argentina.2001.
46. <https://farmacomedia.files.wordpress.com/2010-06-digestivo.pdf>.
47. Núñez M, Rothlin R, Tessler J. *Farmacología del aparato digestivo*. [Revista internet]. 2004 [acceso 30 octubre de 2014]. Disponible en: <https://farmacomedia.files.wordpress.com/2010-06-digestivo.pdf>.
48. Flores, J. *Farmacología Humana*. Segunda edición .Edit. Científicas y técnicas S.A. México.2002.

49. Compañía farmacéutica Janssen. Boletín Loperamida. (16) 2 Consultado el 2 de julio del 2018. Disponible en: [http://www.janssen.com/bolivia/sites/www\\_janssen\\_com\\_bolivia/files/product/pdf/imodium\\_8sep2017.pdf](http://www.janssen.com/bolivia/sites/www_janssen_com_bolivia/files/product/pdf/imodium_8sep2017.pdf)
50. Martínez-Flórez, et. Departamento de Fisiología, Universidad de León y \*Hospital de León. España. <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>
51. Tamizaje fitoquímico preliminar del extracto etanólico de las hojas de *kalanchoe gastonis bonnierii* Published on Oct 5, 2016
52. Abbott D. Y Andrews R. S., Introducción a la Cromatografía, 3a ed., Alhambra, Madrid, 1970.
53. Kang, E.J.; Campbell, R.E.; Bastian, E.; Drake, M.A. (2010). «Invited review: Annatto usage and bleaching in dairy foods». *Journal of Dairy Science* 93 (9): 3891-3901. Consultado el 2 de mayo del 2018. Disponible en línea: [https://issuu.com/karenjgonzalez/docs/tamizaje\\_fitoqu\\_\\_mico\\_preliminar\\_de](https://issuu.com/karenjgonzalez/docs/tamizaje_fitoqu__mico_preliminar_de)
54. Valcarse Codes R, Espino Nuño F. Diccionario Akal de términos biológicos. Ediciones Akal. España; 2003.
55. Rocío Codes Valcarce publicado encastellanoen 2003 <https://basedja.firebaseio.com/37/Diccionario-Akal-De-Terminos-Biologicos.pdf>.
56. Tang H, Wei YB, Zhang C, Ning FX, Qiao W, Huang SL, et al. Synthesis, Biological evaluation and molecular modeling of oxoisoaporphine and oxoaporphine derivatives as new dual inhibitors of acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase *Eur J Med Chem.* 2009; 44(6):2523-32.
57. Payo A; Oquendo M; Oviedo R. 1996: Tamizaje fitoquímico preliminar de plantas que crecen en Sierra de Nipe, Holguín. *Revista Cubana de Farmacia*: 30 (2): 120-31.

58. Sandoval D., López D., Oquendo Suarez. 1990: Estudio fitoquímico preliminar de detección de alcaloides y saponinas en plantas que crecen en Cuba. *Revista cubana de Farmacia*: 24 (2):288-96.
59. Peña, R. G., 2002, Algunas consideraciones sobre el empleo de productos naturales en la medicina natural y tradicional. Monografía. Bayamo:2-6.
60. OECD. Organization for economic co-operation and development. Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class. Test N° 423: 1- 14. 2001.
61. Bansal. R.C; Goyal, M. (2005). Activated Carbon Adsorption. United States of America.
62. Sepúlveda, A.; Bustamante, F.; Silvestre, J.; Suárez, S.; Orozco, N. (2008). Adsorbentes para la eliminación de COVs. Del libro Eliminación de emisiones atmosféricas de COVs por catálisis y adsorción. Cooperación Iberoamericana, Argentina.
63. Podkoscielny, P., Nieszporek, K., Heterogeneity of activated carbons in adsorption of phenols from aqueous solutions — Comparison of experimental isotherm data and simulation predictions, *Applied Surface Science*, 253, 3563–3570, 2007.

# **ANEXOS**

## ANEXO 1. MATRIZ DE CONSISTENCIA

### TÍTULO: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDIARREICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *BIXA ORELLANA* L. (ACHIOTE) EN RATAS ALBINAS DE CEPA HOLTZMAN”

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPOTESIS	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	METODOLOGIA
<p><b>Problema General</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>¿El extracto acuoso de las hojas de <i>Bixa Orellana</i> L. (achiote) poseerá actividad antidiarreica en ratas inducidas con aceite de ricino?</li> </ul> <p><b>Problema Especifico</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>¿Cuál es la actividad antidiarreica del extracto acuoso de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote) comparado con loperamida en ratas inducidas con aceite de ricino?</li> <li>¿En qué concentración el extracto acuoso de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote) poseerá actividad antidiarreica en ratas inducidas con aceite de ricino?</li> <li>¿Qué metabolitos secundarios presenta en mayor concentración el extracto acuoso de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote) que genera la actividad antidiarreica?</li> </ul>	<p><b>Objetivo General</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Comprobar la actividad antidiarreica del extracto acuoso de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote) en ratas inducidas con aceite de ricino.</li> </ul> <p><b>Objetivo Especifico</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Comparar la actividad antidiarreica del extracto acuoso de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote) con loperamida en ratas inducidas con aceite de ricino.</li> <li>Determinar la concentración del extracto acuoso de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote) con actividad antidiarreica en ratas inducidas con aceite de ricino.</li> <li>Determinar algunos metabolitos secundarios con mayor presencia en el extracto acuoso de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote) que genera la actividad antidiarreica.</li> </ul>	<p><b>Hipótesis General</b></p> <p>El extracto acuoso de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote) posee actividad antidiarreica en ratas inducidas con aceite de ricino.</p> <p><b>Hipótesis Especificas</b></p> <p>El extracto acuoso de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote) posee actividad antidiarreica comparada con la loperamida en ratas inducidas con aceite de ricino.</p> <p>Una dosis de concentración del extracto acuoso de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote) posee actividad antidiarreica en ratas inducidas con aceite de ricino.</p> <p><b>3)</b> El extracto acuoso de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote) posee presencia de metabolitos secundarios que generan la actividad antidiarreica.</p>	<p><b>Variable Independiente</b></p> <p>Extracto acuoso de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote)</p> <p><b>Variable Dependiente</b></p> <p>Actividad antidiarreica</p>	<p><b>Variable Independiente</b></p> <p>Metabolitos Secundarios</p> <p>Del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote).</p> <p>alcaloides</p> <p>flavonoides</p> <p>compuestos fenólicos</p> <p>taninos</p> <p>(FITOQUIMICO)</p> <p><b>Variable Dependiente</b></p> <p>Actividad antidiarreica experimental con carbón activado.</p> <p>(FARMACOLOGICO)</p>	<p><b>Variable Independiente</b></p> <p>- identificación de los metabolito secundarios</p> <p>-Dosis de la concentración del extracto acuoso de <i>Bixa orellana</i> L.(achiote)</p> <p>250 mg/ kg</p> <p>500 mg/kg</p> <p>1000 mg/kg</p> <p><b>Variable Dependiente</b></p> <p>Recorrido en centímetros del carbón activado en el intestino de la rata</p>	<p><b>Fitoquimico</b></p> <p>- <b>Screning fitoquimico</b></p> <p>Alcaloides</p> <p>Flavonoides</p> <p>Compuestos Fenólicos</p> <p><b>Farmacológico</b></p> <p><b>Manual del CYTED</b></p>

## ANEXO 2. Fotos sobre las evaluaciones químicas

### a. Extracción acuosa de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote)



**b.- Marcha Fitoquímica de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote)**



**c.- Reactivos para la marcha fitoquímica.**



**d.- Resultados del tamizaje fitoquímico**



**e.- Reactivos para la prueba de solubilidad.**



**f. Evaluación cromatográfica en capa fina.**



**g. Evaluación cromatográfica en capa fina “alcaloides”.**



**h.- Secado de las placas cromatográficas.**



**i. Evaluación cromatográfica en capa fina "flavonoides".**



**j.- Secado de las placas cromatográficas.**



**k. Ratas albinas macho cepa Holtzman.**



**I.- pesado de las ratas.**



**m.- Administración oral del extracto de *Bixa orellana* L. (achiote).**



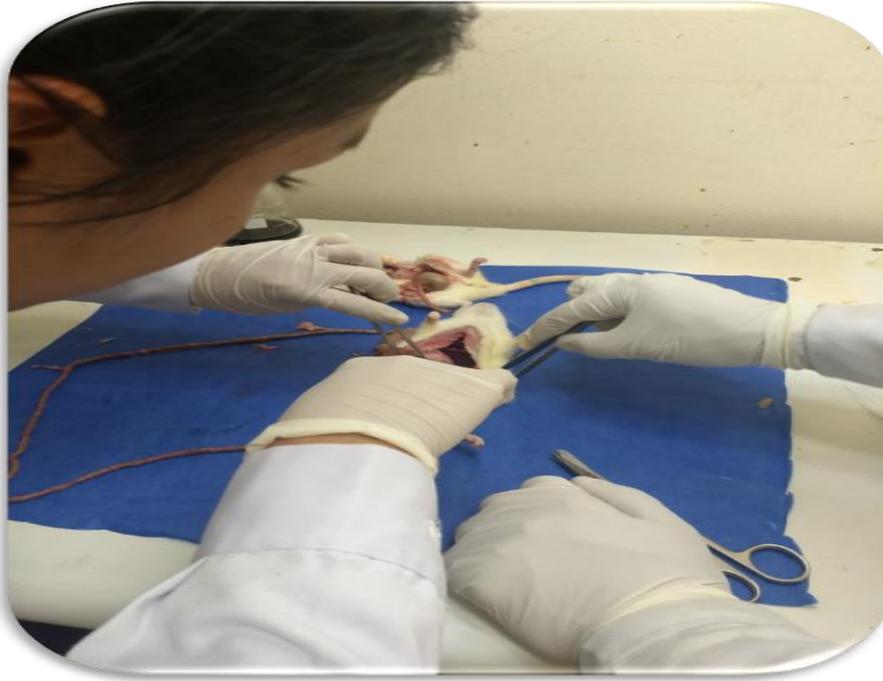
**n.- Inducción de diarrea con aceite de ricino por vía oral.**



**ñ.- Enmarcado del carbón activado.**



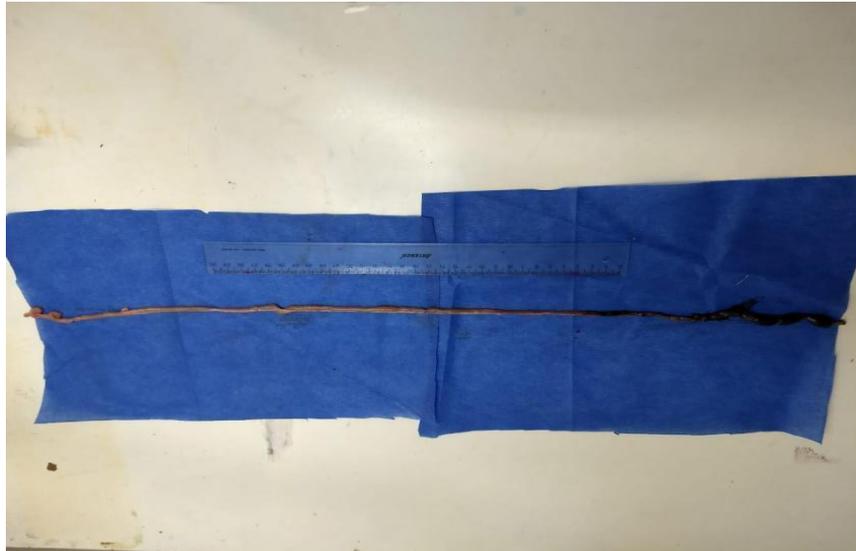
**o.- Disección de animales para remoción de intestino.**



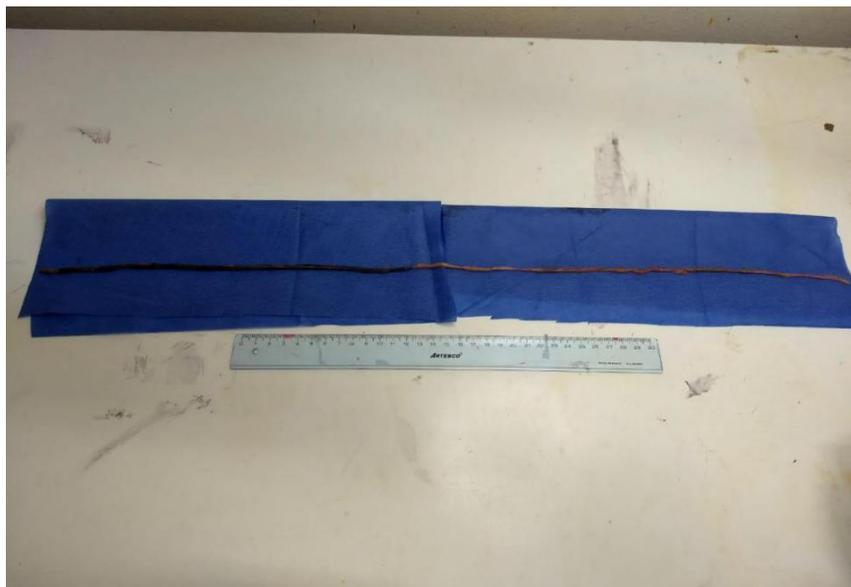
**p.- Control positivo: Loperamida 2 mg/kg.**



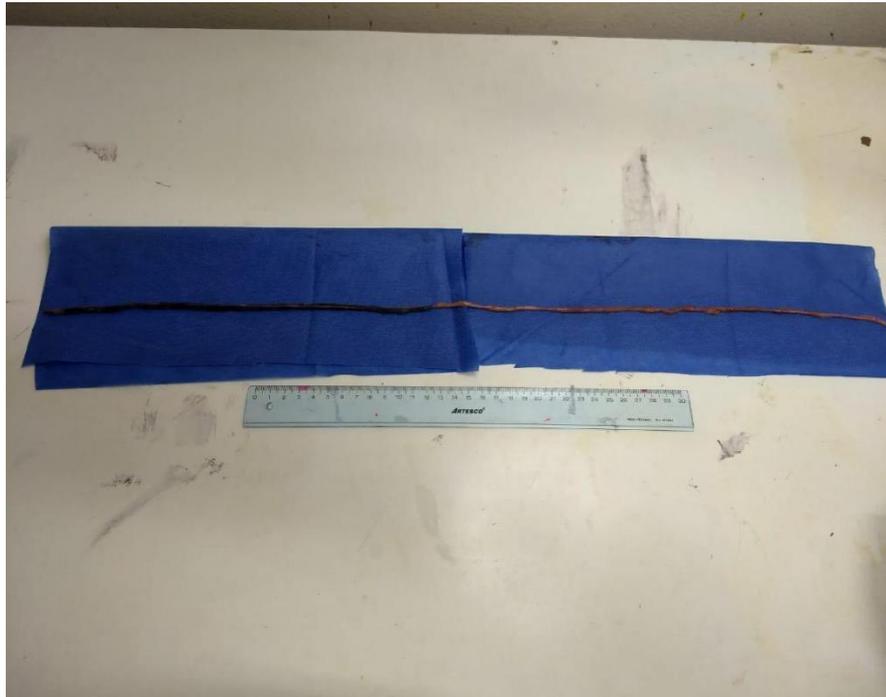
q.- Dosis de 1000 mg/kg de extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote).



r.- Dosis de 500 mg/kg de extracto acuoso de la hoja de *Bixa orellana* L. (achiote).



s.- Dosis de 250 mg/kg de extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L.  
(achiote)



### ANEXO 3: CONSTANCIA SOBRE LA TAXONOMÍA DE *BIXA ORELLANA* L. (ACHIOTE)



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

### CONSTANCIA N° 259-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa), recibida de **Alan García López y Aidee Guiselia Pariachi Castro**, estudiantes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, Universidad Inca Garcilaso de la Vega; ha sido estudiada y clasificada como: ***Bixa Orellana*** L. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA,

SUBCLASE: DILLENIIDAE

ORDEN: VIOLALES

FAMILIA: BIXACEAE

GENERO: ***Bixa***

ESPECIE: ***Bixa Orellana*** L.

Nómbre vulgar: "achiote"

Determinado por: Blgo. Severo Baldeón Malpartida

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime convenientes.

Lima, 04 de julio de 2018



  
**Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA**  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/ddb

## ANEXO 4: CERTIFICADO DEL ÓPTIMO ESTADO DE RATAS.



### CERTIFICADO

Lima, 20 de julio del 2018

Mediante la presente se certifica que las 31 ratas albinas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Holtzman, machos con un promedio de peso de 230 g, adquiridos el 20 de julio del 2018 por el bioterio de la UPCH, se encuentran en óptimo estado sanitario y fisiológico para ser utilizado en cualquier protocolo biomédico.

Se expide este documento para fines pertinentes.

Atentamente,

Dr. CRISTIAN PÍDOT ALVAREZ  
Jefe de Bioterio  
LID - UPCH  
C.M.V. 0808

## ANEXO 5: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

### FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA DETERMINAR LA DISTANCIA PROMEDIO RECORRIDO POR EL CARBON ACTIVADO

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDIAREICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE ACHIOTE (BIXA ORELLANA) EN RATAS ALBINAS CEPA HOLTZMAN

#### INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea

#### TABLA

Actividad Antidiarreica en el recorrido del carbón activado en sus diferentes concentraciones de Achiote en ratas albinas macho de cepa Holtzman

Nº DE SEMANAS	Tabla del Recorrido del Carbón activado en sus diferentes concentraciones de Achiote				
	Áreas de cierre de herida medidos con el Vernier				
	Concentración 250 mg/Kg	Concentración 500 mg/Kg	Concentración 1000 mg/Kg	Control positivo (Loperamida)	Control negativo
0 Días					
7 Días					
14 Días					

## HOJA DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO

N°

### CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCION DE DATOS

#### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDIAREICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE ACHIOTE (BIXA ORELLANA) EN RATAS ALBINAS CEPA HOLTZMAN

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

**MENOS DE**

**50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100**

1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) (x)  
\_\_\_\_\_
2. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) (x)  
\_\_\_\_\_
3. ¿Qué porcentaje de un ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) (x)  
\_\_\_\_\_
4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) (x)  
\_\_\_\_\_
5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia logica?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) (x)  
\_\_\_\_\_
6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) (x)  
\_\_\_\_\_

#### SUGERENCIAS

1. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?  
Considero que los ítems propuestos son los indicados.
2. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?  
Considero que los ítems propuestos son los indicados.
3. ¿Qué ítems considera que deberán reformularse o precisarse mejor?  
Considero que se tomaron las medidas para que el trabajo abarque lo esperado.

**Fecha:** 2018-12-18

**Validado por:** Erik Olivar Gallegos