

---

UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES  
CHIMBOTE

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y  
BIOQUÍMICA**

**EFEECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO  
HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Bixa orellana*  
(ACHIOTE) EN *Rattus rattus var. albinus* CON  
HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORA

**Bach. YOVERA SIRLUPÚ, VANESA PAOLA**

ASESOR

**Mgtr. LEAL VERA, CÉSAR ALFREDO**

**TRUJILLO – PERÚ**

**2019**

## 1. TÍTULO

**EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO  
HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Bixa orellana*  
(ACHIOTE) EN *Rattus rattus* var. *albinus* CON  
HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA**

## **2. EQUIPO DE TRABAJO**

### **AUTORA PRINCIPAL**

Bach. YOVERA SIRLUPÚ, VANESA PAOLA

### **ASESOR**

Mgr. LEAL VERA, CÉSAR ALFREDO

### **3. JURADO EVALUADOR DE TESIS**

Dr. Jorge Luis Díaz Ortega

**Presidente**

Mgtr. Nilda María Arteaga Revilla

**Miembro**

Mgtr. Luisa Olivia Amaya Lau

**Miembro**

Mgtr. César Alfredo Leal Vera

**Docente Tutor Investigador**

#### **4. AGRADECIMIENTO**

*Agradezco a Dios por permitirme obtener un logro más en mi vida, al darme fortaleza para hacer posible el cumplir con mis metas profesionales.*

*A mis padres y hermanas que gracias a sus consejos y palabras de aliento me han ayudado a crecer como persona y a luchar por lo quiero, gracias por enseñarme valores.*

*A los docentes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad ULADECH, especialmente a aquellos que contribuyeron con mi aprendizaje durante mi estancia en la universidad.*

*A mi asesor de tesis quien con sus conocimientos; su experiencia; su paciencia y su motivación ha logrado apoyar el cumplimiento de mi tesis con éxito.*

## 5. DEDICATORIA

*A Dios por guiar e iluminar mi camino; porque gracias a él yo tengo las fuerzas para seguir adelante.*

*A mis padres Rossana y Agustín con mucho amor y cariño les dedico todo mi esfuerzo por contar con su apoyo incondicional y estar en mis logros.*

*A mis hermanas Maritza, Jackeline y Cinthia, así mismo a cada uno de los seres que siempre están presentes en cada etapa de mi vida y ser la motivación constante.*

## 6. RESUMEN

El presente trabajo de investigación de tipo experimental, enfoque cuantitativo, nivel explicativo, tuvo como objetivo determinar el efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico (EHA) de las hojas de *Bixa orellana* (Achiote) en *Rattus rattus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>). En este estudio se utilizaron 24 especímenes machos con un peso de 240 ± 20 g dividido en 4 grupos: al grupo control negativo se administró 0,5 ml de agua destilada por 7 días, al grupo control positivo se le administró 0,5 ml de agua por 7 días y en el quinto día 0,2ml de CCl<sub>4</sub> por vía oral, a los grupos experimentales 1 y 2: 0,5ml de extracto hidroalcohólico de las hoja de *Bixa Orellana* (Achiote) a dosis de 300mg/kg p.c y 500mg/kg p.c respectivamente, por 7 días y luego se le administró CCl<sub>4</sub>. El efecto antioxidante se evaluó a través de la concentración de malondialdehído (MDA) mediante la técnica colorimétrica de sustancias reactivas al Ácido tiobarbitúrico (TBARS). Las concentraciones promedios de MDA para el grupo control negativo, control positivo y grupo experimentales 1 y 2, fueron de 0.0057; 0.0393; 0.0265 y 0.0180 μM de MDA observándose una diferencia significativamente entre ellos (p<0.05) a través del análisis de ANOVA. De acuerdo a los resultados se concluye que el extracto hidroalcohólico de hoja de *Bixa Orellana* (Achiote) tiene efecto antioxidante en tejido hepático de *Rattus rattus var. albinus*

**Palabras claves:** *Bixa orellana*, efecto antioxidante, hepatotoxicidad, Malondialdehído

## 7. ABSTRACT

The present research work of experimental type, quantitative approach, explanatory level, had as objective to determine the antioxidant effect of the hydroalcoholic extract (EHA) of the leaves of *Bixa orellana* (Achiote) in *Rattus rattus* var. *albinus* with hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ). In this study, 24 male specimens with a weight of  $240 \pm 20$  g divided into 4 groups were used: the negative control group was administered 0.5 ml of distilled water for 7 days, the positive control group was administered 0.5 ml of water for 7 days and on the fifth day 0.2ml of  $\text{CCl}_4$  orally, to experimental groups 1 and 2: 0.5ml of hydroalcoholic extract of the leaf of *Bixa Orellana* (Achiote) at a dose of 300mg/kg bw and 500mg/kg pc respectively, for 7 days and then  $\text{CCl}_4$  was administered. The antioxidant effect was evaluated through the concentration of malondialdehyde (MDA) by the colorimetric technique of substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS). The mean concentrations of MDA for the negative control group, positive control and experimental groups 1 and 2, were 0.0057; 0.0393; 0.0265 and 0.0180  $\mu\text{M}$  of MDA showing a significant difference between them ( $p < 0.05$ ) through the analysis of ANOVA. According to the results, it is concluded that the hydroalcoholic leaf extract of *Bixa Orellana* (Achiote) has an antioxidant effect in the liver tissue of *Rattus rattus* var. *albinus*

**Key words:** *Bixa orellana*, antioxidant effect, hepatotoxicity, malondialdehyde



## 8. CONTENIDO

1. TÍTULO.....	ii
2. EQUIPO DE TRABAJO.....	iii
3. JURADO EVALUADOR DE TESIS .....	iv
4. AGRADECIMIENTO.....	v
5. DEDICATORIA.....	vi
6. RESUMEN.....	vii
7. ABSTRACT.....	viii
8. CONTENIDO.....	ix
9. ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICO .....	x
10. ÍNDICE DE FIGURA .....	xi
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	6
III. HIPÓTESIS .....	14
IV. METODOLOGÍA .....	15
4.1 Diseño de la Investigación:.....	15
4.2 Población y muestra .....	17
4.3 Definición y Operacionalización de variables:.....	19
4.4 Técnicas e Instrumentos .....	20
4.5 Plan de Análisis .....	23
4.6 Matriz de Consistencia.....	24
4.7 Principios Éticos .....	25
V. RESULTADOS.....	26
5.1 Resultados.....	26
5.2 Análisis de resultados .....	28
VI. CONCLUSIONES Y ASPECTOS COMPLEMENTARIOS .....	30
6.1 Conclusiones:.....	30
Aspectos Complementarios .....	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	31
ANEXOS. ....	37

## 9. ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICO

<b>Tabla 1:</b> Efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) en <i>Rattus rattus var. albinus</i> . con hepatotoxicidad inducida expresados en concentración de MDA ( $\mu\text{M}$ ).....	26
<b>Tabla 2:</b> Comparación del efecto antioxidante expresados en concentración de Malondialdehído del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Bixa Orellana</i> (Achiote) en <i>Rattus rattus var. albinus</i> .....	27
<b>Tabla 3:</b> valores de absorbancia obtenidos en las medidas espectrofotométricas frente a la concentración equivalente de malondialdehído (MDA) correspondiente (absorbancia vs concentración de malondialdehído en $\mu\text{M}$ ).....	47
<b>Gráfico 01:</b> Representación de los Valores de Absorbancia (Y) Frente a la Concentración de MDA para las Disoluciones Patrón.....	48

## 10. ÍNDICE DE FIGURA

<b>Figura 01:</b> Recolección y selección de hojas de <i>Bixa Orellana</i> (achiote), en el distrito de Samne provincia de otuzco, departamento La Libertad.....	39
<b>FIGURA 02:</b> Certificación por Universidad Nacional de Trujillo Herbarium Truxillense (HUT) flor Peruana de los códigos 59459 y 59460 de la planta de <i>Bixa Orellana</i> (Achiote).....	40
<b>Figura 03:</b> Las hojas de <i>Bixa Orellana</i> (Achiote), lavado, desengrasadas con etanol al 96%, se realizó el tamizaje, en el laboratorio de la Universidad Católica los Ángeles Chimbote – filial Ttrujillo.....	41
<b>Figura 04:</b> Obtención del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Bixa Orellana</i> (Achiote).....	42
<b>Figura 05:</b> Adaptando a cada grupo en sus respectivas jaulas para alimentarlos con comida a diario realizando su limpieza de cada jaula con sus bebederos y con comida administrada del INS para una buena alimentación.....	43
<b>Figura 06:</b> Dislocación cervical de <i>Rattus rattus. var . albinus</i> .....	44
<b>Figura 07:</b> Determinación del efecto antioxidante mediante TBARS.....	47

## I. INTRODUCCIÓN

El ser humano, durante su vida sufre diferentes cambios metabólicos y funcionales el cual dará respuesta ante cualquier estímulo. Una de esas respuestas es la agresión tóxica es mucho más dañina en el hígado que en los otros órganos ya que su principal vía es la detoxificación, el cual se puede generar su propia lesión al producirse metabolito. La reacción de detoxificación más importante se realiza mediante el sistema enzimático del citocromo P450 (CYP450). El hígado es principal órgano que metaboliza los nutrientes, fármacos y otros xenobióticos principalmente tóxicos que deben atravesarlo antes de alcanzar el torrente sanguíneo y otros tejidos <sup>(1,2)</sup>.

En el hígado se produce la energía para metabolizar los lípidos. El exceso de grasa en el hígado puede causar fibrosis, cirrosis y cáncer hepatocelular. La esteatosis produce daño en el hígado también enfermedades etiológicas como afecciones por tóxicos, virales y colestásicas. Cuando no se sabe el grado de lípidos y metabolismo de los lípidos se va a producir enfermedades hepáticas cuando la esteatosis está inactiva. Si se produce acumulación de lípidos puede perjudicar el órgano <sup>(3,4)</sup>.

Es importante prevenir la enfermedad hepática para reducir el costo de los tratamientos, en trasplante de órgano. Se realiza aumento del rendimiento físico a partir de tratamiento con agentes antioxidantes, previniendo el daño ocasionado por los radicales libres, los resultados de la suplementación con este tipo de sustancias deben establecerse a largo plazo, dejando clara su intervención en la disminución del deterioro del rendimiento corporal provocado por el proceso normal de envejecimiento <sup>(5)</sup>.

En la actualidad hay mayor daño oxidativo en el sistema biológico esto puede ser a que el oxígeno es utilizado para las células para generar radicales libre, entonces también podríamos decir que los radicales libres produce daño degenerativo en la célula causando daño importantísimo en su funcionamiento. Los radicales libre no son intrínsecamente del etéreos, en el cuerpo humano se produce en pocas cantidades el cual tiene poca defensa contra bacterias y virus. Esto se produce mayormente en las células del cuerpo humano el cual debe ser protegido por antioxidante; ya que no puede neutralizar la acción oxidante de los radicales libres en proceso de liberación de electrones en la sangre que se capta por los radicales libres <sup>(6, 7, 8)</sup>.

Los radicales libres (RL), puede definir como una especie química, neutra o cargada, cuya capa periférica contiene una o más electrones, situación que le confiere gran inestabilidad desde el punto de vista cinético y energético, induciendo a la sustracción de un electrón, de moléculas estable, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Aunque su vida media es realmente corta, desde milisegundos a nano segundo, en cada reacción de oxidación con otro átomo o molécula, un radical libre puede generar varias formas, y con diferentes nivel de estabilidad y toxicidad.

En nuestra sociedad hay malos hábitos alimenticios, el cual afecta en la salud del ser humano, por la poca falta de consumo de antioxidantes que están en los vegetales y son ingeridos en la dieta <sup>(5, 9)</sup>.

Para prevenir el daño hepático se debe consumir una dieta rica en vitaminas antioxidantes (A, C y D). Glutación (GSH) y glutación peróxidasa (GSH- Px) protegen las células contra la lipoperoxidacion (LPO); para evitar el estrés oxidativo

ya que este proceso favorece al desarrollo de un mayor daño hepático, y la cirrosis biliar <sup>(10)</sup>.

Los antioxidantes son vitales para el organismo por la capacidad que tienen de proteger a las macromoléculas biológicas como es el daño oxidativo, entre los más conocidos figuran los tocoferoles, el ácido ascórbico, los flavonoides, antocianinas, carotenoides <sup>(11)</sup>.

El hombre desde su existencia ha hecho uso sobre las plantas medicinales tradicionales, para su sobrevivencia, pero no sabían su dosificación ni sus efectos tóxicos. En la mayoría del mundo se sigue haciendo usando de la planta medicinal para la curación de distintas enfermedades que a pesar de todos los avances tecnológicos o nuevos fármacos el hombre sigue usando las plantas medicinales el cual debe ir adquiriendo nuevos conocimientos para la curación de distintas enfermedades <sup>(12, 13)</sup>.

El uso tradicional de plantas medicinales tiene la finalidad curativa; se estudiaron las propiedades hepatoprotectora y antioxidante. El ser humano en su organismo tiene defensa antioxidante el cual no se formarían los radicales libres <sup>(10, 11)</sup>.

Las plantas medicinales tienen principio activo que ayudara en las propiedades terapéuticas, también se puede dar intoxicación o reacción adversa.

*Bixa orellana* pertenece a la familia *Bixaceae*, esta planta es original de América tropical, es una planta doméstica. Tiene distintos usos tradicionales para las quemaduras para impedir la formación de ampolla y ulcera, utiliza como antídoto para el envejecimiento <sup>(14, 15, 16)</sup>.

Ensayos in vivo realizados, dieron como resultado que el extracto hidroetanólico e hidroalcohólico de hojas de *Bixa orellana* (Achiote), presentando efecto antioxidante. Esto quiere decir que, a mayor concentración, mayor es este porcentaje de compuestos flavonoides totales, el cual representa el mayor porcentaje de captura de radicales radical libre <sup>(16)</sup>.

Teniendo en cuenta lo antes mencionado la presente investigación pretende aportar nuevos conocimientos para prevenir y disminuir el riesgo de padecer enfermedades hepáticas, por causas del aumento de sustancias reactivas de oxígenos presentes en el organismo, no es ajeno el aprovechamiento de la biodiversidad vegetal, ya que describe dentro de su composición, una amplia fuente de antioxidantes naturales, van a neutralizar y reducir los radicales libres de nuestro organismo. Entonces, se sugiere el uso de especie *Bixa orellana* en medicina alternativa y/o complementaria, reduciendo la seguridad y aumentando la eficacia de la terapia convencional.

Por lo antes expuesto, se planteó el siguiente problema:

¿El extracto hidroalcohólico de hojas de *Bixa orellana* (Achiote) presentará efecto antioxidante en *Rattus rattus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida?

Los objetivos formulados fueron los siguientes:

**Objetivo General:**

Determinar el efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Bixa orellana* (Achiote) en *Rattus rattus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida.

**Objetivos Específicos:**

Evaluar el efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Bixa orellana* (Achiote) a dosis 300mg/kg y 500mg/Kg en *Rattus rattus var albinus* con hepatotoxicidad inducida, en función de la concentración de MDA

Comparar el efecto antioxidante expresados en concentración de Malondialdehído del extracto hidroalcohólico de hojas de *Bixa orellana* (Achiote) en *Rattus rattus var. albinus*.



## II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2.1 Antecedentes

Moreira et al, en Brasil, año 2018, estudiaron el efecto protector de la bixina en la hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono en ratas, Los animales se dividieron en cuatro grupos con seis ratas en cada grupo. Se inyectó por vía intraperitoneal  $\text{CCl}_4$  ( $0,125 \text{ ml kg}^{-1}$  de peso corporal), y se administró bixina ( $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$  peso corporal) por sonda 7 días antes de la inyección de  $\text{CCl}_4$ . Bixin previno el daño hepático causado por  $\text{CCl}_4$ , como se observa por la disminución significativa en la liberación de aminotransferasas séricas. Bixin protegió el hígado contra los efectos oxidantes de  $\text{CCl}_4$  al prevenir una disminución en la actividad de la glutatión reductasa y los niveles de glutatión reducido y NADPH. La peroxidación de los lípidos de la membrana y el daño histopatológico del hígado se evitaron significativamente con el tratamiento con bixina <sup>(11)</sup>.

Erl et al. Filipinas, 2017, estudiaron el efecto hepatoprotector del extracto acuoso y etanólico de *Bixa orellana* encontraron como resultado que las hojas de *B. orellana* L. contenían alcaloides, antraquinonas, azúcares y taninos. Los extractos de hojas acuosos y etanólicos de *B. orellana* L. no mostraron ninguna toxicidad hasta  $2000 \text{ mg/kg}$  de dosis oral de peso corporal en ratones. El pretratamiento durante 7 días antes de la administración de  $\text{CCl}_4$  previno significativamente la elevación de los niveles séricos de AST y ALT con hallazgos histopatológicos que mostraron un efecto protector sobre los hepatocitos <sup>(3)</sup>.

Rivera et al, México. 2016, analizaron los Derivados de carotenoides en semillas de Achiote (*Bixa orellana*): síntesis y propiedades promotoras de la salud, han abordado las propiedades médicas y biológicas de este pigmento natural, como fuente potencial de nuevos medicamentos o porque su ingestión como condimento o suplemento dietético puede proteger contra varias enfermedades. Las propiedades más documentadas son antioxidantes; pero también se están estudiando sus propiedades anticancerosas, hipoglucémicas, antibióticas y antiinflamatorias. La elucidación de la vía de Bixina y sus mecanismos de regulación son críticos para mejorar la producción de este importante carotenoide. A pesar de que se ha establecido la vía de bixina por lo que es una fuente potencial de nuevos medicamentos y puede ser un valioso complemento nutracéutico <sup>(5)</sup>.

Tatiana et Al., Cuba. 2016, realizaron la extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) demostraron que la cantidad de Fenoles totales extraídas de las hojas de *Bixa orellana* depende de la proporción de disolvente / hojas y del tiempo de extracción. Además, encontró que el pH tiene un efecto sobre la actividad antioxidante determinada por la reacción del método 2,2'-Azinobis- (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y el poder antioxidante reductor férrico <sup>(9)</sup>.

Muñoz, en el Perú, año 2015, analiza la Capacidad antioxidante in vitro de los flavonoides totales obtenidos de las hojas de *bixa orellana* (achiote), proveniente del distrito de Usquil, provincia de Otuzco, región la libertad”, se preparó un extracto fluido con las hojas de *Bixa orellana*, al cual se le realizó el tamizaje fotoquímico, comprobando la presencia de flavonoides. Encontrándose un porcentaje de 0.4775% expresados como quercetina. Posteriormente se determinó la capacidad antioxidante in vitro de los flavonoides totales obtenidos de las hojas de *Bixa orellana* expresado en porcentaje de captura de radicales, mediante el método descrito por Brand-Williams, Por cada concentración y tiempo (1, 15, 30, 45 minutos) se determinó los porcentajes de captura del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH\*). Donde se observó que mientras mayor es la concentración, y el tiempo, mayor es este porcentaje <sup>(17)</sup>.

Huamán et Al., Perú. 2014, estudiaron el Efecto de los extractos acuoso e hidroetanólico de hojas de *Bixa orellana* (achiote) sobre los indicadores no enzimáticos de la hepatotoxicidad por paracetamol, en ratas obtuvieron como resultado que El tratamiento con extracto acuoso solo disminuyó los indicadores BT y BI ( $p < 0,01$ ), TBARS en suero ( $p < 0,05$ ) y hubo disminución de la masa hepática de -13,2% ( $p < 0,01$ ). En el grupo que recibió el extracto hidroetanólico se redujo la BT, BI ( $p < 0,01$ ), BD ( $p < 0,05$ ), TBARS en hígado ( $p < 0,01$ ) y la masa hepática -9,37%. Conclusiones: Los extractos acuoso hidroetanólico de hojas de *Bixa orellana* (achiote) presentarían efecto hepatoprotector frente al paracetamol a dosis tóxica, en ratas <sup>(18)</sup>.

## **2.2 Bases Teóricas:**

### **Fitoterapia**

Es la ciencia que estudia la utilización del producto de origen vegetal con fines que se pueda tratar distintas enfermedades, y ayude a la prevención, o curar un ciertas patológico <sup>(11)</sup>.

### **Planta Medicinales**

Es cualquier planta que en una o varios de sus de partes de ella puede contener sustancias que se puede utilizar con la finalidad de tratar y prevenir múltiples enfermedades o que son precursores para la semisíntesis químico- farmacéutica <sup>(3)</sup>.

### **Droga vegetal**

Todo material de origen natural, ya sea en crudo (hojas, corteza, raíz, órgano animal) u obtenido por sencillas operaciones (p. ej., extractos), que contiene los principios farmacológicamente activos y que se puede usar directamente o como fuente de elaboración de medicamentos <sup>(11)</sup>.

### **Principio Activo**

Son las sustancias responsables de la acción farmacológica <sup>(3)</sup>.

### **Extracto hidroalcohólico**

La combinación de los extractos hidroalcohólico, con varios compuestos químicos que suelen ser físicos o químicos, que se extraen a partir de la muestra vegetal, que son usados en la medicinal alternativa. Posee un olor característico, el cual es adquirido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico <sup>(19)</sup>.

## **Radicales Libres**

Un radical libre es cualquier especie molecular capaz de existencia independiente que contiene un electrón no apareado en un orbital atómico. La presencia de un electrón desapareado da como resultado ciertas propiedades comunes que comparten muchos de los radicales. La mayoría de los radicales son inestables y elevadamente reactivos. Pueden dar un electrón o recibir un electrón de otras moléculas, en consecuencia actúan como oxidantes o reductores <sup>(20)</sup>.

## **Estrés oxidativo**

Este término se usa para explicar el estado de daño oxidativo que resulta en el momento que el balance crítico entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes es perjudicial. Surge como producto de la falta de estabilidad entre la formación de radicales libres y los controles por parte de los antioxidantes, se relaciona directamente con la injuria a una gran variedad de moléculas, como los lípidos, ácidos nucleicos y proteínas <sup>(21)</sup>.

## ***Bixa orellana***

Es un arbusto americano con amplia distribución geográfica y conocido generalmente como achiote, es una planta de gran adaptabilidad a diferentes sistemas agroforestales y con numerosas aplicaciones en las industrias relacionada con alimentos, bebidas, cosméticos, textiles y diversos productos químicos (ver anexo 1) <sup>(22)</sup>.

## **Habitat**

En nuestro país esta *Bixaceae*, crece regularmente cultivada en las tres zonas bioclimáticas prefiriendo los solares, patios, huertos y jardines caseros <sup>(17)</sup>.

### **Descripción botánica**

Árbol de mediano porte, de corteza parda y ramillas corrientes escamosas. Hojas aovadas, acuminadas en ápice marginadas o truncadas en la base, entera. Sus flores blancas- rosadas con pétalos obtusos y redondos por el vértice, dispuestas en racimos. Fruto en cápsula ovoide, cubierto por abundante pulpas rojo-anaranjado <sup>(23)</sup>.

### **Composición química** <sup>(23)</sup>.

- Resina.
- Orellana (materia colorante amarilla)
- Bixina (materia colorante roja)
- Aceite Volátil y aceite Graso

### **Propiedades terapéuticas**

Antitumoral, antiinflamatoria, astringente, emoliente, antiséptica, antibacteriana, antioxidante, cicatrizantes entre otra y se ha indicado en el tratamiento de infecciones bacteriana de forma general, estomatitis, y en la curación de heridas y quemaduras. Teniendo en cuenta que en el arsenal terapéutico al alcance del estomatólogo son escasos los productos de acción local cicatrizante, antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana y mucho menos un producto que reúna todas estas propiedades juntas, es que se procedió a realizar una actualización bibliográfica del tema de Bixa Orellana <sup>(20)</sup>.

### **Toxicidad**

Colorantes alimentarios y algunos anti microbianos y antioxidantes <sup>(21)</sup>.

### **Fisiología del hígado:**

El hígado es uno de los órganos que ejecuta una gran cantidad de funciones y entre las más importantes están el almacenamiento y biotransformación de las sustancias que recibe por medio del torrente circulatorio y el sistema portal. Normalmente biotransforma y acumula sustancias útiles en el organismo tales como la glucosa, en forma de glucógeno, aminoácidos, grasas y vitamina A y vitamina B12. Para realizar sus funciones, el hígado cuenta con una gran cantidad de enzimas con funciones oxidativas y reductivas, entre las cuales se encuentran el sistema del citocromo de la proteína 450 (P-450), flavin-monooxigenasas, peroxidasas, hidroxilasas, esterasas y amidasas. Otras enzimas también presentes son las metilasas, acetiltransferasas, tioltransferasas. Todas estas enzimas tienen gran importancia en las biotransformaciones <sup>(24)</sup>.

### **Mecanismo de acción del CCl<sub>4</sub>**

Es complejo y para el inicio de su toxicidad se requiere su metabolización en el hígado. Además, se indica que por sí mismo no sería tóxico, pero que en el retículo endoplásmico liso entraría a la cadena enzimática microsomal. El CCl<sub>4</sub> ejerce su efecto tóxico al generar el radical libre altamente tóxico (CCl<sub>3</sub>) por acción de oxidasas ligadas al sistema P-450 en el retículo endoplásmico, paralelamente por una reacción de reducción (vía de eliminación cloro), se formaría el CCl<sub>2</sub> <sup>(25)</sup>.

### **Característica del CCl<sub>4</sub>**

Es utilizado frecuentemente para realizar un modelo de hepatotoxicidad, los hepatotóxicos mejor estudiados y conocidos entre aquellos xenobióticos que se sabe causan daño hepático. El CCl<sub>4</sub> pertenece al grupo de hidrocarburos halogenados, es poco soluble en agua y, se usa como disolvente (aceites, grasas, ceras y limpieza en

seco), difunde fácilmente a través de las membranas plasmáticas. Su absorción lenta en el tracto gastrointestinal se ve favorecida por la presencia de aceites y grasas de origen animal o vegetal, esto se debe a que las sustancias no polares se disuelven en lípidos difunden con alta rapidez, ya que, la membrana celular que es permeable, se encuentra constituida principalmente por fosfolípidos, y cuya permeabilidad está determinada por las características fisicoquímicas de las sustancias <sup>(26)</sup>.



### **III. HIPÓTESIS**

#### **3.1 Hipótesis Alternativa**

El extracto hidroalcohólico de hojas de *Bixa orellana* (Achiote) tiene efecto antioxidante en *Rattus rattus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida.

#### **3.2 Hipótesis Nula**

El extracto hidroalcohólico de hojas de *Bixa orellana* (Achiote) no tiene efecto antioxidante en *Rattus rattus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida.

## **IV. METODOLOGÍA**

### **Tipo y Nivel de la investigación:**

El estudio fue de tipo experimental, nivel explicativo de enfoque cuantitativo.

### **a. Diseño de la Investigación:**

La investigación se realizó dividiendo los grupos de estudio de la siguiente manera:

### **CONTROL NEGATIVO**

Estuvo conformado por 06 especímenes de experimentación (*Rattus rattus var. albinus*) de  $250 \pm 10$ g con agua y alimentación ad libitum por 7 días. Este grupo se encontraba en buen estado fisiológico, a todos los animales se les administro agua destilada con un volumen de sondeo de 0.5 mL por vía oral. Durante los 7 días los animales de experimentación fueron sondeados con agua destilada y luego sometidos a ayuno de 12 horas, en el séptimo día se procedió a su sacrificio por asfixia mecánica (dislocación cervical) e inmediatamente a la muerte se procedió a extraer una muestra de tejido hepático siguiendo en todo el proceso una cadena de frío (1 – 2°C) y finalmente se procedió a la determinación de radicales libres por el método de TBARS.

### **CONTROL POSITIVO**

Estuvo conformado por 06 especímenes de experimentación (*Rattus rattus var. albinus*) de pesos  $250 \pm 10$ g. A los animales de este grupo se les administro agua destilada con un volumen de sondeo de 0.5 mL vía oral hasta el cuarto día; en el quinto día se les administró una dosis única de  $\text{CCl}_4$  de 0.2 mL/100 g de pc (0.1 mL de  $\text{CCl}_4$  + 0.1 mL de aceite de maíz (1:1 v/v) por vía oral para inducir el proceso de toxicidad hepática, luego en el sexto y séptimo día se les volvió a administrar agua

destilada con un volumen de sondeo de 0.5 mL vía oral. Durante los 7 días los animales de experimentación fueron sometidos a ayuno de 12 horas, en el séptimo día se procedió a su sacrificio por asfixia mecánica (dislocación cervical) y después de la muerte se procedió a extraer una muestra de tejido hepático siguiendo en todo el proceso una cadena de frío (1 – 2°C) y finalmente se procedió a la determinación de radicales libres por el método de TBARS.

### **GRUPO EXPERIMENTAL 1**

Estuvo conformado por 06 especímenes de experimentación (*Rattus rattus var. albinus*) de pesos  $250 \pm 10$ g. A los animales de este grupo se les administro el extracto hidroalcohólico de hojas de *Bixa Orellana* (Achiote), *indica* a una dosis de 300 mg/kg de pc con un volumen de sondeo de 0.5 mL vía oral hasta el cuarto día; en el quinto día también se administró el extracto hidroalcohólico de hojas de *Bixa Orellana* (Achiote) *indica* a dosis de 300 mg/kg de pc con un volumen de sondeo de 0.5 mL vía oral y luego se les administró una dosis única de CCl<sub>4</sub> de 0.2 mL/100 g de pc (0.1 mL de CCl<sub>4</sub> + 0.1 mL de aceite de maíz 1:1 v/v) por vía oral para inducir el proceso de toxicidad hepática, luego en el sexto y séptimo día se les volvió a administrar el extracto hidroalcohólico de hojas de *Bixa Orellana* (Achiote) *indica* a una dosis de 300 mg/kg de pc con un volumen de sondeo de 0.5 mL vía oral. Durante los 7 días los animales de experimentación fueron sometidos a ayuno de 12 horas, luego se procedió a su sacrificio por asfixia mecánica (dislocación cervical) y después de la muerte se procedió a extraer una muestra de tejido hepático siguiendo en todo el proceso una cadena de frío (1 – 2°C) y finalmente se procedió a la determinación de radicales libres por el método de TBARS.

## **GRUPO EXPERIMENTAL 2**

Estuvo conformado por 06 especímenes de experimentación (*Rattus rattus var. albinus*) de pesos  $250 \pm 10$ g. A los animales de este grupo se les administro el extracto hidroalcohólico de hojas de *Bixa Orellana* (Achiote), *indica* a una dosis de 300 mg/kg de pc con un volumen de sondeo de 0.5 mL vía oral hasta el cuarto día; en el quinto día también se administró el extracto hidroalcohólico de hojas de *Bixa Orellana* (Achiote ) *indica* a dosis de 500 mg/kg de pc con un volumen de sondeo de 0.5 mL vía oral y luego se les administró una dosis única de  $\text{CCl}_4$  de 0.2 mL/100 g de pc (0.1 mL de  $\text{CCl}_4$  + 0.1 mL de aceite de maíz 1:1 v/v) por vía oral para inducir el proceso de toxicidad hepática, luego en el sexto y séptimo día se les volvió a administrar el extracto hidroalcohólico de hojas de *Bixa Orellana* (Achiote) *indica* a una dosis de 500 mg/kg de pc con un volumen de sondeo de 0.5 mL vía oral. Durante los 7 días los animales de experimentación fueron sometidos a ayuno de 12 horas, luego se procedió a su sacrificio por asfixia mecánica (dislocación cervical) y después de la muerte se procedió a extraer una muestra de tejido hepático siguiendo en todo el proceso una cadena de frío ( $1 - 2^\circ\text{C}$ ) y finalmente se procedió a la determinación de radicales libres por el método de TBARS. (Anexo 8).

### **b. Población y muestra**

#### **Población:**

Estuvo conformada por las plantas de *Bixa orellana* (Achiote) de crecimiento en el centro poblado de Samne distrito de Otuzco, provincia de Otuzco, departamento La Libertad (ver anexo 2).

#### **Muestra:**

Estuvo conformada por las hojas de las plantas de *Bixa orellana* (Achiote) de

crecimiento en el centro poblado de Samne distrito de Otuzco, provincia de Otuzco, departamento La Libertad que cumplieron con los siguientes criterios:

**Criterios de inclusión:**

Las hojas de *Bixa orellana* (achiote) en buen estado, completas, con color y apariencia sana.

**Criterios de exclusión:**

Las hojas de *Bixa orellana* (achiote) en mal estado, con infestación por insectos y con anomalías.

**Material biológico:**

Estuvo conformado por 24 especímenes *Rattus rattus var. albinus* distribuidos aleatoriamente en 4 grupos (6 especímenes) adquiridos del Instituto Nacional de Salud (INS) cumpliendo con todos los requisitos de bioseguridad en el manejo de animales de experimentación (ver anexo 3).

Los animales de experimentación posterior a ser adquiridos serán aclimatados en ciclos luz - oscuridad de 12 horas. Por un periodo de 7 días. A temperatura de aproximadamente 17 - 22°C en el lugar de aclimatación.

**Criterio de Inclusión:**

En *Rattus rattus var. albinus*, tener en cuenta el tiempo de administración. El peso, forma, sexo. Genético por su igualdad o similitud biológica

**Criterio de Exclusión:**

En *Rattus rattus var. albinus*, con alteraciones que muestren signos evidentes de enfermedad.

### 4.3 Definición y Operacionalización de variables:

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicadores	Escala de Medición
<b>V. Independiente:</b>  Extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Bixa orellana</i> (Achiote)	Extracto preparado por maceración utilizando como solventes agua/alcohol <sup>(8)</sup>	Se reconstituye una cantidad del extracto seco expresada en mg/ kg de pc en un volumen determinado de agua destilada.	DOSIS  Grupo Blanco: 0.5 ml/kg pc de H <sub>2</sub> O destilada Grupo Control: 0.5 ml/kg pc de CCl <sub>4</sub> Grupo Experimental 1: 300mg/Kg de p.c. de extracto de hoja de <i>Bixa orellana</i> . Grupo Experimental 2: 500mg/Kg de p.c. de extracto de hoja de <i>Bixa orellana</i> .	Cualitativa Nominal
<b>V. Dependiente:</b>  Efecto antioxidante en <i>Rattus rattus var. albinus</i>	Capacidad que tiene una sustancia para reducir el efecto perjudicial de los radicales libres tras un proceso de estrés oxidativo <sup>(6)</sup>	Se cuantifica la reacción al ácido Tiobarbitúrico – (TBARS) midiendo las absorbancias y comparándolo con la curva estándar realizada para el MDA a concentraciones conocidas	de MDA/g.h.f (Microgramos de MDA por gramo de hígado fraccionado)	Cuantitativa de Razón

#### 4.4 Técnicas e Instrumentos

##### **Recolección, identificación y Secado de Hojas <sup>(27)</sup>:**

Las plantas fueron recolectadas en el centro poblado de Samne distrito de Otuzco, provincia de Otuzco, departamento La Libertad. Se recolectó 1.100 kg (1100g) de hojas frescas de *Bixa orellana* (Achiote) (ver anexo 4). La recolección de la especie se realizó por el método convencional o clásico de herborización, seleccionando el material en el campo y verificando que esté en buenas condiciones. Luego se realizó un estudio taxonómico de la planta en el *Herbarium Truxillensis* (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo codificándose con N° 59459 y 59460 (ver anexo 5).

Las hojas de *Bixa orellana* (Achiote) se lavaron dos veces con agua corriente, luego fueron desengrasadas con etanol al 96% y posteriormente lavadas nuevamente con agua destilada, luego se secaron a temperatura ambiente (21°C) bajo sombra sobre papel Kraft durante 48 horas, a continuación se llevó a estufa “Mermmet” temperatura a 37 °C durante 24 horas. Las hojas desecadas se molieron en mortero de porcelana y luego se tamizó en tamiz Retsh ® 250 micras (tamaño de un poro). Se obtuvo 200g de polvo fino de hojas de *Bixa orellana* (Achiote); el polvo fino tamizado se guardó y almacenó en frasco de vidrio ámbar para su posterior utilización <sup>(27)</sup> (Anexo 6).

##### **Obtención del extracto hidroalcohólico de hojas de *Bixa orellana* (Achiote) <sup>(27)</sup>.**

Se preparó una solución de etanol al 80% (833.3ml de etanol de 96% + 166.7ml de agua qd se utilizó para preparar 1 litro de etanol 80%), La maceración se realizó con una solución de etanol al 80% en una proporción con la droga de 1:10. En un frasco

de color ámbar con tapa, con agitación manual por 15 minutos se dejó macerar por 7 días.

Cumplido el tiempo, la solución se filtró usando papel Whatman 1, con capacidad de retención de partículas  $>11 \mu\text{m}$  de diámetro; se utilizó un equipo de baño maría marca Mermmert modelo wnb 45-230v, para eliminar el solvente obteniéndose 31.3 g de extracto seco de *Bixa Orellana* (Achiote) que reportó un porcentaje de rendimiento de la técnica del 15.7% (P/P).

El extracto seco fue reconstituido en agua destilada a una concentración de 15% P/V (750mg de extracto seco aforado a 5ml de agua destilada) para la dosis de 300 mg/kg pc, con un volumen de sondeo por animal de aproximadamente 0.5ml por espécimen; Para la dosis de 500 mg/kg pc, el extracto seco fue reconstituido en agua destilada a una concentración de 25% P/V (1250mg de extracto seco aforado a 5ml de agua destilada) con un volumen de sondeo por animal de aproximadamente 0.5ml por espécimen, estas preparaciones se realizaron diariamente durante los días de administración del extracto <sup>(27)</sup> (Anexo 7).

#### **Inducción de hepatotoxicidad por $\text{CCl}_4$ :**

La inducción de toxicidad hepática se realizó administrando por vía oral 0.2 ml de  $\text{CCl}_4$  / 100g p.c, previamente preparados con aceite de maíz en proporción 1:1 (0.1 ml de  $\text{CCl}_4$  + 0.1 ml de aceite de maíz 1:1 v/v <sup>(17)</sup>).

#### **Obtención del homogenizado de hígado**

Se realizó la dislocación cervical en *Rattus rattus* var. albinus, para realizar la extracción del hígado; para luego homogenizarlo, el mismo que es un órgano de alto índice metabólico <sup>(28)</sup> (Anexo 9).



### **Determinación del efecto antioxidante mediante TBARS:**

Se ha empleado una técnica colorimétrica basada en la reacción del TBA descrita por ASAKAWA y MATSUSHITA. Se procedió al sacrificio de los animales de experimentación por dislocación cervical. Inmediatamente a la muerte se procedió a extraer una fracción de tejido hepático. Se pesó 5 g de hígado, perfundió con NaCl 9% y se homogenizó con una solución de 0,25 M de sacarosa helada (1°), tampón Tris-HCl 0,2 M pH 7,4, en una relación de 1:5, utilizando un Potter-Elvehjem helado provisto de un pistilo de teflón. Luego, se centrifugó en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-2B, a 10 000 rpm, durante 45 minutos, a cuyo término se descartó el precipitado y se reservó el sobrenadante. Todo este proceso se realizó a una temperatura no mayor de 4°C, en la cual también se mantuvo el sobrenadante que correspondía a la fracción posmitocondrial <sup>(6)</sup>.

En tubos de ensayo helados de 10 mL de capacidad, se añaden respectivamente 5 g de hígado (fracción microsomal); (muestras problemas), 100 µL de H<sub>2</sub>O destilada (muestra blanco), 100 µL de disolución patrón (muestras patrón) o 100 µL de disolución control (muestra control) y a continuación los siguientes reactivos en el orden que se describe <sup>(17)</sup>:

1) 0,1 mL de disolución de Butil-hidroxi-tolueno (BHT) como antioxidante 2) 0,1 mL de disolución de FeCl<sub>3</sub> como catalizador 3) 1,5 mL de disolución tampón glicocola 4) 1.5 mL de disolución de ácido tiobarbitúrico, como reactivo cromógeno  
Esta mezcla de reacción se mantiene 45 minutos a 5° C. Transcurrido este tiempo, se lleva a ebullición en un baño de agua a una temperatura entre 95° C y 100° C durante 45 minutos, para desarrollar la máxima coloración en todas las muestras y patrones.

Los tubos se tapan para evitar pérdidas de líquido por evaporación. Una vez verificada la reacción, se procede a la extracción de los aductos con una disolución mezcla de 2,5 mL de una disolución de n-butanol-piridina (15:1 V/V) y 0,5 mL de agua destilada, enfriando previamente los tubos en un baño de hielo. Tras mezclar y centrifugar a 4000 r.p.m. durante 10 minutos, las capas superiores o sobrenadantes se recogen en un tubo limpio y se procede a la lectura de las absorbancias a 535 nm <sup>(17)</sup> (Anexo 10).

### **Curva de calibración Estándar**

Se procedió a preparar soluciones de malondialdehído (MDA) en combinación con ácido tiobarbitúrico hasta formación de compuesto cromógeno rosado de absorbancia en 532nm (Anexo 10).

- ❖ **Solución I:** solución de ácido tiobarbitúrico
- ❖ **Solución II:** Está formado por MAD (50, 250, 1000, 1500 µL) en solución de ácido tiobarbitúrico.
- ❖ **Solución de agua destilada:** se agregó cantidad suficiente para 1000 µL

### **4.5 Plan de Análisis**

El análisis estadístico se realizó mediante la tabulación de datos, a través de media aritmética y desviación estándar mediante el programa Microsoft Excel 2016. El análisis inferencial para determinar si existe diferencia significativa se realizó mediante la prueba ANOVA y T - Student, asumiendo la homogeneidad o parametricidad de los datos recolectados, utilizando el paquete estadístico IBM-SPSS- versión 22.0.

#### 4.6. Matriz de Consistencia

Título de la Investigación	Formulación del Problema	Objetivos	Hipótesis	Tipo de Investigación/ Diseño	Variables	Definición Operacional	Indicadores y Escala de Medición	Plan de Análisis
Efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) en <i>Rattus rattus</i> var. <i>albinus</i> con hepatotoxicidad inducida	¿El extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) presentará efecto antioxidante en <i>Rattus rattus</i> Var. <i>albinus</i> con hepatotoxicidad inducida ?	<p><b>Objetivo General:</b> Determinar el efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) en <i>Rattus rattus</i> var. <i>albinus</i> con hepatotoxicidad inducida.</p> <p><b>Objetivos Específicos:</b> Evaluar el efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) a dosis 300mg/kg y 500mg/Kg en <i>Rattus rattus</i> var <i>albinus</i> con hepatotoxicidad inducida, en función de la concentración de MDA</p> <p>Comparar el efecto antioxidante expresados en concentración de Malondialdehído del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) en <i>Rattus rattus</i> var. <i>albinus</i>.</p>	<p><b>Hipótesis Afirmativa:</b> El extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) presenta efecto antioxidante en <i>Rattus rattus</i> var. <i>albinus</i> con hepatotoxicidad inducida</p> <p><b>Hipótesis Nula</b> El extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) no presenta efecto antioxidante en <i>Rattus rattus</i> var. <i>albinus</i> con hepatotoxicidad inducida.</p>	El estudio fue de tipo experimental, nivel explicativo de enfoque cuantitativo.	<p><b>Independiente:</b> Extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Bixa orellana</i> (Achiote).</p> <p><b>Dependiente:</b> Efecto antioxidante en <i>Rattus rattus</i> var. <i>albinus</i></p>	<p>Se reconstituye una cantidad del extracto seco expresada en mg/ kg de pc en un volumen determinado de agua destilada.</p> <p>Se cuantifica la reacción al ácido Tiobarbitúrico – TBARS) midiendo las absorbancias y comparándolo con la curva estándar realizada para el MDA a concentración es conocidas</p>	<p>Cualitativa Nominal</p> <p>DOSIS Grupo Blanco: 0.5 ml/ kg pc H<sub>2</sub>O dest. Grupo Control: 0.5 ml/ kg pc de CCl<sub>4</sub> Grupo Experimental 1: 300mg/Kg de p.c. de extracto de hoja de <i>Bixa orellana</i>. Grupo Experimental 2: 500mg/Kg de p.c. de extracto de hoja de <i>Bixa orellana</i>.</p> <p>Cuantitativa de Razón</p> <p>Microgramos de MDA por gramo de hígado fraccionado (ug de MDA/g.h.f)</p>	Se realizó mediante la prueba ANOVA y T - Student, asumiendo la homogeneidad o parametricidad de los datos recolectados, utilizando el paquete estadístico IBM-SPSS- versión 22.0.

#### **4.7 Principios Éticos**

Se utilizaron los principios éticos descritos en el código de Ética para la investigación versión 001. Aprobado por acuerdo del Consejo Universitario con Resolución N° 0108-2016-CU-ULADECH Católica, de fecha 25 de enero de 2016.

**Protección a los animales:** Los animales en toda investigación es el fin y no el medio, por ello necesitan cierto grado de protección, el cual se determinará de acuerdo al riesgo en que incurran y la probabilidad de que obtengan un beneficio. En el ámbito de la investigación es en las cuales se trabaja con animales <sup>(29)</sup>.

**Beneficencia y no maleficencia:** Se debe asegurar el bienestar de los animales que participan en las investigaciones. En ese sentido, la conducta del investigador debe responder a las siguientes reglas generales: no causar daño, disminuir los posibles efectos adversos y maximizar los beneficios <sup>(29)</sup>.

**Justicia:** El investigador debe ejercer un juicio razonable, ponderable y tomar las precauciones necesarias para asegurarse de que sus sesgos, y las limitaciones de sus capacidades y conocimiento, no den lugar o toleren prácticas injustas <sup>(29)</sup>.

## V. RESULTADOS

### 5.1 Resultados

**Tabla 1:** Efecto antioxidante del EHA de hojas de *Bixa orellana* (Achiote) en *Rattus rattus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida en función de la concentración de MDA ( $\mu\text{M}$ )

<b>GRUPOS</b>	<b><math>\mu\text{M}</math> de MDA MEDIA<math>\pm</math>DS</b>	<b>SIGNIFICANCIA (Valor p)</b>
<b>CONTROL NEGATIVO</b>	0.0057	
<b>CONTROL POSITIVO (CCl<sub>4</sub>)</b>	0.0393	
<b>EXPERIMENTAL 1 (EHA hojas de <i>B. orellana</i> 300mg/kg. p.c + CCl<sub>4</sub>)</b>	0.0265	0.000*
<b>EXPERIMENTAL 2 (EHA hojas de <i>B. orellana</i> 500mg/kg. p.c + CCl<sub>4</sub>)</b>	0.0180	

\* Prueba ANOVA ( $p < 0.05$ )

**EHA:** extracto hidroalcohólico

**Tabla 2:** Comparación del efecto antioxidante expresados en concentración de Malondialdehído del extracto hidroalcohólico de hojas de *Bixa Orellana* (Achiote) en *Rattus rattus var. albinus*.

<b>GRUPOS</b>	<b>SIGNIFICANCIA (Valor p)</b>
<b>Blanco vs Control</b>	0.000
<b>Blanco vs Experimental 1</b>	0.005
<b>Blanco vs Experimental 2</b>	0.08
<b>Control vs Experimental 1</b>	0.025
<b>Control vs Experimental 2</b>	0.001
<b>Experimental 1 Vs Experimental 2</b>	0.006

**\* Prueba T - STUDENT (p<0.05)**

Leyenda:

**Grupo blanco:** 0,5mg/kg. p.c de H<sub>2</sub>O dest

**Grupo Control:** 0,2ml/kg. p.c de CCl<sub>4</sub>

**Experimental 1:** 300mg/kg. p.c de Extracto hidroalcohólico de hoja de *Bixa orellana*

**Experimental 2:** 500mg/kg. p.c de Extracto hidroalcohólico de hoja de *Bixa orellana*

## 5.2 Análisis de resultados

En la tabla 01, se observa los valores para las concentraciones de Malondialdehído (MDA) en los 4 grupos de experimentación con valores de 0.0057  $\mu\text{M}$  de MDA para el grupo blanco, que corresponderían a las especies reactivas de oxígeno (ROS) según lo descrito por Okezie et al se forman constantemente en el cuerpo. Por ejemplo, se sabe que el radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y el peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se generan en el cerebro y el sistema nervioso in vivo, además varias áreas del hígado son ricas en hierro, que son movilizables, pudiendo estimular las reacciones de radicales libres <sup>(15)</sup>.

Para el grupo Inducido con  $\text{CCl}_4$  las concentraciones de MDA fueron de 0.0393  $\mu\text{M}$  de MDA los valores estarían asociado al efecto tóxico descrito para el  $\text{CCl}_4$  por Basu et al que identifica a la peroxidación lipídica inducida por tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) y la lesión hepática como un modelo experimental clásico para comprender los mecanismos celulares detrás de la lesión oxidativa y estimar aún más el potencial terapéutico de los fármacos y los antioxidantes <sup>(16)</sup>. La exposición a  $\text{CCl}_4$  produce necrosis hepática centrilobular. El  $\text{CCl}_4$  se metaboliza a través de la enzima CYP450 en su isoforma CYP2E1 al radical libre triclorometilo altamente reactivo, que causa daño hepatocelular a través de la peroxidación de lípidos según lo expuesto por Manibusan et al <sup>(17)</sup>. Se puede observar también que la concentración de MDA para el grupo experimental (*B. orellana* 300mg/kg y 500 mg/kg) fueron de 0.0265  $\mu\text{M}$  de MDA y 0.0180  $\mu\text{M}$  de MDA esto corrobora lo encontrado por Erl et al quienes señalan a las hojas de *B. orellana* como fuente de alcaloides, antraquinonas, azúcares y taninos. Esto se complementa por lo reportado

por Moreira et al que señalan al carotenoide *Bixina* como uno de los principales captadores de radicales libres en intoxicación por  $\text{CCl}_4$  <sup>(22,23)</sup>.

En la tabla 02, se observan las comparaciones entre grupos de experimentación donde gracias a la prueba T se muestran que las diferencias entre ellos son significativas, esto probablemente manifiesta que a pesar de tener efecto antioxidante, *Bixa orellana* no puede recuperar a los valores de MDA en los animales del grupo blanco. Sin embargo ambos extractos mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo que recibió solo  $\text{CCl}_4$ , siendo el grupo experimental de dosis 500 mg/kg pc la que presentó el mayor efecto antioxidante entre los grupos que recibieron el tóxico.



## VI. CONCLUSIONES Y ASPECTOS COMPLEMENTARIOS

### 6.1 Conclusiones:

- El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Bixa orellana* (Achiote) presentó efecto antioxidante en *Rattus rattus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida.
- El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Bixa orellana* (Achiote) presentó efecto antioxidante a dosis 300mg/kg pc (0.0265  $\mu$ M de MDA) y 500mg/Kg pc (0.0180  $\mu$ M de MDA), administrando por siete días en *Rattus rattus var. albinus* con hepatotoxicidad inducida con tetracloruro de carbono, obteniendo una significancia de 0.000\*, a través del análisis de ANOVA.
- El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Bixa orellana* (Achiote), a dosis de 300mg/kg pc y comparando con la dosis de 500mg/kg pc, se obtuvo una diferencia significativamente de 0.025 mayor a 0.001 con el grupo que recibió solo CCl<sub>4</sub> y se concluye que presentan el mismo efecto a ambas dosis.

### Aspectos Complementarios

- Se recomienda el uso de *Bixa orellana* en la medicina natural para contrarrestar diferentes patologías que aquejan a la sociedad principalmente como nivel oxidativo
- Se recomienda determinar la concentración de los componentes químicos del extracto hidroalcohólico de *Bixa orellana*, mediante estudios cromatograficos (HPLC), para saber cuál es su efecto toxico que podría presentar Bixa Orellana.
- Se recomienda fortalecer la investigación, enfrentando el extracto de *Bixa orellana* *in vivo* frente a otros métodos antioxidantes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc* [Internet]. 1998 Feb 1 [citado 2019 Feb 14]; 75(2):199–212. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-9980032>
2. Berlowski A, Zawada K, Wawer I, Paradowska K. Antioxidant Properties of Medicinal Plants from Peru. *Sci Res*. 2013; 4 (August):71–7. [citado 2019 Feb 14]
3. Erl Sumalapao DP, Villarante N, Lopez CP, Villarante NR. Hepatoprotective activity of aqueous and ethanolic *Bixa orellana* L. leaf extracts against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity *Mathematical Models View project Adsorption of heavy metals and organic compounds using activated carbon chitosan composites View project Hepatoprotective activity of aqueous and ethanolic Bixa orellana L. leaf extracts against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity*. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol* [Internet]. 2017 [citado 2019 Feb 14]; 7(9). Disponible en: [//www.researchgate.net/publication/317135169](http://www.researchgate.net/publication/317135169)
4. Cano A, Cifuentes L, Amariles P. Toxicidad hepática causada por medicamentos: revisión estructurada. Colombia. 2015. [Internet]. España. 2012. [Citado el 06 de diciembre del 2018]; Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcg/v32n4/0120-9957-rcg-32-04-00337.pdf>
5. Rivera-Madrid R, Aguilar-Espinosa M, Cárdenas-Conejo Y, Garza-Caligaris LE. Carotenoid Derivates in Achiote (*Bixa orellana*) Seeds: Synthesis and Health Promoting Properties. *Front Plant Sci* [Internet]. 2016 Sep 21 [citado 2019 Feb 14];7:1406. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016>

6.01406/abstract

6. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J-H, et al. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *J Am Coll Nutr* [Internet]. 2003 Feb [citado 2019 Feb 14]; 22(1):18–35. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07315724.2003.10719272>
7. Imran Qadir M, Al Murad MS, Ali M, Saleem M, Ahmad Farooqi A. Hepatoprotective effect of leaves of aqueous ethanol extract of *Cestrum nocturnum* against paracetamol-induced hepatotoxicity. *Bangladesh J Pharmacol*. 2014;9(2):167–70. [citado 2019 Feb 14]
8. Vargas Mendoza N. “ Efecto hepatoprotector y antioxidante del extracto y los principios activos de *Geranium shiedeanum*”- sistema de defensa antioxidante. 2012;117. [citado 2019 Feb 14]
9. Tatiana C, Rincón S, Gelmy I, Ciro Gómez L, Zapata JE. Extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from leaves of *Bixa orellana* L. (achiote) [Internet]. Vol. 21, *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2016 [citado 2019 Feb 14]. Disponible en: <http://scielo.sld.cuhttp://scielo.sld.cu>
10. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnol Aliment* [Internet]. 2005 [citado 2019 Feb 14]; 25(4):726–32. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612005000400016&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612005000400016&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
11. Moreira PR, Maioli MA, Medeiros HC, Guelfi M, Pereira FT, Mingatto FE. Protective effect of bixin on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats.

- Biol Res [Internet]. 2014 Sep 29 [citado 2019 Feb 14]; 47(1):49. Disponible en : <http://www.biolres.com/content/47/1/49>
12. Clerici MTPS, Carvalho-Silva LB. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. Food Res Int [Internet] 2011. [citado 2019 Feb 14]; 44 (7):1658–70. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.020>
  13. Lucarini R, Bernardes W, Tozatti M, Filho A, Silva M, Momo C, et al. Hepatoprotective effect of Rosmarinus officinalis and rosmarinic acid on acetaminophen-induced liver damage. Emirates J Food Agric [Internet]. 2014 Sep 11 [citado 2019 Feb 14]; 26(10):878. Disponible en: <http://www.ejfa.me/index.php/journal/article/view/564>
  14. Jiménez-Arellanes MA, Gutiérrez-Rebolledo GA, Meckes-Fischer M, León-Díaz R. Medical plant extracts and natural compounds with a hepatoprotective effect against damage caused by antitubercular drugs: A review. Asian Pac J Trop Med [Internet]. 2016 Dec [citado 2019 Feb 14]; 9(12):1141–9. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1995764516304667>
  15. Winkler-Moser JK, Bakota EL, Hwang H-S. Stability and Antioxidant Activity of Annatto ( *Bixa orellana* L.) Tocotrienols During Frying and in Fried Tortilla Chips. J Food Sci [Internet]. 2018 Feb 1 [citado 2019 Feb 14]; 83(2):266–74. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/17503841.14037>
  16. El-newary SA, Shaffie N, Hendawy SF, Omer E. Hepatoprotective, Therapeutic and in vivo extract against paracetamol - induced hepatotoxicity - rats.2017; (January 2016) [citado 2019 Feb 14].

17. Muñoz Acevedo LR. Capacidad antioxidante in vitro de los flavonoides totales obtenidos de las hojas de bixa orellana (achiote), proveniente del distrito de Usquil, provincia de Otuzco, region La Libertad”. Univ Nac Trujillo [Internet]. 2015 [citado 2019 Feb 14]; Disponible en: <http://www.dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/1549>
18. Huamán O, Sandoval M, Béjar E, Huamán Z, Tarazona V, Tarazona V. Efecto de los extractos acuoso e hidroetanólico de hojas de Bixa orellana (achiote) sobre los indicadores no enzimáticos de la hepatotoxicidad por paracetamol, en ratas. An la Fac Med [Internet]. 2014 May 21 [citado 2019 Feb 14];74(4):279. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/articloe/view/2698>
19. Zhang X. Medicina tradicional: definiciones. Medicina tradicional, Medicamentos Esenciales y Política Farmacéutica (EDM) OMS/Ginebra. Disponible en: [http://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/definitions/es/](http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/)
20. Chassaing B, Etienne-Mesmin L, Gewirtz AT. Microbiota-liver axis in hepatic disease. Hepatology. 2014; [citado 2019 Feb 14];59(1):328–39.
21. Lock O, Perez E, Villar M. Bioactive Compounds from Plants Used in Peruvian Traditional Medicine. Nat Prod Commun [Internet]. 2016 [citado 2019 Feb 14]; 11(3):315–37. Disponible en:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27169179>
22. Seydi E, Rajabi M, Salimi A, Pourahmad J. Involvement of mitochondrial-mediated caspase-3 activation and lysosomal labilization in acrylamide-induced liver toxicity. Toxicol Environ Chem [Internet]. 2015 May 28 [citado 2019 Feb 14];97(5):563–75. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/>

02772248.2015.1047671

23. Younes M, Siegers C-P. The role of iron in the paracetamol- and - CCl<sub>4</sub>-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity. *Chem Biol Interact* [Internet]. 1985 Jan 1 [citado 2019 Feb 14];55:327–34. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279785801393>
24. Flórez J. FARMACOLOGIA HUMANA. FISIOLOGIA DEL HIGADO. [Internet]. España.2012. 3º edición. [Citado el 14 de febrero del 2019]; Disponible en: [https://medicinaupv.files.wordpress.com/2011/04/farmacologia\\_humana\\_florez\\_spa.pdf](https://medicinaupv.files.wordpress.com/2011/04/farmacologia_humana_florez_spa.pdf)
25. Basu S. Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity: A Classic Model of Lipid Peroxidation and Oxidative Stress. In: *Studies on Experimental Models* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2011 [citado 2019 Feb 14]. p. 467–80. Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-956-7\\_21](http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-956-7_21)
26. Ahsan R, Islam KM, Bulbul IJ. Hepatoprotective Activity of Methanol Extract of Some Medicinal Plants Against Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats. 2008 [citado 2019 Feb 14]; 37(3):116–22. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/239553128\\_Hepatoprotective\\_Activity\\_of\\_Methanol\\_Extract\\_of\\_Some\\_Medicinal\\_Plants\\_Against\\_Carbon\\_Tetrachloride-Induced\\_Hepatotoxicity\\_in\\_Rats](https://www.researchgate.net/publication/239553128_Hepatoprotective_Activity_of_Methanol_Extract_of_Some_Medicinal_Plants_Against_Carbon_Tetrachloride-Induced_Hepatotoxicity_in_Rats)
27. Miranda M., Cuellar A. “Manual de Prácticas de Laboratorio Farmacognosia y Productos Naturales”. 1ª ed Ed. Universidad de la Habana. Cuba. 2 000. pp. 1, 34–50. [citado 2019 Feb 14].
28. Ajit K. Age-Associated Changes in Antioxidants and Antioxidative Enzymes in

Rats. *Mechanisms of Ageing and Development*. Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd. 59:123-128. [citado 2019 Feb 14]

29. Comité Institucional de Ética en Investigación. Código de ética para la investigación [Internet]. CHIMBOTE - PERÚ; 2016 [citado 2019 Feb 14] p. 1-6. Disponible en: <https://www.uladech.edu.pe/images/stories/universidad/documentos/2016/codigo-de-etica-para-la-investigacion-v001.pdf>

## ANEXOS

### ANEXO 1: TAXONOMÍA DE *BIXA ORELLANA* (ACHIOTE)

**Nombre Científico:** *Bixa orellana*

**Sinonimia:** *Bixa odorata*

**Nombres comunes:** achiote, achote, bija, bicha, onoto, anato

<b>Reino</b>	<b>vegetal</b>
Orden	Malvales
Familia	Bixaceae
Género	<i>Bixa</i>
Especie	<i>Bixa orellana</i>
<b>Parte utilizada</b>	
Las partes utilizadas son: las hojas y semillas de la <i>Bixa orellana</i>	

Fuente: instituto nacional de salud – Perú, 2009



### ANEXO 2: UBICACIÓN DE SAMNE –LA LIBERTAD



Fuente: Google Maps



**ANEXO 3: CERTIFICADO SANITARIO: INSTITUTO NACIONAL DE SALUD, CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS COORDINACIÓN DEL BIOTERIO.**

	INSTITUTO NACIONAL DE SALUD CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS COORDINACIÓN DE BIOTERIO	
<b>CERTIFICADO SANITARIO N°</b>		173-2017
Producto	: Rata Albina	Lote N° : R - 08- 2017
Especie	: <u>Rattus norvegicus</u>	Cantidad : 24
Cepa	: Holtzman	Edad : 3meses
Peso	: 200 a 250 g.	Sexo : machos
G.R.	: 034674	Destino : Yovera Silva, Agustin Pablo
Lima	: 28-08-2017	Trujillo
<p>El Médico Veterinario, que suscribe, Arturo <b>Rosales Fernández</b>. Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *.</p> <p>*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.</p> <p>Chorrillos, 28 de agosto del 2017 (Fecha de atención y emisión del certificado)</p>		
<p><b>NOTA</b> : El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.</p>		 ..... M. V. Arturo Rosales Fernández C.M.V.P. 1586

**ANEXO 4: RECOLECCIÓN Y SELECCIÓN DE HOJAS DE *BIXA ORELLANA* (ACHIOTE), EN EL DISTRITO DE SAMNE PROVINCIA DE OTUZCO, DEPARTAMENTO LA LIBERTAD**



Fuente: Fotos obtenidas de la investigadora.

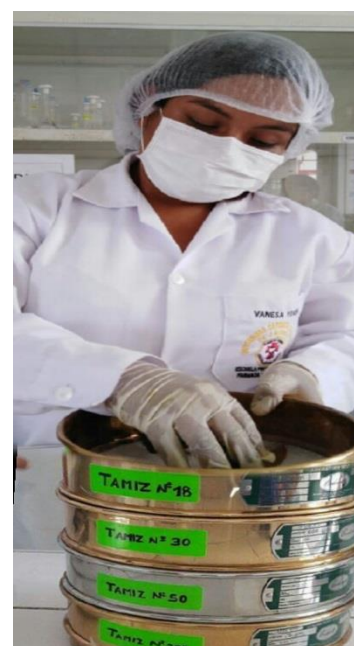
**ANEXO 5: CERTIFICACIÓN POR UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT) FLOR PERUANA DE LOS CÓDIGOS 59459 Y 59460 DE LA PLANTA DE *BIXA ORELLANA* (ACHIOTE)**



Fuente: Fotos obtenidas de la investigadora.



**ANEXO 6: LAS HOJAS DE *BIXA ORELLANA* (ACHIOTE), LAVADO, DESENGRASADAS CON ETANOL AL 96%, SE REALIZÓ EL TAMIZAJE, EN EL LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES DE CHIMBOTE - FILIAL TRUJILLO.**



Fuente: Fotos obtenidas de la investigadora.

## ANEXO 7: OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *BIXA ORELLANA* (ACHIOTE)



Se pesó 200g de hojas tamizada de *Bixa orellana*



Preparación de etanol 80%



Se macero 7 días



Se filtró usando papel Whatman 1



Se utilizó un equipo de baño maría, para eliminar el solvente



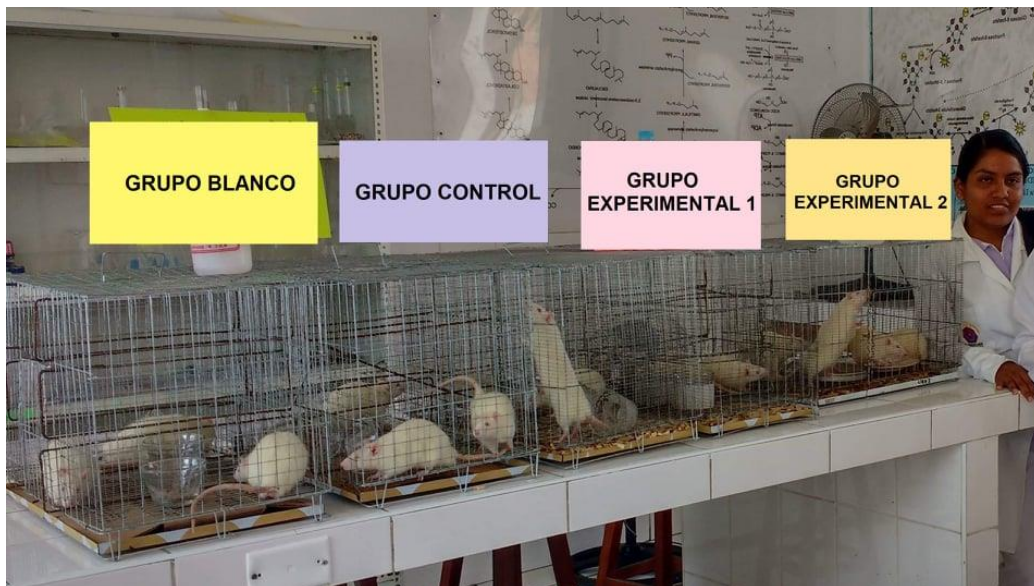
Obteniéndose 31.3 g de extracto seco de *Bixa orellana* (Achiote)

Fuente: Fotos brindadas por la investigadora.



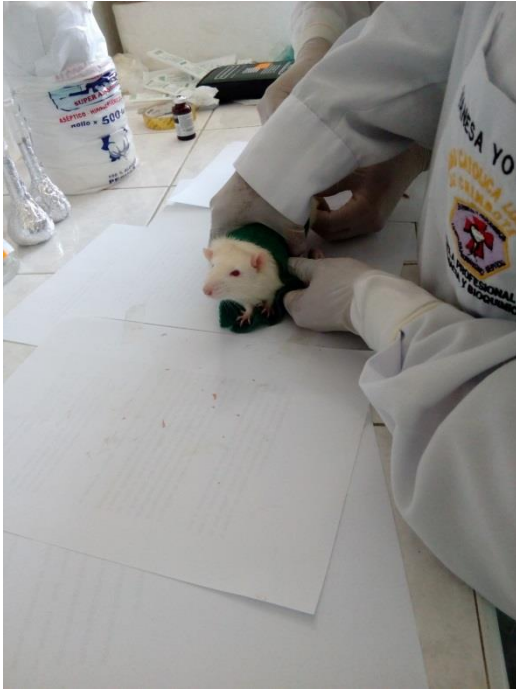
## ANEXO 8:

Adaptando a cada grupo en sus respectivas jaulas para alimentarlos con comida a diario realizando su limpieza de cada jaula con sus bebederos y con comida administrada del INS para una buena alimentación.



Fuente: Fotos brindadas por la investigadora.

**ANEXO 9: SE REALIZÓ LA DISLOCACIÓN CERVICAL DE *Rattus*  
*rattus.var.albinus***



## Anexo 10: DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE MEDIANTE TBARS



Obtener el hígado de *rattus rattus*. var. *albinus*



Observar el hígado las lesiones en cada uno de los hígados



Mantener en solución salina fisiológica



Triturar 5g de hígado



- 1) 0,1 mL de disolución de Butilhidroxi-tolueno (BHT)
- 2) 0,1 mL de disolución de  $\text{FeCl}_3$
- 3) 1,5 mL de disolución tampón glicocola
- 4) 1.5 mL de disolución de ácido tiobarbitúrico

Fuente: Fotos brindadas por la investigadora.



## ANEXO 10: DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE MEDIANTE TBARS



Ebullición en baño de agua T° entre 95° y 100° C por 45 minutos



Observo cambio de coloración



Extraer aductos con una disolución de 2.5ml n-butanol- piridina 0.5ml H<sub>2</sub>O dest.



Enfriando en baño de hielo



Se centrifugó a 4000 r.p.m por 10 minutos



Realizo la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm.

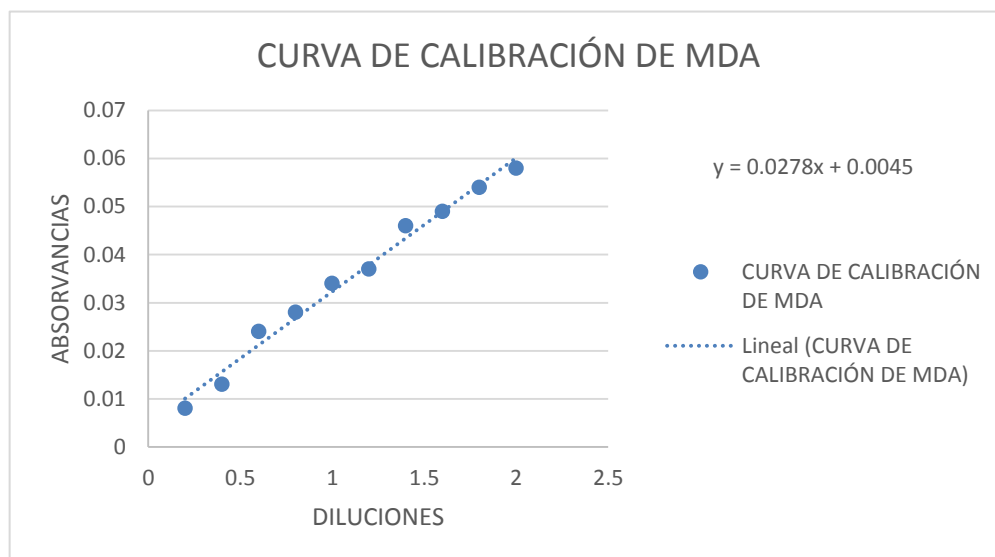
Fuente: Fotos brindadas por la investigadora.

**TABLA 03: VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS EN LAS MEDIDAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS FRENTE A LA CONCENTRACIÓN EQUIVALENTE DE MALONDIALDEHÍDO (MDA) CORRESPONDIENTE (ABSORBANCIA vs CONCENTRACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO EN  $\mu\text{M}$ )**

<b>CURVA DE CALIBRACIÓN</b>	
CONCENTRACIÓN DE MDA EN $\mu\text{M}$	Absorbancia de la muestra (nm)
0.2	0.008
0.4	0.013
0.6	0.024
0.8	0.028
1	0.034
1.2	0.037
1.4	0.046
1.6	0.049
1.8	0.054
2	0.058
2.2	0.06566
2.4	0.07122
2.6	0.07678
2.8	0.08234
3	0.0879
3.2	0.09346
3.4	0.9902
3.6	0.10458
3.8	0.11014
4	0.1157
4.2	0.12126
4.4	0.12682
4.6	0.13238

Fuente: Datos obtenidos en la investigación

**GRÁFICO 01: REPRESENTACIÓN DE LOS VALORES DE ABSORBANCIA (Y) FRENTE A LA CONCENTRACIÓN DE MDA PARA LAS DISOLUCIONES PATRÓN**



Fuente: Datos obtenidos en la investigación