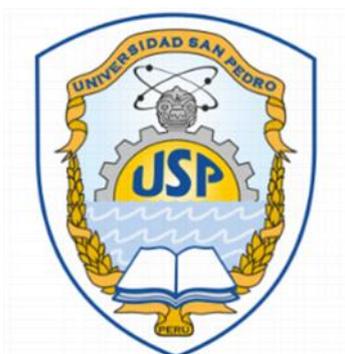


UNIVERSIDAD SAN PEDRO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
PROGRAMA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



**Determinación de la dosis letal media (DL50) del extracto
etanólico de *bixa orellana* L. (achiote) en ratones.**

Tesis Para Adquirir el Título de Químico Farmacéutico

Autores:

Br. Cordova Noguera Arturo Emiliano

Br. Gonzales Alvarado Leonor

Asesor:

Mg. Sarmiento Espinoza Soledad Elizabeth

CHIMBOTE – PERÚ

2019

I.-Palabras clave

| | |
|---------------------|-----------------------|
| Tema | Fitoterapia |
| Especialidad | Farmacia y Bioquímica |

Keywords

| | |
|-------------------|---------------------------|
| Subjet | Phytotherapy |
| Speciality | Pharmacy and Biochemistry |

| | |
|-------------------------------|---|
| Línea de investigación | Estudios etnobotánicos de recursos naturales terapéuticos |
| Área | Ciencias médicas y de la salud |
| Subárea | Medicina básica |
| Disciplina | Farmacología y farmacia |

II.- Título

**Especificación de la porción letal media (DL50) de la
esencia etanólico de *bixa Orellana l.* (achiote) en roedores.**

III.- Resumen

Los concentrados vegetales nos ofrecen una gama de efectos terapéuticos, pero pocos estudios se han realizado de los efectos secundarios de éstos cuando se consumen de manera prolongada y en una dosis adecuada, por tal motivo la actual averiguación tuvo el objetivo de establecer la porción letal media de la esencia etanólico de *Bixa Orellana L.* (achiote) en roedores. Las plantas fueron recolectadas del centro poblado de cascajal, provincia de la Santa, departamento de Ancash. Se logro la esencia etanólico y se realizó el estudio fitoquímico por lo que se manipuló 30 roedores albinos cepa Balb/C de peso 25 +/- g. los que procedieron del Instituto Nacional de Salud-INS. Los roedores fueron fraccionados de seis roedores cada uno en siete conjuntos de forma aletoria. Se administro, concentrado por vía oral los que recibieron SSF 4 mL/ Kg, extracto en dosis de 1, 50, 500, 5000, 15000 y 20000 mg/Kg peso, por única vez, y se observó el número de muertes, cambio de comportamiento, cambios físicos. Se encontró la esencia etanólico de *Bixa Orellana L.* (achiote) es inocuo al ser administrado en roedores

Palabras clave: *Porción letal media(DL50) , esencia etanolico, Bixa orellana L. inocuo.*

IV.-Abstract

The plant concentrates offer us a range of therapeutic effects, but few studies have been carried out of the side effects of these when they are consumed in a prolonged way and in an adequate dose, for this reason the current investigation aimed to establish the average lethal portion of the ethanol essence of *Bixa Oreland L.* (achiote) in rodents. The plants were collected from the center of Cascajal, province of Santa, Department of Ancash, the ethanol essence was achieved and the phytochemical study was carried out; 30 albino strain Balb / C mice weighing 25 +/- g were used. Those who came from the National Institute of Health-INS. Rodents were divided into six rodents each in seven sets randomly. The extract was administered orally those who received SSF 4 mL / Kg, extract in doses of 1, 50, 500, 5000, 15000 and 20000 mg / Kg weight only once and the number of deaths, behavior change, Physical changes. The ethanol essence of *Bixa Orellana L.* (achiote) was found to be harmless when administered in rodents

Keywords: lethal average portion (LD50), ethanol essence, *Bixa Orellana L.* innocuous.

INDICE

Pág

| | |
|---|-----|
| Palabras clave..... | I |
| Título de la investigación..... | II |
| Resumen..... | III |
| Abstracto..... | IV |
| Índice | V |
| Introducción..... | 01 |
| Antecedentes y fundamentación científica..... | 02 |
| Justificación de la investigación..... | 11 |
| Problema | 14 |
| Marco Referencial..... | 15 |
| Hipótesis..... | 29 |
| Objetivos..... | 29 |
| Metodología..... | 30 |
| Tipo y Diseño de investigación..... | 30 |
| Población y Muestra..... | 30 |
| Técnicas e instrumentos de investigación..... | 31 |
| Resultados..... | 38 |
| Análisis y Discusión..... | 41 |
| Conclusiones..... | 43 |
| Recomendaciones..... | 44 |
| Agradecimientos..... | 45 |
| Referencias Bibliográficas..... | 46 |
| Anexos..... | 51 |

Introducción

El presente trabajo que pongo a consideración del Jurado Calificador, es el esfuerzo de recopilación de datos, de investigación, en aras de conseguir el ansiado título profesional, que es la meta de todo estudiante universitario.

Seguramente hay mucho que agregar, quitar, en el basto conocimiento de investigación científica, por lo que pido al jurador calificador su comprensión e indulgencia.

El conocimiento científico no es absoluto sino relativo, porque lo que es hoy una tesis mañana puede ser una hipótesis dado que el conocimiento científico es evolutivo. En base a esta premisa, mañana surgen otras teorías que perfeccionan el conocimiento aprendido. En este contexto, este trabajo es perfectible ya que la ciencia y la tecnología avanzan a velocidades inimaginables y el trabajo realizado puede pasar a formar parte de una hipótesis, pero en ningún de los casos pierden su naturaleza y aplicabilidad.

Dentro de esta elucubración, se deja abierta la posibilidad de hacer enmendaduras procedimentales, nuevas hipótesis con la finalidad de que el producto terminado cada vez sea más confiable.

Según Imre Lakatos, la única forma de justificar el conocimiento científico es a través de la crítica y la contrastación de nuestros ensayos de solución a los problemas surgidos en la tensión en nuestro conocer y nuestro ignorar. El método de la ciencia es pues, el de las tentativas de solución, el del ensayo o idea de solución, sometido al más estricto control crítico, no es sino una prolongación crítica del método del ensayo y el error.

1.1. Antecedentes y fundamentación científica.

Reyna, G., Barrantes, R. (2018). En su investigación denominada Toxicidad oral aguda de la esencia etanólico del producto de Aguaymanto liofilizado (*Physalis peruviana* L.) en Ratones (*Mus musculus*). Tesis Para adquirir el Título Profesional de Médico veterinario, encontraron que; Aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) es una planta de gran distribución en Perú. Se ha demostrado científicamente efectos hipoglucémicos y antioxidantes, sin embargo, no cuenta con estudios de toxicidad. Es neutral la investigación para evidenciar la toxicidad oral aguda de la esencia etanólico del producto de *Physalis peruviana* L. en modelos animales a porción 50, 300 y 2000 mg/kg. Le emplearon roedores *Mus* músculos hembras y machos, divididos con el sexo en conjuntos de 3 animales por cada conjunto experimental. El peso anatómico fue similar en conjuntos experimentales y grupo control. En la necropsia no se descubrieron signos anatomopatológicos que evidencien efectos tóxicos, no hubo variedad específica en los pesos de las partes: hígado, corazón y riñón. La administración es 50, 300 y 2000 mg/kg de la esencia etanólico de *physis peruviana* L. no produce signos de toxicidad oral aguda en roedores machos ni hembras, por lo tanto, se concluye que las dosis mencionadas son inocuas, porque se avala el margen de seguridad.

Navarro, y Aragüeño C. (2019), en su trabajo de investigación titulado: Toxicidad aguda de la esencia acuoso de hojas de *Calathea lutea* “bijao” en roedores albinos *Mus musculus* Balb/C”. En la observación experimental, anticipado, colateral, 12

ejemplares que se trabajó con roedores albinos Balb/C repartidos en agrupación negativo de sexo macho y 3 porciones experimentales en lo cual, se optó que sea de previo ayuno, por la vía oral se le administró una porción única de esencia acuosa de hojas de *Calathea lútea* “bijao” a porción única 25 mg/kg, 200 mg/kg y 2 000 mg/kg a proporción. El día uno se tomó el peso somático de los roedores y el día siete y catorce. Resultados importantes se encontraron y fueron: que el 7,23% de benéfico por cada 100 g. de hoja seca. Se expresó un aumento durante el tiempo de experimentación en una aproximación del primer al séptimo día 17,52% del peso promedio y aproximadamente 15,42% del peso promedio en el séptimo al décimo cuarto día con una disminución. En los órganos y sistemas se observa una toxicidad macroscópica aguda, se evidenció en toda la agrupación sedación leve a nivel de comportamiento, en el sistema autónomo y nivel epidérmico, el peso corporal del pilo erección leve en la dosis de 200 mg/kg. Asimismo, la connotación de un aumento con proximidad de 80% del basal y el 30% en el roedor de peso corporal total, donde evidenciamos crecimiento hepático en las agrupaciones 2 (200 mg/kg) y predominancia en el 3 (2000 mg/kg P.C) con una variación de 1,97 g en el peso entre los grupos. En lo cual, concluyo que la esencia ácuea de hojas de *Calatea lutea* “bijao” en los animales presenta un posible efecto toxico y nocivo en la experimentación (a dosis de 2000 mg/kg) se observa cambios clínicos significativas a nivel hepático contemplado en comparación del grupo negativo de control.

Se conoce también como Aguaymanto. La *Physalis peruviana* L. se usa como fuente de vitamina A, vitamina B compleja, vitamina C y mineral. El fruto tiene 15% de solubles sólidos (azúcares) y su alto nivel de fructosa hace que sea muy útil para personas con diabetes, rico en antioxidantes que retarda el envejecimiento, ayuda a cicatrizar heridas y mejora el sistema inmunológico otros beneficios es aliviar el estrés. Tiene alto contenido de fibra dietética hace que actúe como un regulador intestinal que permite la pectina. El Aguaymanto tiene un nivel de fósforo muy alto y (Ramadán and Marcel, 2003). Posee una serie de compuestos entre ellos los witanolidos (lactonas esteroidales) composición química reconocidos por su peculiaridad citotóxicas con dificultad diferentes a los tipos de cáncer entre ellos el cáncer de seno. (Lan et al., 2009)

Análisis elaborado por algunos científicos reportan propiedades antioxidantes antibacteriales, hepatoprotectoras, inmunomoduladoras, antitumorales y presencia de esencias y fracciones del cáliz de compuestos, tiene propiedad antiinflamatoria como Pp-D28-LF (Wu *et al.*, 2006), y propiedad sobre células cancerígenas pulmonares anti proliferativo. El consumo de Aguaymanto baja los niveles de glucosa en sangre a los 90 y 120 minutos (glucemia) postprandial (GP) en jóvenes y adultos, causando un gran efecto hipoglucémico (Rodríguez and Rodríguez, 2007). A pesar de los estudios antes mencionados aún no existe una investigación relacionada con los efectos nocivos del Aguaymanto usada a altas dosis.

Desde nuestros ancestros los seres humanos han usado como tratamientos naturales las plantas para sanar los síntomas presentados, y transmitido de padre a hijo y sucesivamente de generación en generación hasta el día de hoy. (Marcia, 2007).

En 1998, los editores del *New England Journal of Medicine* declararon: "es hora que se detenga la libre preparación del medicamento alternativo u opcional. Entre su propuesta, fundamentada que los medicamentos alternativos no tenían fundamentos ni publicaciones, no tenían estudios científicos en este campo. A partir de ser sentir a los investigadores, científicos e practicantes se empezó a defender con las publicaciones que aún son insuficientes de las investigaciones clínicas, la Fito medicina se comercializa y padecen estudios preclínicos establecidos (Marcia, 2007).

Es cierto que al extraer, la separación e identificar de conformar químicos de las plantas de (origen vegetal), tiene un propósito las sustancias medicinales (insumos químicos) que emplean desde nuestros antepasados y que fue una revelación hasta ahora en la actualidad; en condiciones de mejorar y desarrollar de la mano con la fitoquímica para mantener científicamente las investigaciones en las plantas (vegetación) (Pérez, 2007).

Para la protección de preparado medicinal se dan regulaciones internacionales, que determinan y optan en exigir investigaciones (fármaco-toxicológicas) en

roedores de estudio para ensayo preclínico antes del inicio de la aplicación en seres humanos (Centro para el control de la calidad de los medicamentos, 1998).

Uno de la investigación de toxicidad que se ejecuta para la evaluación de una sustancia es la especificación de la Porción Letal 50 (DL50) del producto, especial para la variedad de roedores de estudio. Con los roedores se trabaja la distinta proporción de la DL50 en el plazo determinado de vida útil de la especie. Tiene valor DL50 más característico de toxicidad aguda en una sustancia, que empezó a desenvolverse en 1927 por J. W. Trevan y se define como: "aquella porción que origina el perecimiento del 50% de los animales (Jurado, 1989).

1.2. Justificación de la investigación

La orientación de implementar la fitoterapia debe efectuarse en nuestra sociedad teniendo el cuidado en concluyentes pautas para llegar a realizar los resultados anhelado: no obtener resultados colaterales es la mejora del síntoma (Villaescusa, 2006).

El tratamiento con plantas medicinal de uso vegetal o hierbas medicinales, es el uso de las sustancias vegetales (fitoterapia) plantas o partes del estado natural de la planta sin procedimiento químico (fitoquímica). Los diluyentes vegetales se utilizan toda parte de la planta entera como (fruto, raíz, corteza, hoja) etc. El insumo natural de las plantas es importante y constituye una gran complicación, especificidad está comprobado terapéuticamente (Villaescusa, 2006).

En este novedoso año, la fitoterapia (medicamentos naturales) herbarios van alcanzando importante posición, en países subdesarrollados como industrializados, gracias a empresas farmacéuticas u numerosos institutos que son emprendedores y continúan en la investigación intensamente por lograr encontrar una cura (Discovery de salud, 2005; García, 2000). Los insumos logran usarse en la terapéutica con éxito alentador, es necesario un sistema adecuado para controlar, producciones y las comercializaciones, reglamentar e implementar y garantice la calidad, eficacia de medicamentos y seguridad sanitaria, los objetivos constituyen la regulación farmacéutica. (Erich, 2004; Velazco, 1999).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) la reflexión de dividir los mitos con la realidad, la medicina tradicional se usa para demostrar en los ensayos preclínicos, distinguir con los métodos utilizados como elixir validos de los ineficaces u perjudicial. La OMS fomenta la prontitud de métodos que garanticen mediante el comienzo calidad, seguridad y eficacia del elixir (Morón, 2002; Okerele, 1984).

Por otra parte, deben existir diversos estudios preclínicos antes de utilizar en seres humanos un innovador medicamento, sin embargo no pueden exigir la igualdad de la molécula sintetizada, con un desconocimiento total de la acción farmacológica de una medicina natural, la administración de la medicina natural en su forma tradicional que se hizo de generación en generación y empleados en diversos continentes. Es decir que las plantas medicinales no son de todo confiable

por teoría popular en lo eficaz de su actividad farmacológica que son capaces de producir cualquier efecto adverso. Sin embargo, pueden pasar desapercibidos hasta en una investigación científica (Morón, 2002).

En la observación de la toxicidad o que se realizan para medir la sustancia que comprende la Especificación de la Porción Letal 50% (DL50) del producto (únicamente para la especie animal “roedores” en ensayos preclínicos); por esos de los ensayos con distinta proporción de la DL50 durante un estadio de vida útil de los roedores (Jurado 1989).

1.3 Problema

Los productos naturales en la actualidad se buscan para tratamiento alternativo de afecciones que se han intensificado para tratar las dolencias o aliviar una afección, tomando en cuenta cual será la porción letal media de la esencia. Teniendo en cuenta la crecida de la población, es la tendencia a satisfacer la necesidad de productos Fito terapéuticos. Los estudios a seguir es la obtención de investigar nuevos fármacos a partir de la biodiversidad con estudios científicos, teniendo la consideración encontrar en la biodiversidad en potenciar nuevas estructuras que puedan contribuir en ser cabezas de serie, considerando que las investigaciones son un gran reto porque no es solo estar basado en el conocimiento, sabiduría si no es con la práctica, se debe garantizar el uso seguro e eficaz y accesible a la población entonces se plantea el siguiente problema. ¿Cuál será la porción letal media de la esencia etanólico de *Bixa Orellana* (achiote) cuando se administra por vía oral en roedores?

1.4 Marco Referencial

1.4.1 Toxicología y estudios toxicológicos

La toxicología es una descripción de las toxinas o, en una definición más indispensable para reconocer y determinar los efectos adversos agregados a la explicación de sustancias químicas. En tal sentido, la toxicología afluenta de información de investigación, métodos y diseños, la disciplina medica de la epidemiologia. Los estudios de investigación básica sobre el mecanismo de acción de los agentes tóxicos es la toxicología a la interpretación, elaboración de las pruebas que ha sido probada en los ensayos para determinar la sustancias toxicas de los agentes (Albert, 2005).

El objetivo es demostrar cómo afectan ciertas sustancias químicas dentro de nuestro organismo como seres vivos y buscar en los niveles sustancias de compuestos químicos que pasa de ser seguro a no serlo. Es un reto que es muy difícil superar sabiendo que no provoca daño a la salud en la persona que podría ser letal en otras.

El crecimiento de la industria química ha hecho establecer que la toxicidad en un amplio uso de sustancias químicas de numerosos compuestos. Se relacionan a la vida de los seres humanos, para establecer a los niveles de explicar sustancias que presentan un riesgo a la salud. En términos generales, con las pruebas toxicológicas se intenta investigar qué tipos de condiciones han de darse para que las células biológicas

puedan verse afectadas por la actividad toxica de una estructura química determinada (Valles y florentino, 2000).

1.4.2. Toxicología experimental

La evaluación de la toxicidad (llamada también Toxicología Experimental) tiene como objetivo especificar la clasificación de sustancia venenosa y a una escala (aguda, crónica, acción irritante, neurotoxicidad, etc.) de una definida sustancia con seguimiento de protocolos de uniformidad, para cumplir uno de los requisitos legales para su padrón, mercantilizar y utilización posterior (Repetto, 1997).

Es importante que todo profesional de esta rama de toxicología experimental conociendo la terminología médica y métodos abreviados que están en todo el mundo, valorar la toxicidad de un producto, que se crearon para cumplir en su momento las de 3 “R” como principio (refinamiento, reemplazo y reducción), de tal forma se trata reducir la cantidad de roedores posibles, teniendo en cuenta que la muerte de estos roedores no es un objetivo fundamental de esta investigación, si no la llamada del efectos adversos de evidente toxicidad como la terminación del trabajo investigativo (Albert, 2005).

1.4.3. Toxicidad aguda

En la toxicidad aguda se trata del crecimiento presuroso de los síntomas y efectos luego de la aplicación de una porción única relativamente alta o se relaciona los daños inmediatos producidos por porción únicas suficientemente grandes. Es la indagación en los roedores que se lleva después de la administración de la sustancia y tiene la duración hasta 14 días, de los cuales después los roedores son sacrificados y analizados anatomopatológicamente (Arencibia, 2003).

Es cuantificar la toxicidad aguda en exposiciones por vía inhalatoria o en medio acuático, el parámetro más empleado suele ser la DL50, y la CL50 pero también se utilizan las dosis que provocan un determinado efecto, como la DE50 o CE50 (dosis o concentración efectiva media (Albert, 2005).

- **Periodo de observación:** Al menos 14 días, pero no rígidos. En este se determinará: reacciones tóxicas, inicio y término de periodo de recobrado. El tiempo en que los signos aparecen y desaparecen y **cuando** mueren (esto es importante) (Bello, 2001).
- **Exámenes clínicos:** Se realizan: una vez al día (o más), necropsia a los moribundos y muertos, observaciones de: variación en la dermis, ojos, los pelos y membranas mucosas, respiratorio, circulatorio, central y autónomo, actividad somatomotora (Bello, 2001).

- **Signos clínicos:** Comportamiento, temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letárgica, sueño-coma, tiempo en que mueren lo más preciso posible, peso: a los tiempos 0, 7 y 14 días.
- **Patología:** Necropsia de todos los animales, Cambios patológicos groseros deberán registrarse en animales que sobrevivan 24 o más horas (Bello, 2001).

1.4.4 Clases de Toxicidad Aguda (CTA) (Álvarez, 1996).

Los métodos alternativos se aplican en el campo de la toxicología encajando con la resistencia social al uso indiferente de roedores de ensayo, con la ciencia tenemos una necesidad de mejorar la evaluación toxicológica, que nos da la oportunidad solo siempre queda en la explicación de los daños, de modo tradicional en métodos y técnicas que lo facilitan.

Las mejoras de almacenamiento es un procedimiento alternativo de intercambios con un objetivo de no reiterar posibles ensayos innecesarios, diseñar e perfeccionar los experimentos para sumar su autenticidad y a la vez reducir el padecimiento de las cifras de roedores usados en la práctica de preclínico. Como consecuencia de los métodos se trata de comprobar científicamente y validar en la legislación actual.

Una de las alternativas surgidas en el procedimiento de clases tóxicas agudas impulsado por un grupo alemán; el cual utiliza sólo 3 roedores de 24 roedores del mismo sexo en un procedimiento por etapas y permite clasificar las sustancias dentro del rango de toxicidad y confirmar los valores de DL50, obtenidos por el método convencional. Estos son tres principios básicos que identifican el amplio concepto de los métodos alternativos fundado del origen de las tres erres (3R):

- Sustituir los animales de experimentación por métodos in vitro.
- Disminuir el número de animales que se utilicen en los ensayos.
- Reducir el dolor en los animales, así como el sufrimiento.

1.4.5 Estudios de toxicidad a dosis límites (Álvarez, 1996).

Los estudios de la toxina aguda tienen por objetivo especificar la reacción adversa de una porción elevada de una sustancia única. Comúnmente, es el fin del estudio con el fallecimiento del roedor y la toxina aguda se especifica por la porción letal 50, es reproducir más o menos la porción en la sustancia que produce el fallecimiento en el 50% de los roedores.

Es importante señalar con los ensayos de toxina aguda no son un sinónimo de mortalidad de los animales expuestos al agente a evaluar; ya que una información amplia deberá ser obtenida a partir de este estudio, de toxicidad aguda correctamente diseñado que permita no solo un rápido

conocimiento de letalidad sino también; la existencia de signos asociados a manifestaciones de toxicidad y posibles órganos blancos, entre otros aspectos.

Los ensayos se desarrollan en ambos sexos, así como también en animales jóvenes y adultos debido a las conocidas diferencias de susceptibilidad. La introducción de especies no roedores resulta de particular importancia cuando las DL50 en ratas y ratones son muy disímiles sugiriendo claras diferencias entre especies en la absorción, distribución, biotransformación y/o eliminación del principio activo (Holstad, 2001).

1.4.6 Toxicidad sub crónica (Roldán, 2016).

Esta toxicidad comprende porciones continuas de la muestra química a analizar. Generalmente es administrada en un lapso de 90 días aproximadamente. Se realiza esta prueba a fin de investigar si hay toxicidad en vísceras u órganos, se obtienen datos de porción efecto y con estos se proyectan los análisis de toxicidad crónica, se incluye la proyección de una “escala de efectos no deseados que no han sido detectados” denominado NOAEL (sigla en inglés). Se hace pruebas de tres porciones como mínimo: una porción pequeña que no produzca toxicidad, porción media, porción elevada que produce alrededor 10% de mortalidad y siempre se trabaja con blanco o control que no está expuesta

la sustancia a analizar. En la práctica se usa dos modelos biológicos en grupos de 10 a 20 ratas y 2 a 4 canes. El análisis se hace diferenciando machos y hembras, ya que el sexo podría implicar la respuesta ante el tóxico a aplicar.

Se elabora una tabla de apuntes en la cual se anota minuciosamente la respuesta de los modelos biológicos a los cuales se expuso al tóxico, indicando lo que se observa físicamente como síntomas evidentes de efectos. Luego se toma muestras de sangre que se analizan en tiempos diferenciados. El análisis acaba a los 90 días, se sacrifica a los modelos biológicos que han sobrevivido, se abren los cuerpos para autopsiarlos, observando daños u otros, se realiza examen anatomopatológicos para detectar anomalías producidas por el agente químico al que han sido expuestos. (Arencibia, 2003).

1.4.7 Porción Letal Media (DL50) (Código IMDG, 2006).

Es el grado de toxicidad de una materia o radiación. Cada ser viviente tiene un comportamiento diferente ante ellos. Se define como la dosis dado en una población muestral, logrado una cantidad porcentual de muerte. Normativamente se usa la porción semi letal denominada LD50 que es la cantidad de muestra en miligramos por kilo de peso de un modelo biológico que elimina a un 50 % de población.

DL50: Porción letal media en una toxicidad aguda por ingesta, se obtiene al analizar estadísticamente una muestra en la que se espera, cause mortandad en la mitad de los modelos biológicos, como roedores albinos en un lapso de 14 días. La LD50 se expresa en masa o peso de la muestra aplicada por el peso del modelo biológico sometido al análisis (mg/Kg).

Los resultados indicados como valores LD50 van a depender de: el sistema biológico o metabólico del modelo biológico, la raza, sexo, edad, dieta, entre otros. Si se usa el insecticida DDT la DL50 es 87 mg/Kg de peso corporal en roedores exponiéndolas por vía oral, en el perro la DL50 es de 150 mg/Kg de peso.

1.4.8 Generalidades (Kennedy 1986).

La DL50 es la masa de la muestra administrada por el peso del modelo biológico utilizado en el análisis. Esta definición nos permite comparar la toxicidad relativa de tóxicos diferentes, y así normalizar los cambios a ocurrir debido al tamaño y peso de los modelos biológicos expuestos (se debe tomar en cuenta que la toxicidad no siempre solo está relacionada con el peso del modelo biológico).

Generalmente, la DL50 de una muestra se da en mg/Kg de masa corporal. Pero al trabajar con algunas neurotóxicas como batraciotoxina, que es uno de los más fuertes venenos mortales conocidos, la DL50 se expresa en microgramos por kilo de masa corporal ug/Kg.

Al usar la prueba patrón eligiendo la mortalidad de 50% evita hacer medidas en los extremos, se reduce las pruebas a realizar. Pero implica que la DL50 no es dosis mortal en todos los casos, puede que porción menores puedan serlo, otros con porciones mayores sobreviven.

Medidas como DL1 y LD99 (dosis necesaria para matar al 1% o al 99% de la población testada) se usan con fines diferenciados.

De acuerdo con la vía de administración, depende la dosis mortal, por ejemplo hay tóxicos que causan menos efectos si son administrados oralmente a diferencia si se administra por vía endovenosa. Por estos motivos la DL50 se valora por la vía de administración.

Las medidas de DL 50/30 o DL50/60 son cantidades usadas para indicar que hay dosis que luego de tratar al 50% de la población, sigue siendo mortal entre 30 a 60 días. Se usan preferentemente en los análisis de radiación, en física sanitaria, teniendo en cuenta que, si el modelo biológico sobrevive más de 60 días, generalmente se recupera.

1.4.9 Extractos vegetales

Es conocido que los extractos vegetales poseen efectos terapéuticos por poseer una gama de compuestos orgánicos que forman metabolitos, entre ellos tenemos los flavonoides que forman parte de una subfamilia de polifenoles naturales muy estudiados científicamente en la actualidad. Por sus propiedades estudiadas experimentalmente, su presencia en grandes cantidades en la dieta del ser humano, su uso ancestral como farmacia herbolaria en medicina alternativa, los hace útil en las enfermedades inflamatorias, dérmicas, microbianas, cardiovasculares, cómo anticancerígenas, entre otros. En algunos estudios epidemiológicos se da cuenta que al consumir vegetales y fruta fresca (fuentes importantes de flavonoides) existe un efecto protector ante diversas enfermedades como cáncer, cardíacas, coronarias, apoplejía. E decir tienen un efecto general muy saludable, fortalece y aumenta defensas ante enfermedades crónicas. (Carhuapoma, 2008).

Los flavonoides son compuestos fenólicos presentes en casi todos los vegetales superiores. Son compuestos que tienen un origen biosintético común razón por la cual poseen una estructura básica con grados diferenciados de oxidación dan lugar a los distintos flavonoides tipificados: flavonas, flavanonas, flavonoles, flavononoles, neoflavonas, isoflavonas, antocianinas, catequinas, antocianidinas, chalconas, auronas, diflavonas, entre otras (Lock de Ugaz, 1994).

Los flavonoides, compuestos que además de tener baja toxicidad, poseen propiedades ideales para usarse como cicatrizantes y antiinflamatorios.

Propiedades que inhiben la acción de diversas cuyas actividades es elevada ante una inflamación (middleton, 2000) y poseen propiedades antioxidantes (Asad, 2006).

1.4.10 *Bixa orellana* L. (achiote).

- *Bixa Orellana* L. (achiote):
- Clasificación Taxonómica
- Orden: Malvales
- Familia: Bixaceae
- Género: *Bixa*
- Especie: *Bixa Orellana* L.

Se usaban las hojas aplicándolas como cataplasma a fin de aliviar el dolor de cabeza y preparaba decocciones para usar en gargarismos a fin de aliviar daños en la garganta. En forma ancestral se elabora un a pulpa y se aplica en las quemaduras, a fin de impedir se formen ampollas, ulceras

o infecciones. Se usa la semilla como antídoto en la intoxicación con *Manihot esculenta* (yuca o yuca brava o yuca amarga o yuca agria). Hay evidencias en bibliografía que se usó para paliar los efectos de la viruela en la piel y así evitar la formación de las cicatrices dejadas por este mal, dando excelentes resultados (1908-1910 en Guatemala) (Herbario de plantas medicinales, 2009).

Actualmente son usadas en las comunidades indígenas, por los curanderos de la Amazonía en aplicaciones culturales, su colorante extraído de las semillas como pintura en piel y en lienzos, también lo aplican en la fontanela de los lactantes, mezclada con la resina de “caucho-masha” (*Sapium marmieri*) para protegerlos contra el susto y los espíritus del bosque y de los ríos. Los Matsigenka y los Shipibo-Conibo hacen baños con el “Achiote” para evitar que los deudos de un pariente fallecido “sean cutipados” por los aires del occiso. Algunos curanderos de la Amazonía peruana colocan el jugo de las hojas frescas exprimidas del Achiote en los ojos, para la inflamación e infección; para la epilepsia, el jugo es utilizado en combinación con doce frutas y tomado dos veces diariamente por cinco días. El achiote es usado por los curanderos como un antídoto para las mordeduras de serpientes y se cree que las semillas son un expectorante, mientras se piensa que las raíces ayudan en la digestión y suprimen la tos. Asimismo, el Achiote tradicionalmente ha sido utilizado para desórdenes de la próstata e inflamaciones internas,

hipertensión arterial, colesterol elevado, cistitis, obesidad, insuficiencia renal y para eliminar ácido úrico. Los Cojedes (Venezuela) usan la infusión de las flores para estimular los intestinos, así como también para evitar la flema en los recién nacidos. (Herbario de plantas medicinales, 2009)

De acuerdo a un estudio basado en entrevistas etnobotánicas llevadas a cabo desde 1996-2000 en Trinidad y Tobago, se halló que la *Bixa Orellana* es utilizada para la *Diabetes mellitus* y la ictericia (Lans, 2006). Se podrían mencionar otros usos del Achiote como: astringente, febrífugo, anti disentérico, diurético, afrodisiaco y para el tratamiento de enfermedades venéreas, erisipelas, fiebres intermitentes y otras afecciones. Estas evidencias de uso tradicional han sido un paso preliminar para garantizar la efectividad y la seguridad del Achiote, así como servir de sustento para los ensayos clínicos y como información de sus propiedades terapéuticas. (Alonso, 2004).

1.5. Hipótesis

La porción letal media de la esencia etanólico de *Bixa Orellana L.* (achiote) administrada por vía oral es superior a 2 000 mg/kg en roedores.

1.6. Objetivos

Objetivo general:

Especificar de la porción letal media (DL50) de la esencia etanólico de *Bixa Orellana* (achiote) en roedores.

Objetivos específicos:

- Obtener de la esencia etanólico de *Bixa Orellana L.* (achiote)
- Realizar el estudio fitoquímico de la esencia etanólico de *Bixa Orellana L.* (achiote)
- Especificar la porción letal media DL50 de la esencia etanólico de las hojas de *Bixa Orellana L.* (achiote) en roedores.

II. METODOLOGÍA

2.1 Tipo y diseño de investigación

2.1.1 Tipo

El estudio es un tipo analítico - experimental, aleatorizado, completo, pre-clínico *in vivo*.

2.1.2 Diseño

Este diseño experimental utilizó la técnica estadística que permitió identificar y cuantificar las causas de un efecto dentro de un

estudio experimental pre clínico in vivo. En este diseño se manipuló deliberadamente una o más variables, vinculadas a la porción letal 50.

2.2 Población y muestra

2.2.1 Población

- Roedores Albinos Cepa Balb/C
- Hojas de *Bixa Orellana L.* (achiote)

2.2.2 Muestra

- Roedores Albinos Cepa Balb/C : 30 unidades
- Hojas de *Bixa Orellana L.* (achiote): 5 kg

2.3 Técnicas e instrumentos de investigación:

2.3.1. Obtención de la muestra vegetal.

Las hojas de *Bixa Orellana* (achiote) se recolectarán del centro poblado de cascajal, provincia de Santa, Departamento de Ancash.

2.3.2. Obtención de la esencia etanólico de las hojas de *Bixa Orellana*

(achiote).

Para preparar de la esencia etanólico, de las hojas en muestra vegetal fuerón separadas, seleccionadas y lavadas, posteriormente se trituraron con un molino eléctrico de cuchillas, el polvo fino obtenido fue macerado con etanol de 96°, a temperatura ambiente periodo de 7 días con constante y posterior movimiento, se filtró, y el filtrado fue desecado a 40°C en invernáculo hasta llegar al peso. El producto obtención fue denominado esencia etanólico de las hojas de *Bixa Orellana*. (CYTED, 1995).

2.3.3. Estudio fitoquímico preliminar de la esencia etanólico de las hojas de

***Bixa Orellana* (achiote)** (Lock de Ugaz, 2016).

El estudio fitoquímico de la esencia se ejecutó en la Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Pedro, dentro de sus instalaciones de laboratorio de farmacología que nos permitió determinar cualitativamente los químicos presentes de grupos principales de esencia vegetal, obtenido con apropiados solventes y el modo de reacción en la coloración de la precipitación siendo las reacciones siguientes:

a) Identificación de Alcaloides

Reactante de Dragendorff

Se pone 1 mL de la esencia en el tubo de ensayo, luego es añadido 3 gotas del reactante de Dragendorff, y se procedió a observar

considerándose positivo a formar un precipitado de color rojo ladrillo.

Reactante de Mayer

Se pone 1 mL de la esencia en el tubo de ensayo, a continuación, añadí 3 gotas del Reactante de Mayer y procedí a observar considerándose positivo la formación de un precipitado blanco.

Reactante de Wagner

Se pone 1 mL de la esencia en el tubo de ensayo, a continuación, añadí 3 gotas de Reactante de Wagner y se procedió a observar considerándose positivo la formación de un precipitado café.

b) Identificación de Flavonoides

Reactante de Shinoda

Se pone 1 mL de la esencia en el tubo de ensayo, luego añadí limadura de magnesio seguido de 3 gotas del ácido clorhídrico (HCl) concentrado y se procedió a observar considerándose positivo si la reacción es de rojo oscuro intenso.

c) Identificación de compuestos fenólicos y/o taninos

Reactante de Cloruro Férrico (FeCl₃)

Se pone 1 mL de la esencia en el tubo de ensayo, a continuación, añadí 3 gotas del reactante de cloruro férrico (FeCl_3) al 10% y se procedió a observar considerándose positivo la aparición de coloración verde oscuro.

d) Identificación de triterpenoides y/o esteroides

Reactante de Liebermann-Burchard

Se pone 1 mL de la esencia en el tubo de ensayo, a continuación, se agregó 5 gotas de ácido acético seguido de 5 gotas de anhídrido acético ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$), luego se agregó 1 gota de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y procedo a observar considerándose positivo para triterpenoides una coloración rojo-marrón y para esteroides la presencia de anillo color verde.

e) Identificación de Quinonas

Reactante de Borntrager

Se pone 1 mL de la esencia en el tubo de ensayo, a continuación, le agregue 5 gotas del reactivo de Borntrager se procede a observar considerándose positivo si la reacción es de color rojo intenso o rosado oscuro.

f) Identificación de Azúcares reductores

Se pone 1 mL de la esencia en el tubo de ensayo, primero mezclamos Fehling A + Fehling B y luego se añadió a la muestra. Considerándose positivo un precipitado rojo.

g) Identificación de Saponinas

Se pone 1 mL de la esencia en el tubo de ensayo y diluir 5 veces el volumen en (H₂O) y mover la mezcla vigorosamente en un tiempo de 2 minutos. Considerándose positivo la aparición de espuma de 2mm de elevado en la superficie para persistió por el tiempo de 2 minutos.

2.3.4. Especificación de la porción letal media de la esencia etanólico de cadillo (*Bixa Orellana L.* achiote) en roedores (Vega y Carrillo, 1997).

Se usaron 42 roedores albinos de 25 +/- 5g de peso donde fueron divididos y marcados de un procedimiento aleatoria de siete clases de 6 roedores por cada uno (cada clase estuvo formado por especímenes de ambos sexos y en la misma cantidad), la primera clase fue normal y las otras clases recibieron esencia etanólico de *Bixa Orellana L.* (achiote) a

diferentes concentraciones como se muestra en el siguiente diseño experimental:

| | DOSIS | N^a DE MUERTES | % DE MUERTES | N^a DE VIVOS | % DE VIVOS |
|------------------|--------------|---------------------------------|---------------------|-------------------------------|-------------------|
| CLASE I | SSF 4 mL/kg | | | | |
| CLASE II | 1 mg/kg | | | | |
| CLASE III | 50 mg/kg | | | | |
| CLASE IV | 500 mg/kg | | | | |
| CLASE V | 5 000 mg/kg | | | | |
| CLASE VI | 15 000 mg/kg | | | | |

| | | | | | |
|----------|--------------|--|--|--|--|
| CLASEVII | 20 000 mg/kg | | | | |
|----------|--------------|--|--|--|--|

Los roedores se les observo durante las primeras 24 horas constantemente, de lo administrado de la esencia a distintas concentraciones y pasar diariamente al registro de informar algún síntoma tóxico que se pudiera presentarse en un estadio de 14 días; y anotar a la vez el número de fallecidos.

2.4. Procesamiento y análisis de la información

La especie, fueron vistos continuamente en las primeras 24 horas y después constantemente durante el estadio de 14 días, se registró cualquier síntoma tóxico que pudiera presentar, con los números de fallecidos de cada clase con el cálculo de la DL50, se empleó el método estadístico de los Probits.

III. RESULTADOS

Tabla 1. Marcha fitoquímica de la esencia etanólico de las hojas de *Bixa Orellana* L. (achiote).

| Metabolito Secundario | Reacción de identificación | Cantidad |
|--------------------------------|--|----------|
| Carbohidratos | Molisch | +++ |
| Azúcares Reductores | Fehling | +++ |
| Taninos | FeCl ₃ al 1% | +++ |
| Aminoácidos libres | C ₉ H ₆ O ₄ | ++ |
| Flavonoides | Shinoda | ++ |
| Alcaloides | Dragendorff | ++ |
| Heterósidos Antraquinónicos | Borntrager | + |
| Esteroides triterpénicos | Lieberman | + |
| Glicósidos | Vainillin Sulfúrico | ++ |

Leyenda: (+++) = *Abundante cantidad*; (++) = *Regular cantidad o positivo*, (+) = *Poca cantidad o trazas*; (-) = *Ausencia*.

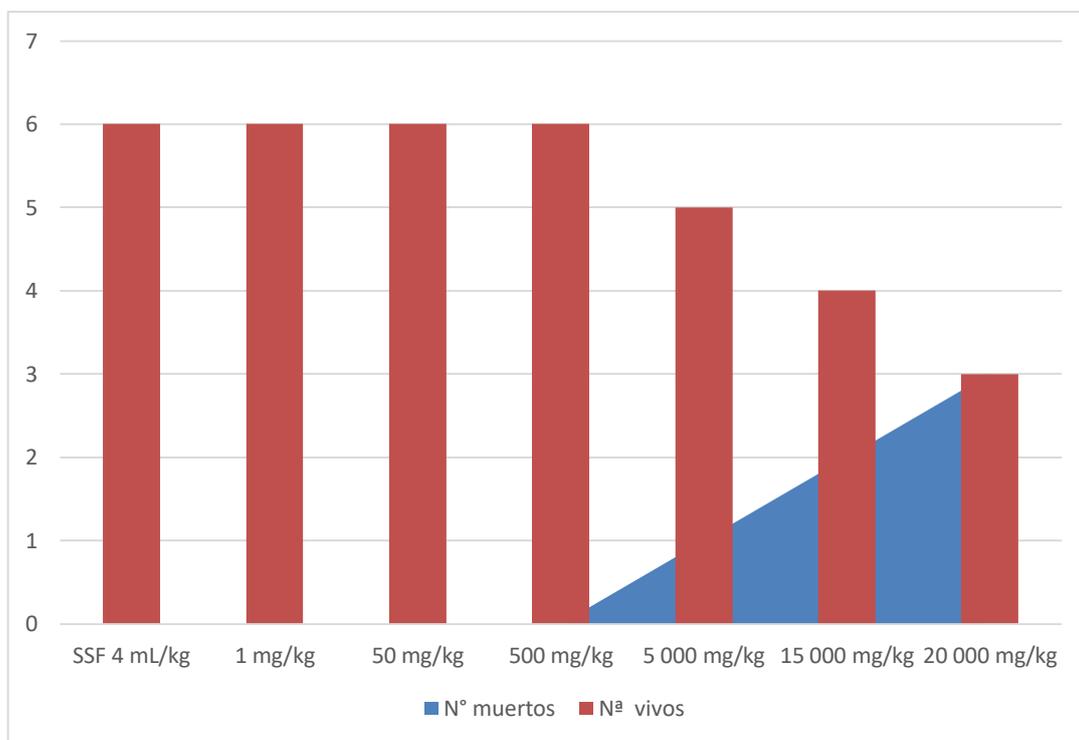


Figura 1. DL50 de la esencia etanólico en las hojas de *Bixa Orellana* L. (achiote). En roedores después de 14 días de su administración en dosis única por vía oral.

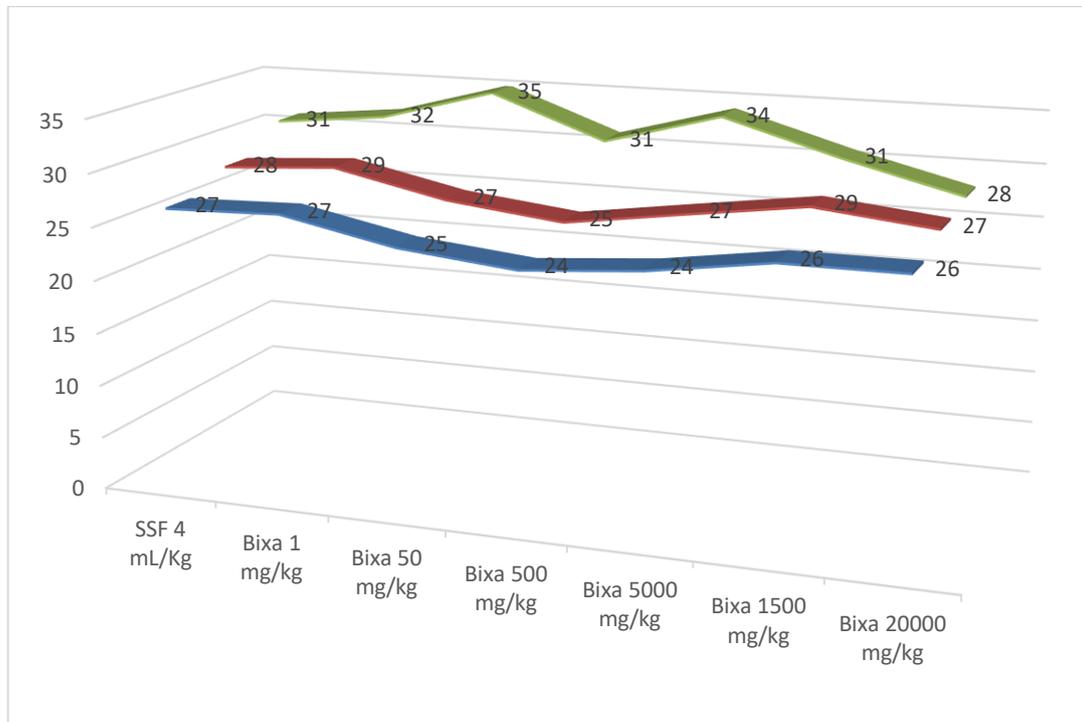


Figura 1. DL50 de la esencia etanólico en las hojas de *Bixa Orellana* L. (achiote). En roedores después de 14 días de su administración en dosis única por vía oral.

IV. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Dentro del elemento fitoquímicos de la esencia etanólico las hojas de *Bixa Orellana* L. (achiote) se ha reportado con presencia de carbohidratos, taninos en abundante cantidad (+++) y azúcares reductores; glicósidos en cantidad (++) y alcaloides, flavonoides, aminoácidos libres, mientras que antraquinónicos heterósidos en esteroide triterpénicos en pequeñas cantidades (+) (tabla 1).

Williams et al., 1985; y Loomis, 1982 clasifican la DL50 de esencias químicas conforme al nivel de la porción en que se encuentran en una serie que empieza extremadamente tóxico (1mg/kg o menos), elevadamente tóxico (1 a 50 mg/kg), templadamente tóxico (50 a 500 mg/kg), es ligero tóxico (500 a 5000 mg/kg), aproximadamente atóxico (5000 a 15000 mg/kg) es inocuo (más de 15000 mg/kg). Según esta clasificación, la DL50 de la esencia de *Bixa Orellana* (achiote) está en el rango de relativamente inocuo ya que la dosis que causó la muerte de la mita de la población (grupo de 6 ratones, siendo la mitad de la población 3) fue de 20 000 mg/kg. (Figura 1).

Según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (2001), la que tiene principio de utilizar la menor numeración en animales, proporcionar información suficiente sobre la toxicidad aguda de una sustancia o compuesto administrado a una dosis definida. La ausencia o presencia de mortalidad en el 50 % de la población, permite clasificar como toxica o no una sustancia, cuando se administran mediante cánula intragástrica dosis definidas en intervalo de 15

días, esto demuestra que la *Bixa Orellana*. Atoxica a dosis máxima de 2000 mg/kg, esto concuerda con lo reportado por Llumiguano (2014). Evidenciando en la figura 1. La DL50 sería 20 000 mg/kg, por lo tanto, la esencia etanólico de *Bixa Orellana* (achiote), sería atóxica.

La variación de observar una disminución o incremento del peso corporal es el consumo del alimento, pensar que está justifica que los animales al principio de la prueba cuenta con la edad de 4 semanas, por eso está en fase de crecimiento el consumo se levantó justificadamente (desde 24g hasta 32 g), después del consumo se estabilizó y se evidenció el soporte de los pesos, de otro lado el indicador cuantificable depende de la individualidad en la actividad de roer de cada roedor y es a veces un tanto cualitativo ya que todo el alimento que el roedor roer no lo ingiere, pues alguno se elimina en la bandeja y entonces se calcula un consumo no real, lo que se corroboró con la observación del comportamiento del peso corporal (Mosberg, 2000).

V. CONCLUSIONES

- Se logró obtener la esencia etanólico de las hojas *Bixa Orellana*. (achiote).
- El estudio fitoquímico preliminar la esencia etanólico en hojas de *Bixa Orellana* (achiote) ha identificado la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos.
- En la evaluación de la toxicidad oral aguda mediante la porción letal 50 DL50 en roedores demostró que la esencia etanólico en hojas de *Bixa Orellana* (achiote) es considerada inocua, ya que no se evidencian muertes a concentraciones menores e iguales a los 2000 mg/Kg.

VI. RECOMENDACIONES

- Llevar a cabo ensayos con otros extractos del tipo polares y apolares, utilizando diferentes solventes.
- Evaluar la toxicidad de la esencia utilizando otras vías de administración para determinar inicio de efecto.
- estudios de seguridad a dosis repetidas, que permitan aplicar este producto natural en investigaciones del tipo clínico.

VII. AGRADECIMIENTO

A Dios, por ser mi guía mi fortaleza en la consecución de mis objetivos. A mis padres, por darme todo el apoyo en lo que soy como persona, mis sueños, mis valores, mis principios mi perseverancia. A toda mi Familia maravillosa, mi esposa e hijas, por su amor, sus consejos y por creer en mí. Mi triunfo lo dedico a ellos.

Agradecer la paciencia, la ayuda prestada de mis queridos maestros (as), compañeros (as) y de la universidad que me acogió, todo el apoyo en la consecución del objetivo, por lo que me queda decir, gracias mi Dios por permitir a conseguir mis objetivos propuestos.

GRACIAS.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerman B, Smith S. (1987). Las Gramíneas de México. Barcelona: **Editorial Reverté S. A**
- Albert, L. (2005). 7º Congreso de Actualización en Toxicología Clínica. Retel 2005;5.
- Alonso, J. (2004). Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Rosario (Argentina): Editorial Corpus. pp 41-45.
- Álvarez, M. (1996). Barreras para la aceptación de métodos alternativos en toxicología. Folleto. Marzo. CECMED.
- Arencibia, D., Rosario, L., López, Y., Fariñas, M., Infantes, J., Díaz, D. (2003). Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicología aguada. Retel.
- Asad, S., Singh, S., Ahmad, A., Hadi, S. (2006). Flavonoids: antioxidants in diet and potential anticancer agents. Medical Science.
- Bello, J. López, A. (2001). Fundamentos De Ciencia Toxicológica. España: Díaz De Santos
- Cabrera T, Casas F, M. Rojas C, Viveros S. (1998). Alimentos en la naturaleza. Algunas plantas comestibles, silvestres arvenses y ruderales. SEMARNAP. México, D.F.
- Carhuapoma, M., López, S. (2008). Maíz Morado Purple Corn Moléculas bioactivas antioxidantes y anticancerígenas. 1ª Edición. Editorial Concytec, 53– 90.
- Carrizo, E. Palacio, M., Roic, L. (2005) Plantas de uso medicinal en la flora de los alrededores de la ciudad de Santiago del Estero. (Argentina). citado el 16 setiembre del 2009. disponible en: [:http://www.dominguezia.org.ar/volumen/articulos/18-3.pdf](http://www.dominguezia.org.ar/volumen/articulos/18-3.pdf)

- Centro para el Control de la Calidad de los Medicamentos. (1998). Metodología de guía para realizar un protocolo de ensayo clínico con productos herbarios. Rev Cubana PlantMed. ;3(2):83-8.
- CYTED. (1995). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Proyecto X-I. Búsqueda de principios bioactivos de plantas de la región. Manual de técnicas de investigación p. 220.
- Códigos del plan nacional(CTI). Citado 12 de marzo 2010. Disponible en: http://cinvestigacion.unsaac.edu.pe/archivosFEDU/codigos_plan_nacional.pdf
- Código IMDG, (2006). Código Internacional de Mercancías Peligrosas. Organización Marítima Internacional, Londres, Vol. I, citado el 15 de diciembre del 2010. Disponible en: ISBN 978-92-801-0132-4.
- Cronquist, A. (1988). The evolution and classification of flowering plants. New York: The New York Botanical Garden p.555.
- Discovery de salud (2005). Intentan impedir el uso curativo de los productos naturales. Citado el 5 de agosto del 2008 3. Disponible en: http://www.dsalud.com/numero56_1.htm
- Erich, D., Juliette, M., Yasmiany, P. (2004). Regulaciones emitidas por el CECMED en el primer semestre de 2004. Servicio informativo del centro para el control estatal de la calidad de los medicamentos citado el 01 diciembre del 2010. Disponible en: <http://www.cecmed.sld.cu/Docs/Infocecmed/Boleno48.pdf>
- García, M. (2000). Legislación iberoamericana sobre fitofármacos y productos naturales. San José: Universidad de Costa Rica.
- Herbario de Plantas Medicinales (2009) Centro Nacional de Salud Intercultural (CENSI) - Instituto Nacional de Salud (INS). Base de datos del Herbario de Plantas Medicinales del CENSI. Lima; CENSI-INS.

- Holstad, M., Sandler, S. (2001). A transcriptional inhibitor of TNF-alpha prevents diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin injections in mice. *J Autoimmun.* 16 (4): 441-7.
- Jurado, C. (1989). *Toxicología Veterinaria*. (2ª ed.), Salvat, Barcelona.
- Kennedy GL, Ferenz RL, Burgess BA. (1986). Estimation of acute oral toxicity in rates by determination of the approximate lethal dose rather than the LD50. *J Appl Toxicol.*;6(3):145-8.
- Lock de Ugaz, O. (1994). *Investigación Fitoquímica. Métodos de estudios de productos naturales*. 2º Edición. Lima: Fondo Editorial PUCP.
- Loomis., T.A. (1982). *Fundamentos de Toxicología*. Acribia, Zaragoza Lans CA. *Ethnomedicines Used in Trinidad and Tobago for Urinary Problems and Diabetes mellitus*. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2006 Oct 13; 2:45.
- Llumiguano, L. (2014). *Evaluación del efecto hipoglicemiante del extracto de Hojas de chapuca o uvilla silvestre (Physalis peruviana) en Ratas (Rattus norvegicus) con hiperglicemia inducida*. Para optar el título de Bioquímico Farmacéutico, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Marcia, A., Jerome, P., Kassirer, D. (2007). *Medicina alternativa. Los riesgos de remedios no probados, no regulados*. Consultado el 18 de agosto del 2008. *N Engl J Med* 2005 Ago;12(2): Disponible en: <http://www.homowebensis.com/archivos/editorial/>
- Morón, F. (2002). *Plantas medicinales y medicamentos herbarios*. En: Morón FJ, Levy M. *Farmacología general*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; p. 195-205.
- Mosberg AT, Hayes WA. (2000). *Subchronic Toxicity Testing*. In: Wallace Hayes A, editor. *Principles and methods of toxicology*. 2 Ed. New York: Raven Press, p.221-37.

- Navarro, Y., Apagüño, C. (2019). "Toxicidad aguda del extracto acuoso de hojas de *Calathea lutea* "bijao" en ratones albinos balb/c". Universidad Nacional de la Amazonía Periana. Iquitos- Perú.
- OECD. (1999). Organisation for Economic Cooperation and Development. Oecd Guidelines for the Testing of Chemical. Citado el 30 setiembre del 2009; disponible en: <http://www.oecd.org>.
- OECD. (2001). Guideline 420. Acute Oral Toxicity and Fixed Dose Procedure [Online]. OCDE. Available: <http://www.oecd.org> [Accessed].
- Okerele, O. (1984). Programas de medicina tradicional: progresos y perspectivas. *Crónicas OMS*;38(2):83-8.
- Pérez M, Cid M, Méndez R, Rodríguez M, Arboláez M. (2007). Proposal of guideline for clinical trial protocols with herbal drugs. *J Biomed*, citado 1 Ene 2007, Disponible en: <http://biomed.uninet.edu/2007/n1/perez.html>
- Repetto, M. (1997). *V Toxicología fundamental*. 3a ed. España: Díaz De Santos.
- Reyna, G., Barrantes, R. (2018). Toxicidad oral aguda del extracto etanólico del fruto de Aguaymanto liofilizado (*Physalis peruviana* L.) en Ratones (*Mus* músculos). Tesis Para optar el Título Profesional de Médico veterinario. Universidad Nacional de Cajamarca. Cajamarca-Perú.
- Roldán, E. (2016). *Introducción a la Toxicología*. ISBN: 978-607-02-8172-3. 3-5
- Soukup S.J. *Vocabulario de los nombres vulgares de la Flora Peruana* (1970). Lima; 70-72
- Valles, P., Florentino, L. (2000). *Toxicología en alimentos*. ISBN: 92-75-31004-4. 2000: 3
- Vázquez, G., Cuevas, G., Cochran, T., Iltis H, Santana, M., Guzmán, H. (1995) *Flora de Manantlán*. UdeG-IMECBIO/University of Wisconsin-Madison, BRIT. Forth Worth, TX, USA.

- Vega, R., Carrillo, C. (1997). Efecto sobre la motilidad intestinal y toxicidad aguda oral del extracto de *Ocimum gratissimum* L. (orégano cimarrón). *Rev. Cubana PlantMed.*; 2(2-3): 14-18.
- Velazco, G., Méndez, R. (1999). Medicamentos. Registro de medicamentos herbarios. *Rev cubana PlantMed* ;1(4):44-7
- Villaescusa, C. (2006) La adormidera. Una fuente de alcaloides de extraordinario interés. *AFT*; 4(4):252-9
- Williams P, Burson J. (1985). *Industrial Toxicology Safety and Health Applications in the Work Place*. Ed Van Nostrand Rein Hold Company. N York.

IX. ANEXOS

Anexo 1.- Tabla de recolección de datos de las muertes registradas al evaluar la toxicidad oral aguda DL50 en roedores, durante 14 días.

| Tratamientos | Nº muertos | N ^a vivos |
|-------------------|------------|----------------------|
| SSF 4 mL/kg | 0 | 6 |
| Bixa 1 mg/kg | 0 | 6 |
| Bixa 50 mg/kg | 0 | 6 |
| Bixa 500 mg/kg | 0 | 6 |
| Bixa 5 000 mg/kg | 1 | 5 |
| Bixa 15 000 mg/kg | 2 | 4 |
| Bixa 20 000 mg/kg | 3 | 3 |

Anexo 2.- Tabla de recolección de datos de los pesos registradas al evaluar la toxicidad oral aguda DL50 en roedores, durante 14 días.

| Tratamientos | Pesos (g) | | |
|---------------------|------------------|---------------|----------------|
| | Basal | 7 días | 14 días |
| SSF 4 mL/Kg | 27 | 28 | 31 |
| Bixa 1 mg/kg | 27 | 29 | 32 |
| Bixa 50 mg/kg | 25 | 27 | 35 |
| Bixa 500 mg/kg | 24 | 25 | 31 |
| Bixa 5000 mg/kg | 24 | 27 | 34 |
| Bixa 1500 mg/kg | 26 | 29 | 31 |
| Bixa 20000 mg/kg | 26 | 27 | 28 |

*Los valores expresados corresponden a los promedios de los especímenes vivos