

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**



**“IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE LOS FITOCONSTITUYENTES Y
CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EN LAS HOJAS DE
Bixa orellana (ACHIOTE)”**

**TESIS I
PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO
DE
BACHILLER EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

AUTORES : Barros Huamani Deysi Gisselda
Domínguez López Lilian Elizabeth

ASESOR : Dr. Ruiz Reyes Segundo Guillermo

CO-ASESOR : Dr. Venegas Casanova Edmundo

**TRUJILLO – PERU
2013**

PRESENTACION

SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO:

En cumplimiento de las normas dispuestas en el reglamento interno de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, sometemos a su consideración el Informe de Trabajo de Investigación I intitulado:

“IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE LOS FITOCONSTITUYENTES Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EN LAS HOJAS DE *Bixa orellana* (ACHIOTE)”

Con el Propósito de optar el Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica.

Dejamos a vuestra consideración señores miembros del jurado la calificación del siguiente trabajo.

Trujillo, Abril del 2013

.....
DEYSI GISSELDA
BARROS HUAMANI

.....
LILIAN ELIZABETH
DOMINGUEZ LOPEZ

JURADO CALIFICADOR

.....
Mg. José Gavidia Valencia

PRESIDENTE

.....
Dr. Segundo G. Ruiz Reyes

MIEMBRO

.....
Dr. Venegas Casanova Edmundo

MIEMBRO

DEDICATORIA

A Dios.

*Por haberme permitido llegar hasta
este punto y haberme dado salud para
lograr mis objetivos, además de su
infinita bondad y amor.*

A mis padres

Ignacia y Apolinar

*Por haberme educado y soportar
mis errores. Gracias por sus consejos, por el amor,
el cariño, la comprensión, la paciencia
y el apoyo que me brindaron
para culminar mi carrera profesional.*

A mis hermano

*Porque siempre he contado con
el para todo, gracias a la confianza
que siempre nos hemos tenido; por el apoyo y amistad.*

DEYSI

A Dios

Gracias por darme la vida, por poner en mi camino a personas maravillosas y por las bendiciones y los regalos que recibo día tras día.

A Mis Padres

Teodora y Eulogio, gracias por serlos guías que me han ayudado a crecer, por la paciencia que han tenido para enseñarme. Gracias por haber estado al pendiente de mí durante toda esta etapa.

A mis hermanas

Que con su amor me han enseñado a salir adelante. Gracias por su paciencia gracias por preocuparse por su hermana mayor, gracias por compartir sus vidas, pero sobre todo gracias por estar en otro momento tan importante en mi vida .

LILIAN

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios Todopoderoso por estar con nosotros en cada paso que dimos, por fortalecer nuestros corazones e iluminar nuestras mentes, y por haber puesto en nuestro camino a personas que han sido de soporte y compañía, así como habernos ayudado a culminar nuestros estudios.

Un agradecimiento especial a nuestro asesor Dr. Segundo Guillermo Ruiz Reyes, por su apoyo constante y desinteresado, por su amistad, por sus enseñanzas y disposición en la conducción del desarrollo de este trabajo de investigación.

Agradecemos también a nuestro Co-asesor Dr. Edmundo Venegas Casanova por su desinteresado apoyo y colaboración en la realización de este trabajo, así como a los señores miembros del jurado por el interés y sugerencias para la realización de este trabajo.

DEYSI Y LILIAN

ÍNDICE

	Pág.
PRESENTACIÓN.....	i
JURADO CALIFICADOR	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MATERIAL Y MÉTODO.....	8
2.1. MATERIAL.....	8
2.2. METODOLOGÍA.....	10
2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	18
III. RESULTADOS	19
IV. DISCUSIÓN.....	21
V. CONCLUSIONES	24
VI. RECOMENDACIONES	25
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
VIII. ANEXOS	30

RESUMEN

El presente trabajo de investigación estuvo orientado a la determinación preliminar de los fitoconstituyentes mediante reacción de coloración, precipitación y cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales presentes en las hojas de *Bixa orellana* (achiote). La especie fue recolectada en el Caserío Cormot, Distrito Compín, Región Gran Chimú, Departamento La Libertad. Los métodos utilizados son los que describen la Norma Ramal para drogas crudas del MINSAP y los resultados se encuentran dentro de los rangos permisibles de ésta. Se preparó el extracto por reflujo, al cual se le determinó: tamizaje fitoquímico propuesta por Olga Loock y Migdalia Miranda (alcaloides, triterpenos/esteroides, antocianidinas, flavonoides, saponinas y taninos.), así mismo se cuantificó los flavonoides totales expresados como quercetina mediante espectrofotometría UV/Visible a 256nm (longitud de onda de máxima absorción), encontrándose en un porcentaje promedio de 1.15%. Los resultados obtenidos fueron evaluados en el programa Microsoft Excel 2007 de Microsoft Office para la realización del análisis estadístico correspondiente (media Aritmética y desviación estándar).

Palabras clave: identificación preliminar, extractos, *Bixa orellana*, flavonoides, cuantificación, espectrofotometría.

ABSTRACT

In the present work of investigation was aimed at preliminary determining of the phytoconstituents by color, precipitation reaction and spectrophotometric quantification of total flavonoids present in the leaves of *Bixa orellana* (achiote). The species was collected in Cormot Caserio, Compin District, Region Gran Chimu, La Libertad Department. Reflux extract was prepared from the leaves, which were determined: phytochemical screening proposed by Olga Loock and Migdalia Miranda (alkaloids, triterpernos / steroids, anthocyanidins, flavonoids, saponins, tannins.). Also quantified the total flavonoids expressed as quercetin by UV / Visible spectrophotometry at 256 nm (wavelength of maximum absorption), finding average percentage of 1.15%. Then the results were evaluated in the program Microsoft Excel 2007 of Microsoft Office to the realization of the corresponding statistical analysis (arithmetic mean and standard deviation).

Key words: preliminary identification, extracts, *Bixa orellana*, flavonoids, quantification, spectrophotometry.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas con propiedades medicinales fueron las primeras medicinas utilizadas en forma empírica para la cura de enfermedades que padecía el hombre, estos conocimientos eran transmitidos oralmente por la carencia de escritura, luego al desarrollarse la escritura, y con la aparición del papiro como soporte de la misma, se comenzó a recoger información, convirtiéndose las mismas en patrimonio de unos pocos dentro de las sociedades por las cuales ha atravesado la humanidad hasta nuestros días. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen. ⁽¹⁾⁽²⁾

En la actualidad existe un reconocimiento del empleo de fuentes naturales de medicamentos y en especial de la Fitoterapia, como la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con una finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, atenuar o curar un estado patológico; justificado en muchos casos por razones económicas, el descubrimiento de efectos adversos en fármacos sintéticos, el mejor conocimiento químico, farmacológico y clínico de las drogas vegetales y sus productos derivados, el desarrollo de métodos analíticos que facilitan el control de la calidad, el desarrollo de nuevas formas de preparación y administración de los medicamentos fitoterapéuticos. En la actualidad, existe una tendencia en los países desarrollados al retorno del empleo de productos naturales en el tratamiento de diversas afecciones; es por ello que destaca el importante papel de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en cuanto a la utilización de la fitoterapia dentro de los programas de salud de los distintos países, a través

de la validación de efectos etnobotánicas adjudicados a las plantas durante la existencia de la humanidad ⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾

Las plantas medicinales son definidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como toda especie vegetal en la que el todo o una parte está dotada de actividad farmacológica. Esta última corresponde a compuestos químicos propios de la planta, que están sometidos a variables físicas, tales como la humedad del suelo, condiciones de luz, temperatura y otros. ⁽⁶⁾

Actualmente la medicina tradicional peruana, sigue siendo la primera instancia de consulta y tratamiento en gran parte de nuestro país. Sin embargo, hasta el día de hoy se viene utilizando las plantas medicinales en base al conocimiento popular y esto hace que no se aproveche la gran mayoría de las propiedades que contiene dicha planta, o sean utilizados de forma inadecuada; como es el caso de *Bixa orellana* (achiote), que tiene como origen en América tropical y crece tanto en regiones planas como montañosas de México hasta Ecuador, Brazil, Perú y Bolivia. Hoy en día está cultivado también en India, Sri Lanka y Java (Wolf, 1997), en las islas Filipinas, en sureste de Africa y en Dominica. ⁽⁷⁾⁽⁸⁾

La planta del achiote es un arbusto de 3 a 10 m de altura. En primer lugar se utiliza el colorante de las semillas y tiene un pigmento llamado «Annatto» es de color rojo, utilizado por los indígenas de América del Sur y por más de 100 años en Europa. Es un aditivo seguro para un gran número de alimentos por su origen natural. Además se utiliza para colorar el pelo, el cuerpo (indigenas de América), textiles y cuero. ⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹⁹⁾

En la medicina tradicional el achiote tiene amplio uso como: astrigente, antiemético, antiséptico, sedante, antibacterial, antioxidante, expectorante, cicatrizante, febrífugo, estomáquico, antidisentérico, diurético, antigonorréico, purgante, desinflamatorio, hipoglicemiante, antidiarreico, hemostático, tratamiento de la hemorroides, anginas, abscesos, cefalálgico, malaria, asma, además como 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.⁽⁷⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾

La semilla molida es utilizada para el tratamiento del sarampión, viruela; existen referencias de que se usó para evitar las cicatrices que deja la viruela en la epidermis, con magnífico resultado (1908-1910 en Guatemala); enfermedades del riñón, disentería, antídoto para el envenenamiento por *Manihot esculenta* (yuca o yuca brava o yuca amarga o yuca agria), así como el cocimiento de la raíz ayudan en la digestión y suprimen la tos y en casos de asma. La pulpa se usa en quemaduras para impedir la formación de ampollas y llagas. Las hojas se aplican como cataplasma para aliviar el dolor de cabeza y la decocción en gárgaras para los males de garganta. La maceración acuosa de las hojas es utilizada en ingestión para evitar las náuseas y como expectorante. La aplicación directa de esta maceración se utiliza para acelerar la cicatrización de heridas.⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾

Asimismo, 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.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

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 C., 2006).⁽¹⁸⁾

Para el análisis de drogas vegetales se emplean diversas marchas fitoquímicas, las cuales utilizan diversas partes de la planta ya que los principios activos no se distribuyen uniformemente en toda la planta. Además también utilizan diferentes solventes que permiten el aislamiento de los principios activos o constituyentes de las drogas, identificándolos por medio de reacciones químicas cualitativas. Un gran porcentaje de los principios activos de las plantas están comprendidos dentro de los llamados metabolitos secundarios que son compuestos químicos de estructura relativamente compleja y distribución más restringida y más característica de fuentes botánicas específicas que los llamados metabolitos primarios, universalmente distribuidos y que participan en la actividad celular de todo ser viviente⁽²⁰⁾

Desde el punto de vista científico experimental las plantas curativas están en estrecha relación con la tierra y el medio ecológico, contienen sustancias químicas terapéuticas funcionales y nutritivas capaces de complementar la alimentación con efecto purificador, regenerador y vivificador que requiere ser validado y demostrado como virtudes de plantas funcionales y medicinales que deben ser clasificados en base al contenido de sus principios activos como: alcaloides, saponinas, hormonas, ácidos orgánicos, componentes nitrogenados, vitaminas, sales, minerales etc., localizados obviamente en diferentes partes

anatómicas y específicas de la planta como en las hojas de achiote, en el cual encontramos: Bixaganeno, ishwarano (aceite esencial) entre otros mono y sesquiterpenos; flavonoides: 7-bisulfato de apigenina, 7- bisulfato de luteolina, 8-bisulfato de hipolaetina, glucósido de apigenina, bisulfato de apigenina, hipolaetina, cosmosiina, entre otros como: flavonas, antocianidinas y sesquiterpenlactonas (Ramírez T., 2001); carotenoides: bixina, norbixina, orelina, β -caroteno, criptoxantina, metilbixina, zeaxantina, luteína; ácido tomentósico; vitaminas (A, B, y C); proteínas; azúcares; celulosa; grasas; calcio, hierro y fósforo; diterpenos: farnesilacetona, geraniol, geranil formato, alcaloides (vestigios), ácido gálico (benzenoide) y ácido alfitólico⁽⁹⁾⁽²¹⁾

Los flavonoides pertenecen a un grupo de compuestos naturales arreglados bajo un sistema $C_6-C_3-C_6$, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C. Se conoce como 10 clases de flavonoides (Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, etc) los cuales pueden encontrarse como aglicona o bajo la forma de glicósidos con una o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa⁽¹⁸⁾

Está comprobado que los flavonoides son importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas al protegerlas contra agentes agresores externos, como la radiación UV, microorganismos, animales herbívoros y del medio ambiente. Pueden actuar como señalizadores químicos, indicando a los

insectos que planta es apropiada para su alimentación, oviposición o simplemente guiándolos y facilitando así la polinización.⁽¹⁸⁾⁽²²⁾⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾

En su relación con el hombre, los flavonoides actúan como antioxidantes naturales, es decir, tienen la capacidad de secuestrar y neutralizar los radicales libres, especies químicas muy reactivas que fácilmente conducen a reacciones incontroladas, resultando en diversas formas de daños oxidativos sobre las moléculas, organelas y diversas células y tejidos; causando su degeneración, envejecimiento, pérdida de su función y otras formas importantes de daño celular. Por lo tanto los flavonoides juegan un papel importante en la prevención de varios procesos fisiopatológicos asociados con el estrés oxidativo y a la presencia de radicales libres, tales como el cáncer y diversas enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares. Otra de sus propiedades, es su capacidad para contribuir a las propiedades de los alimentos, como el sabor o la dulzura. Además son utilizados en la industria de los cosméticos por su actividad desodorante y reductora de la hiperpigmentación causada por la vejez.⁽¹⁸⁾⁽²²⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾

Teniendo en cuenta los estudios mencionados y que no se han realizado trabajos sobre cuantificación de flavonoides totales en *Bixa orellana* (Achiote), así como el conocimiento de los beneficios aportados por estos metabolitos, nos motiva a la investigación aquí descrita, en la que se realizará una identificación preliminar de los fitoconstituyentes y cuantificación de flavonoides totales en las hojas de *Bixa orellana* (achiote).

Para el presente trabajo se planteó el siguiente problema:

¿Cuáles son los fitoconstituyentes y cuál es la concentración de flavonoides totales presentes en la hoja de *Bixa orellana* (achiote)?

Objetivos

Objetivo General:

- Determinar preliminarmente los fitoconstituyentes y cuantificar los flavonoides totales presentes en la hoja de *Bixa orellana* (achiote).

Objetivos Específicos:

- Determinar preliminarmente los fitoconstituyentes presentes en las hojas de *Bixa orellana* (achiote) mediante reacción de coloración y precipitación.
- Determinar la concentración de los flavonoides totales presentes en las hojas de *Bixa orellana* (achiote).

II. MATERIAL Y METODO

2.1. MATERIAL DE ESTUDIO

Hojas de *Bixa orellana* (achiote) provenientes del Caserío Cormot, Distrito Compín, Región Gran Chimú, Departamento La Libertad.

2.2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1. Materiales de Laboratorio

De uso común en el laboratorio de Farmacognosia

2.2.2. Equipos

- **Balanza Triple Brazo** 700/800 series OHAUS US PAT. N° 2, 729,439.
- **Balanza Analítica** OHAUS GA 200 (precisión 0.0001 g)
- **Estufa** THELCO H.W. Kessel Model 17.
- **Baño María**. Marca: MEMMERT.
- **Bomba de Vacío**. Marca: VACUUBRAND. Modelo: 3510
- **Espectrofotómetro** Hewlett Packard de arreglo de diodos modelo 8452A.
- **Horno Mufla** Furnace 1300
- **Tamiz Retsch**

2.2.3. Solventes

- Agua destilada.
- Diclorometano Merck para análisis.
- Alcohol etílico de 96° GL.

2.2.4. Reactivos

- Ácido acético glacial 99,8% de pureza, calidad Sigma
- Ácido clorhídrico 37% de pureza, calidad Sigma
- Ácido sulfúrico 98% de pureza, calidad Sigma
- Anhídrido acético 98% de pureza, calidad Sigma
- Cloruro férrico hexahidratado 97% de pureza, calidad Sigma
- Cloruro de Sodio 99,5% de pureza, calidad Sigma
- Hidróxido de sodio 98% de pureza, calidad Sigma
- Magnesio metálico
- Gelatina fromporcinskin, calidad Sigma
- Tolueno 99,5% de pureza, calidad Sigma
- Yodo 99,8% de pureza, calidad Sigma
- Yoduro de potasio 99% de pureza, calidad Sigma
- Patrón Quercetina Merck
- Metanol Lichrosolv Grado HPLC
- Agua destilada y bidestilada
- Hidróxido de sodio al 1% y 30%
- Hidróxido de potasio al 0,5%
- Propanol
- Ácido clorhídrico 11N

2.3. METODOLOGIA

2.3.1. Recolección

La especie objeto de estudio *Bixa orellana* (*achiote*) fue recolectada en el Caserío Cormot, Distrito Compín, Región Gran Chimú, Departamento La Libertad (7.8° sur latitud, 78.07° Oeste longitud y 3072 m.s.n.m).

2.3.2. Selección

Una vez realizada la recolección de la muestra se procedió a hacer la selección de la materia vegetal con el objetivo de realizar una separación de las partes deterioradas y evitar la mezcla con otra especie.

2.3.3. Identificación taxonómica

La planta medicinal seleccionada, se llevó al *Herbario Truxillensis* de la Universidad Nacional de Trujillo para su identificación Taxonómica. Código N° 53590 (HUT).

2.3.4. Desecación

Para evitar cualquier tipo de alteración que pudiera afectar a la composición de la planta, la droga fue convenientemente desecada.

Las hojas seleccionadas se colocaron sobre papel kraft en un lugar fresco y seco durante 24 horas. Luego se pasaron a bolsas hechas de papel kraft y se llevaron a estufa a una temperatura de 40 °C, durante 48 horas.

2.3.5. Molienda y Tamización

Una vez desecado el material vegetal, se procedió a su molienda en mortero de acero hasta tamaño de partícula adecuado. El material así

pulverizado, se procedió a tamizar (tamaño partícula 2 mm), se almacenó adecuadamente en frascos ámbar en un lugar sin humedad y luz directa, hasta su posterior utilización.

2.3.6. Preparación del extracto por reflujo de las hojas de *Bixa Orellana*²⁴

En un balón de 250 ml se colocó 5 gramos de muestra triturada, el cual humectamos con 100mL de metanol/Agua al 50% durante 24 horas, llevándose a reflujo por 2 horas, y luego filtrar. Luego se realizó las reacciones de identificación.

2.3.7. Tamizaje Fitoquímico de la droga y del extracto fluido: “Prueba de la Gota”^{17,30,31}

Procedimiento:

Pesamos 1g de droga almacenada, agregamos 30mL del solvente (para obtener los extractos: Diclorometánico, Etanólico, agua acida y Acuoso). Se mantuvo a reflujo controlado por 10 minutos en Baño María. Luego se dejó enfriar y posteriormente se filtró. Finalmente realizamos los ensayos correspondientes para cada extracto.

1. Extracto diclorometánico: Se identificó compuestos de muy baja polaridad como: Esteroles, Quinonas.

a. Ensayo de Liebermann-Burchard: Se agregó X gotas del extracto, X gotas de Anhídrido acético, XX gotas de Ácido Acético y I gota de ácido sulfúrico concentrado y se mezcló

suavemente. La reacción es positiva si aparece coloración azul, verde o naranja.

- b. Ensayo de Bornträger: Se agregó X gotas del extracto y se llevó a sequedad, luego se agregó XX gotas de tolueno y XX gotas de NaOH 10%. Se agitó mezclando las fases y se dejó en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo.

2. Extracto etanólico: Se identificó compuestos de polaridad muy variada, como: Esteroides, Alcaloides, Flavonoides y Taninos.

- a. Ensayo de Liebermann-Burchard: Se agregó X gotas del extracto y llevó a sequedad en baño de agua. Luego se agregó X gotas de Anhídrido acético, XX gotas de Ácido Acético y I gota de ácido sulfúrico concentrado. La reacción es positiva si aparece coloración azul, verde o naranja.
- b. Ensayo de Shinoda: Se agregó X gotas del extracto, limadura de magnesio seguido por gotas de HClcc., las coloraciones roja (flavonas), roja a crimson (flavonoles), crimson a magenta (flavanonas) y algunas veces azul o verde, son consideradas positivas.
- c. Ensayo de Tricloruro férrico: Se agregó X gotas del extracto y luego II gotas de Cloruro Férrico, la aparición de un color azul-negro, nos indica la presencia de Tanino derivados del Ácido

Gálico y la aparición de un color verde indica la presencia de Taninos derivados del Catecol.

- d. Ensayo de Gelatina: Se agregó XX gotas del extracto y se llevó a sequedad en baño de agua y el residuo se redisolvió en XX gotas de agua; luego I gota de solución reactiva de gelatina 1%. Se debe de observar un precipitado blanco, que nos indica la presencia de Taninos.
- e. Ensayo de Dragendorff: Se agregó XX gotas del extracto y se llevó a sequedad en baño de agua y el residuo se redisolvió con XX gotas de solución de ácido clorhídrico al 1%. Luego se agregó II–III gotas de reactivo. Este reactivo (yoduro de bismuto y potasio) da, con los alcaloides en solución débilmente acidulada, precipitados de color rojo o anaranjado.
- f. Ensayo de Mayer: Se agregó XX gotas del extracto y se llevó a sequedad en baño de agua y el residuo se redisolvió en XX gotas de solución de ácido clorhídrico al 1%. Luego se agregó III – IV gotas de reactivo. Este reactivo da con casi todas las soluciones de alcaloides, precipitados de color blanco, blanco amarillento o amarillo limón claro.
- g. Ensayo de Kedde: Se agregó XX gotas del extracto y se llevó a sequedad en baño de agua y el residuo se redisolvió en X gotas del reactivo. Este reactivo da positivo en presencia de glicósidos cardiotónicos, con coloración purpura o violáceo.

3. Extracto acuoso - ácido: Se identificó compuestos básicos, como: Alcaloides.

- a. Ensayo de Dragendorff: Se agregó XX gotas del extracto y II a III gotas de reactivo. Este reactivo (yoduro de bismuto y potasio) da, con los alcaloides en solución débilmente acidulada, precipitados de color rojo o anaranjado.
- b. Ensayo de Mayer: Se agregó XX gotas del extracto y III – IV gotas de reactivo. Este reactivo da con casi todas las soluciones de alcaloides, precipitados de color blanco, blanco amarillento o amarillo limón claro.
- c. Ensayo de Wagner: Se agregó XX gotas del extracto y II – III gotas de reactivo. Este reactivo es muy sensible y da con los alcaloides, precipitados floculentos que varían del color café claro al rojo o pardo oscuro.

4. Extracto acuoso: Se identificó compuestos de alta polaridad, como: Flavonoides, Leucoantocianidinas, Saponinas, Taninos.

- a. Ensayo de Shinoda: Se agregó XX gotas del extracto y se llevó a sequedad en baño de agua y el residuo se redisolvió en XX gotas de solución de etanol, luego se agregó unos trocitos de cinta de magnesio seguido por gotas de HClcc; las coloraciones roja (flavonas), roja a crimson (flavonoles), crimson a magenta (flavanonas) y algunas veces azul o verde, son consideradas positiva.

- b. Ensayo de Rosenhein: Se agregó XX gotas del extracto y se llevó a sequedad; luego se agregó XX gotas de solución de ácido clorhídrico 2N/1-propanol llevar a baño maría de 15 – 30 minutos. La aparición de una coloración roja, marrón en la fase acuosa, nos indica la presencia de leucoantocianidinas y catequinas, respectivamente.
- c. Ensayo de Espuma: Se agregó XX gotas del extracto. Se agitó vigorosamente por 30 segundos, y se dejó 15 minutos en reposo. La persistencia de la espuma nos indica la presencia de saponinas.
- d. Ensayo de Gelatina: Se agregó XX gotas del extracto y I-II gota de solución reactiva de gelatina 1%. Si se observa un precipitado blanco, nos indica la presencia de Taninos.

2.3.8. Hidrólisis de Flavonoides^{33,34}

Del extracto por reflujo obtenido se agregó 6.7 mL de Ácido Sulfúrico, llevando a reflujo nuevamente por 4 horas, para después filtrar el extracto hidrolizado.

2.3.9. Purificación de Flavonoides Totales^{33,34}

Del extracto hidrolizado, agregamos metanol/Agua al 50% hasta obtener 200 mL y llevamos a baño maría a 60 °C, hasta reducir a la mitad del volumen total, luego del extracto acido acuoso se enfrió y llevó a refrigeración durante 24 h; filtramos al vacío lavando con agua destilada fría (10-15 °C), eliminando el filtrado, pero el residuo tanto del papel filtro como del recipiente se disolvió con 100 mL de

metanol, calentando previamente a 50°C; la solución lo trasvasamos a una fiola de 100 mL y aforamos con metanol; se filtró al vacío y lavó nuevamente, hasta obtener un precipitado más purificado en el papel filtro, finalmente la solución lo trasvasamos a una fiola de 100 mL y aforamos con metanol. Luego se realizó la cuantificación mediante espectrofotometría UV- visible.

2.3.10. Cuantificación de flavonoides totales del extracto fluido de *Bixa Orellana* H.B.K. mediante espectrofotometría UV- visible.^{32, 33,34}

Procedimiento:

Preparación de la Solución Patrón:

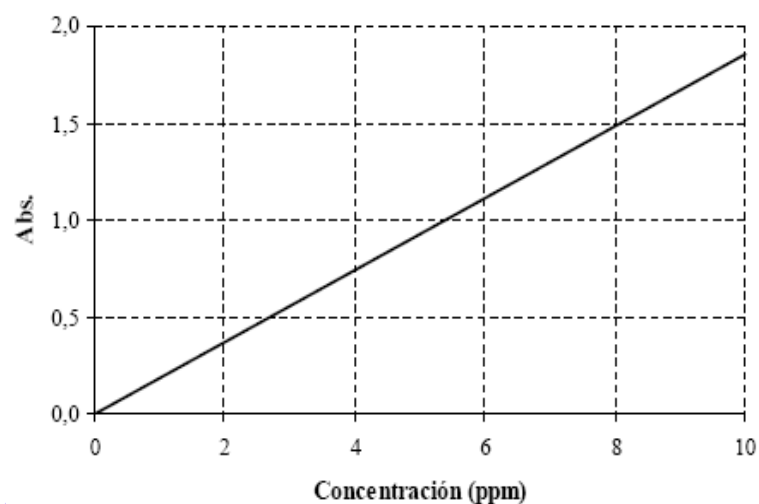
- Se pesó 80 mg de quercetina patrón y se disolvió con c.s.p.100 mL de metanol ° G HPLC; para obtener una concentración de 8 p.p.m.

$$80 \text{ mg quercetina} \times \frac{1000 \text{ ml}}{800 \text{ mg}} = 100 \text{ ml}$$

Preparación de soluciones diluidas de la muestra patrón para la curva de calibración

- Se midió volúmenes de 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1.0; 1.2 y 1.4 ml de la solución patrón y aforó a 100 ml con metanol de ° G HPLC, para obtener concentraciones de 1.6; 3.2; 4.8; 6.4; 8.0; 9.6 y 11.2 ppm respectivamente.

- Primero se realizó un espectro con la disolución de 8.0 ppm en el espectrofotómetro para conocer el pico más alto correspondiente a la λ máx a la que absorbe la quercetina, a la cual se leyeron todas las muestras.
- A continuación se hizo 3 lecturas de absorbancias de las concentraciones conocidas, en el espectrofotómetro UV-Visible Hewlett Packard (8452A–DiodeArraySpectrofotometer) para obtener la ecuación de la recta.



Preparación de la Solución Blanco:

Se utilizó metanol HPLC como solución blanco, tomar una alícuota de 3mL aproximadamente para la calibración del espectrofotómetro UV-Visible Hewlett Packard (8452A–DiodeArraySpectrofotometer).

Preparación de la solución problema

- De la solución obtenida en la purificación de flavonoides totales se tomo 150 uL aforandose a 100 mL con metanol ° G HPLC; de cada alícuota se obtuvo 3 lecturas de absorbancias a 256 nm en el espectrofotómetro UV-Visible Hewlett Packard (8452A – DiodeArraySpectrofotometer).

2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Se empleó el programa Microsoft Excel 2007 de Microsoft Office para la realización del análisis estadístico correspondiente: Media Aritmética y Desviación Estándar.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIQUIMICA

III. RESULTADOS

Tabla 01: Tamizaje fitoquímico de la droga (hoja seca) y del extracto por reflujo de *Bixa orellana*

ENSAYOS	METABOLITOS	MUESTRA	RESULTADO
Dragendorf	Alcaloides	Droga	+
		E.R.	+
Mayer	Alcaloides	Droga	+
		E.R.	+
Wagner	Alcaloides	Droga	+
		E.R.	+
Bornträger	Quinonas	Droga	-
		E.R.	-
Liebermann-Burchard	Triterpenos/esteroles	Droga	+
		E.R.	+
Rosenhein	Antocianidinas	Droga	+
		E.R.	+
Shinoda	Flavonoides	Droga	+
		E.R.	+
Kedde	Glicósidos cardiotónico	Droga	-
		E.R.	-
Espuma	Saponinas	Droga	-
		E.R.	-
Cloruro férrico	Polifenoles	Droga	+
		E.R.	+
Gelatina	Taninos	Droga	+
		E.R.	+

Leyenda: E.R.: Extracto por Reflujo

+: Positivo

- : Negativo

Tabla 02: Cuantificación de flavonoides totales expresados como quercetina de las hojas de *Bixa orellana* mediante espectrofotometría UV-visible.

GRAMOS DE HOJA	CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES
100 g	1.15 g expresados como quercetina

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

IV. DISCUSIÓN

Para asegurarnos que se está trabajando con la muestra correcta, el material vegetal objeto de estudio fue identificado como *Bixa orellana* en el Herbario Truxillensis de la Universidad Nacional de Trujillo con número de herbario 53590 (HUT).

El material biológico, debe estar enteramente libre de la contaminación inorgánica como polvo, la excreta de los animales; y de la contaminación orgánica como insectos, etc. Además es difícil preparar una muestra con materia extraña puesto que la mayor parte de ésta se adhiere a las partes intrínsecas de la planta medicinal. El problema es especialmente difícil cuando las muestras de los materiales de la planta medicinal seleccionados son pequeñas; deben ser suficientemente grandes, ser representativos, de ahí la importancia de realizar un control de materia extraña orgánica e inorgánica. Se entiende por materias extrañas aquellas partes de la droga que no corresponde a las exigencias que señala la monografía en cuanto a color, tamaño, estado y grado de pulverización, mezclas de otras partes de la planta o de otras plantas, polvo, arena, piedra y otras sustancias minerales. Por eso en nuestro trabajo antes de realizar la extracción se eliminó esas sustancias extrañas lavándolo con agua destilada. ⁽¹⁷⁾⁽²⁴⁾

Una forma de conservación de la droga cruda es eliminar el exceso de humedad para evitar reacciones de hidrólisis de sus fitoconstituyentes y la proliferación de microorganismos por eso después se colocó en la estufa durante 24 horas para estabilizar los fitocostituyentes de la droga en estudio. ⁽³⁾⁽⁴⁾⁽¹⁷⁾

Se realizó el Tamizaje Fitoquímico de la hoja y del extracto por reflujo observándose presencia de alcaloides, ya que dió un precipitado con los reactivos de Mayer, Wagner y Dragendorf, presentando reacción positiva con los tres reactivos. ⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

Para la determinación de Flavonoides en las hojas de *Bixa orellana* se utilizó la reacción de Shinoda; el cual consiste en que el magnesio metálico es oxidado por el HCl concentrado, dando como productos al H₂, que es eliminado en forma de gas, y al MgCl₂ que es el que forma complejos con los flavonoides dando coloraciones características. El magnesio divalente intensifica la coloración por estar doblemente coordinado, dando así reacción positiva con la presencia de coloración rosado claro, este resultado es un indicativo de que puede tener una buena capacidad antioxidante, dependiendo de la concentración de flavonoides y de otros polifenoles presentes en la especie; Como reporta (Harbone JB 1975, Li PV 1999) la especie *Bixa orellana* contribuye al efecto antiinflamatorio por contener flavonoides, taninos, esteroides, lo cual esta corroborado en el presente análisis. ⁽¹⁷⁾⁽²⁴⁾⁽³⁵⁾

Además se encontró la presencia de leucoantocianidinas, Triterpenos/esteroles, Polifenoles, Taninos, presentando reacción positiva con su respectivo reactivo, lo cual esta corroborado por Harbone, 1975 y Ahmad. *et.al.*, (2006). ⁽³⁵⁾

En la Tabla 02 se observa que 100 g de hojas de *Bixa orellana* contienen 1.15g de flavonoides totales expresados como quercetina, resultado obtenido por el programa Microsoft Excel 2007 de Microsoft Office para la realización del análisis estadístico correspondiente (media Aritmética y desviación estándar). La

cuantificación se llevó a cabo mediante espectrofotometría UV/Visible a 256nm (longitud de onda de máxima absorción) la cual fue determinada con la solución patrón de 8 ppm.

Como características generales de estos compuestos debemos señalar su solubilidad en agua y metanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados; de allí el fundamento por el cual se identificó en el extracto acuoso y metanol y no en el extracto diclorometánico.⁽³³⁾

La especie que se estudia no existe reporte bibliográfico científico del cual regirse para llegar a certeras conclusiones.

V. CONCLUSIONES

1. Se encontró metabolitos activos tales como, alcaloides, antocianidinas, flavonoides, taninos, triterpernos y esteroides
2. Las hojas secas de *Bixa orellana* presenta 1,15% de flavonoides totales expresados en quercetina.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda seguir con los estudios de las hojas de *Bixa orellana*, hasta separar los fitoconstituyentes importantes que se encuentran en las hojas y en el extracto por reflujo.
- Realizar estudios del mismo tipo en las diferentes estaciones del año, para una comparación de las concentraciones y los fitoconstituyentes.
- Realizar estudios de las hojas de *Bixa orellana* de diferentes lugares de nuestra región.
- Realizar estudios que demuestren la acción farmacológica de los fitoconstituyentes de las hojas de *Bixa orellana*.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Hernández R. Plantas Medicinales. 1ª ed. Ed. Árbol Editorial. México, 1981. Págs. 7-8.
2. Sosa R. El Poder Medicinal de las Plantas. 1ª ed. Ed. ACES. 1998. Tomo I, págs.12-13
3. Miranda M. Farmacognosia y Productos Naturales. Ed Félix Varela. Ciudad de La Habana, Cuba. 2002. págs.13-14, 68 – 73, 135 – 141, 261-280.
4. Kuklinski C. Farmacognosia. Ed. Omega, S.A. Barcelona, España. 2000. págs. 120-130
5. Villar del Fresno A. Farmacognosia General. 1ª ed. Ed. Síntesis. Barcelona, España. 2001.págs. 145-160.
6. Cabieses F. Apuntes de medicina Tradicional. Consejo nacional de ciencia y tecnología (CONCYTEC). Lima, Perú. 1993.págs. 7-8
7. De Pascuale A. Phramcognosy. The oldest modern science. Journal of ethnopharmacology. 1984.vol. 11: 1-16.
8. Cañigueral S.,Vila R. Fitoterapia: concepto y límites. Fuente de información en Fitoterapia: Vademécum de prescripción (A. Arteché, ed.), 3ª Edición, Masson, Barcelona. 1998. págs. 23-30.
9. Cañigueral S., Vila R. Principios de la Fitoterapia, en Plantas medicinales y Fitoterapia, Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid. 2001. vol. 1, págs. 173- 193.
10. Akerele O. The best of Both Worlds: Bringing Traditional Medicine up to date. Soc. Sci. Med. 1987. vol. 24, issue2 : 177-181
11. Morin J.,Bastide P. Aromatherapy. PharmacieHospitaliereFrancaise. 1983. vol. 63: 23-28
12. Arango G. Aspectos Básicos de Farmacognosia curso de farmacognosia y fitoquímica. Universidad de Antioquia. Medellín, Abril. 2009. págs. 8 – 19.
13. Font Quer P. Plantas medicinales. 2ª ed. Ed. Labor, S.A. España. 1985. págs.7-10
14. Bruneton J. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia, 1ª ed. ED. Acribia, S.A. España. 1986. págs. 68-69.

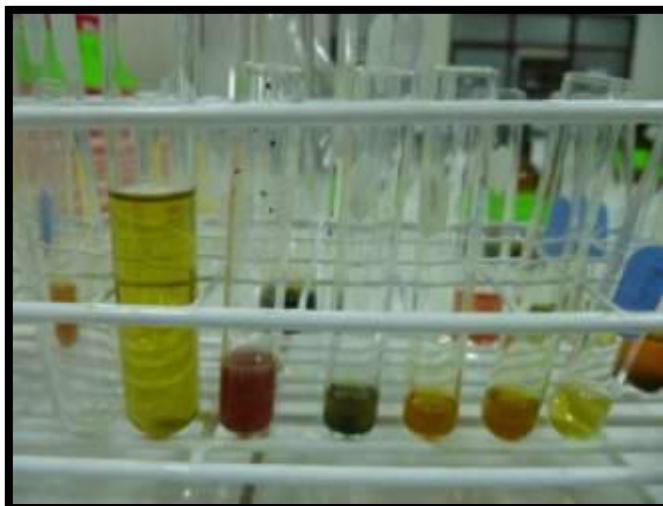
15. Bruneton J. Farmacognosia Fitoquímica de plantas medicinales, 1ª ed. ED. Acribia, S.A. España. 2001. págs. 68-69.
16. Evans C. Tratado de Farmacognosia. 12ª ed. ED. Interamericana. España. 1989. págs. 89-102
17. Lock O. Investigación Fitoquímica. Pontifica Universidad católica del Perú. Fondo Editorial. 1994.págs. 1-9, 114-121
18. Marinoff M. Las Plantas Medicinales desde la Biblia a la Actualidad. [online]: Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y tecnológicas. E-053. 2006. [Citado el 5 de Febrero 2013]. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas/2006-E-053.pdf>
19. Cañigual S. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? [online] Lat. Am. J. Pharm. (3): 265-78. 2003. [Citado el 5 de Febrero 2013]. Disponible en: http://www.latamjpharm.org/trabajos/22/3/LAJOP_22_3_6_1_S966JS548J.pdf
20. Li P. El Futuro de los Productos Andinos en la Región Alta y los Valles Centrales de los Andes/Plantas Medicinales. [online]. Ministerio de Producción. [Citado el 25 de Febrero del 2013]. Disponible en: http://www.unido.org/fileadmin/import/69934_PERU_Informe_final_plantas_medicinales_2vf.pdf
21. Missouri Botanical Garden (MBG) The Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. Trópicos® [Base de Datos en Internet] Saint Louis (MO): MBG; 2009 [Citado el 25 de Febrero del 2013]. Disponible en: http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast
22. AkereleO.. The best of Both Worlds: Bringing Traditional Medicine up to date. Soc. Sci. Med.,Vol 24, issue 1987. p : 177-181
23. Silva H, Ríos F; Instituto de Medicina Tradicional (IMET)-Instituto Peruano de Seguridad Social (IPSS). *Bixa Orellana* L. Un Antiinflamatorio Milenario. Iquitos: IMET-IPSS; 1996. p. 24-33, 44-45
24. Miranda M. Manual de prácticas de laboratorio. Universidad de la Habana. Cuba. 2002. págs. 70-110.

25. Martínez A. Flavonoides. Curso de farmacognosia y fitoquímica. Universidad de Antioquia. Medellín, Setiembre 2006. págs. 7 – 49.
26. García M. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales.[online]. Universidad Autónoma de Querétaro. [Citado el 25 de Febrero del 2013]. Disponible en: http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf
27. Boncun B., Zari G., Ruiz S. Guía de Práctica de Farmacobotánica. 1 ed. Ed Multicopias. Trujillo-Perú. 2011. págs.: 38-42
28. Avalos J, Florian M, Zari G: Estudios Morfohistológico e identificación de los fitoconstituyentes del extracto acuoso de las hojas, flores y fruto de la especie *Vicia faba* L. Disponible en la Biblioteca de la Facultad de Farmacia y Bioquímica la Universidad Nacional de Trujillo.
29. Vidaurre M., Querevalu G., De Los Ríos E., Ruiz S. Características Farmacognósticas de las hojas de *Capparis vicennifolia*. *Rev. Med. Vallejana*. [online]. 2007, vol.4, no.2 [Citado el 25 de Febrero del 2013], págs.121-131. Disponible en: http://revistas.concytec.gob.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-20752007000200004&lng=es&nrm=iso. ISSN 1817-2075.
30. Enríquez A., Prieto E., De Los Ríos E., Ruiz S. Estudio Farmacognóstico y Fitoquímico del rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe "Jengibre" de la ciudad de Chanchamayo - Región Junín. Perú. *Rev. Med. Vallejana*. [online]. 2008. vol.5, no.1 [Citado el 27 de Febrero del 2013].págs.50-64. Disponible en: http://revistas.concytec.gob.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-20752008000100007&lng=es&nrm=iso. ISSN 1817-2075.
31. Ministerio de Economía, Industria y Comercio. Costa Rica. Oficina Nacional de Normas y Unidades de Medida: Bebidas alcohólicas destiladas: determinación de cenizas, método gravimétrico. [Online] 2001 [Citado el 27 de Febrero del 2013]. Disponible en: <http://www.metabase.net/docs/meic/07389.html>. 000127/ONNUM.

32. Vargas Pacheco “análisis de flavonoides en plantas medicinales del sur de Chile con técnica de HPLC [Citado el 27 de Febrero del 2013]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fcv288a/pdf/fcv288a.pdf>
33. Chávez M., Eustaquio C. Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morindacitrifolia* L. noni y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. 2010. Disponible en la Biblioteca de la Facultad de Farmacia y Bioquímica la Universidad Nacional de Trujillo.
34. Acevedo E, De la Cruz R. Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el decocto e infuso de hojas de *Theasinensis* L. te verde y negro. 2011. Disponible en la Biblioteca de la Facultad de Farmacia y Bioquímica la Universidad Nacional de Trujillo.
35. Harborne, J.B., 1975. Flavonoid bisulfates and their co-occurrences with ellagic acid in the Bixaceae, Frankeniaceae, and related families. *Phytochemistry* 14, 1331–1337.

VIII. ANEXOS

ANEXO 01: Estudio Fitoquímico Preliminar



Tamizaje Fitoquímico
del extracto por reflujo de *Bixa orellana*



Tamizaje Fitoquímico
de la hoja de *Bixa orellana*

ANEXO 02: Preparación del extracto fluido de *Bixa orellana*



Recolección de la muestra



Selección de la muestra

Estabilización de la muestra



Molienda y Tamizado



P esado de la muestra



Extracción de flavonoides por reflujo



Hidrolisis de azúcares



Filtración por bomba al vacío



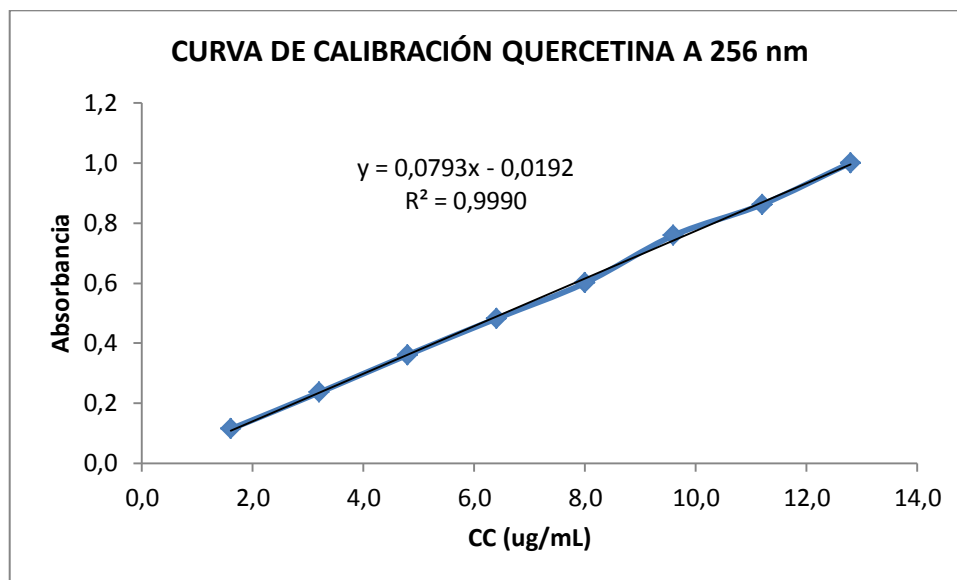
Secar el filtrado a temperatura ambiente



Realizar las lecturas en el espectrofotómetro UV/Visible



ANEXO 03: Curva de calibración con el patrón Quercetina a 256 nm.



BIBLIOTECA DE FARMACIA Y B

ANEXO 04: Cuantificación de Flavonoides Totales del extracto por reflujo de *Bixa orellana*, mediante espectrofotometría UV- visible.

N°	MUESTRA 1	MUESTRA 2
1	0.72449	0.68127
2	0.72527	0.68069
3	0.72453	0.68216
4	0.72446	0.68121
5	0.72450	0.68127
6	0.72470	0.68102
7	0.72542	0.68120
8	0.72621	0.68123
9	0.72678	0.68172
10	0.72661	0.68138
11	0.72707	0.68196
12	0.72717	0.68195
Promedio	0.72560	0.68142
mg/5 g	61.1	57.4
g/5g	0.0611	0.0574
% (P/P)	1.2	1.1