

Artículo original

Actividad antioxidante y garrapaticida de los extractos de las hojas de *Bixa orellana* L.

Antioxidant and tick control activity of the extracts of the leaves of *Bixa orellana* L.

Chacón Arian¹, Morillo Marielba^{1*}, Rondón María², Hernández Vanessa², Carmona Juan², Visbal Tomás¹.

¹Departamento de Ciencia de Los Alimentos, ²Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, 5101, Mérida Venezuela.

Recibido: enero de 2021 –Aceptado: marzo de 2021

RESUMEN

Bixa orellana L. (Bixaceae), es una especie usada con fines ornamentales y terapéuticos. A partir de sus semillas se extrae el colorante conocido como “onoto” ampliamente empleado en culinaria. El objetivo de esta investigación fue estudiar la composición química, actividad antioxidante y garrapaticida de los extractos de las hojas de esta especie, recolectada en el estado Táchira, Venezuela. El análisis fitoquímico preliminar mostró la presencia de esteroides en los extractos hexanoico y diclorometanoico, alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos en el extracto etanólico. El extracto etanólico presentó un contenido fenólico total de 0,89 µg ÁG/mg, por el método de Folin-Ciocalteu, usando espectrometría UV/visible a 760 nm. La actividad antioxidante fue determinada empleando el método de DPPH a 517 nm, siendo el extracto etanólico el más activo mostrando un IC₅₀ de 0,26 mg/mL, con un porcentaje de inhibición (% I) de 87,1 a la concentración de 0,75 mg/mL, mientras que el extracto diclorometanoico IC₅₀ 0,87 mg/mL y % I 31,0 a la misma concentración, comparado con 96,1 % del ácido ascórbico a 0,176 mg/mL. Además, se evaluó la actividad garrapaticida del extracto etanólico por el método de prueba de paquete de larvas, demostrando que no hubo actividad frente a las larvas de *R. microplus*, ya que no evidenciaron mortalidad. Cabe destacar que este

es el primer reporte de actividad antioxidante y garrapaticida de los extractos de las hojas de *B. orellana* L., recolectada en Venezuela.

PALABRAS CLAVE

Bixa orellana L., Bixaceae, actividad antioxidante, actividad garrapaticida, *Rhipicephalus microplus*.

ABSTRACT

Bixa orellana L. (Bixaceae) species has been used as ornaments and for therapeutic purposes. The colour known as “onoto” is extracted from the seeds and is widely used in culinary. The aim of this research was to study the chemical composition, antioxidant and tick control activity of the extracts obtained from leaves of this specie, collected in Táchira, Venezuela. Preliminary phytochemical studies showed the presence of sterols in hexanoic and dichloromethane extracts, while alkaloids, sterols and phenolic compounds were observed in the ethanolic extract. A total phenolic content of 0.89 µg ÁG/mg for Folin-Ciocalteu was observed in the ethanolic extract through spectrophotometry UV-visible at a wavelength of 760 nm. The antioxidant activity was determined using the DPPH method at 517 nm. the ethanolic extract was the most active since it showed an IC₅₀ of 0.26 mg/mL, inhibition

percentages (% I) was 87.1 at the concentration of 0.75 mg/mL, while dichloromethane extract showed an IC₅₀ of 0.87 mg/mL and 31.0 % to the same concentration compared to 96.1% of the ascorbic acid, used as a positive control, at the concentration of 0.176 mg/mL. In addition, the tick control activity of the ethanolic extract was evaluated by the larval packet test method, showing that there was no activity against the *R. microplus* larvae. This is the first report of antioxidant and tick control activity from the extracts of the leaves of *B. orellana* L, collected in Venezuela.

KEY WORDS

Bixa orellana L, Bixaceae, antioxidant activity, tick control activity, *Rhipicephalus microplus*.

INTRODUCCIÓN

Bixaceae es una familia pantropical originaria del Continente Americano, se distribuye desde México hasta Brasil y Argentina. En la actualidad, se cultiva extensamente en otras regiones tropicales y sub tropicales [1,2]. Algunos autores consideran que esta familia, agrupa plantas perennes y comprende 25 especies distribuidas en cuatro géneros: *Amoreuxia*, *Bixa*, *Cochlospermum*, *Diegodendron* [3]. El género *Bixa* es originario de América tropical, está representado por pequeños y grandes árboles, formado por las especies *B. orellana*, *B. arborea*, *B. excelsa*, *B. platycarpa*. Una especie ampliamente cultivada es *B. orellana* L. [3], las otras especies están restringidas a bosques de tierras bajas [4]. Estas tienen como características porte leñoso, son arbustivas o arbóreas con látex rojo anaranjado [5].

En Venezuela, la especie *B. orellana* L., es una planta doméstica, que se siembra en los patios de las casas con fines ornamentales y en cercas o pequeñas parcelas para la obtención de colorante para uso familiar [6]. De esta especie se extrae un colorante soluble en agua, con muy baja toxicidad para el humano, reportándose escasos incidentes de eventos alérgicos. Este pigmento se extrae de las semillas de la planta, está compuesto básicamente por carotenoides (bixina, norbixina), que se emplea

con preferencia para colorear alimentos y bebidas [7].

En cuanto a la composición química reportada para esta especie se encontró que los pigmentos más abundantes son los apocarotenos: bixina, norbixina e isobixina. También están presentes otros carotenoides: orellina, β -caroteno (provitamina A), luteína, criptoxantina y zeaxantina [8].

Según Shahid-ul-Islam y cols. (2016) [9], existen reportes de varios investigadores, que indican que se han logrado aislar e identificar 46 componentes químicos presentes en la semilla, corteza de las semillas y hojas de *B. orellana* L., que incluyen carotenoides, apocarotenoides, esteroides, compuestos alifáticos, monoterpénos, sesquiterpénos, triterpénos y otros compuestos misceláneos.

Stringheta y cols. (2018) [10], indicaron que Bixina [6'-metil hidrógeno (9'Z)-cis-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato] es un diapocarotenoide, principalmente presente en las semillas de *B. orellana* L., representando al menos el 80 % del carotenoide total presente en las mismas [9,11]. Bixina, es el metil éster del ácido dicarboxílico de norbixina y es el pigmento presente en "Paprika", una especia utilizada en América del Sur [12], es soluble en soluciones alcalinas concentradas, donde sufre saponificación, mientras que la norbixina y sus sales son el pigmento principal y es soluble en agua [13].

De Oliveira Júnior y cols., (2019) [14], lograron aislar trece (13) componentes químicos de la semilla seca de esta especie. Estos compuestos son: naringenina, ácido 6,8'-diapocaroteno-6,8'-dioico, *E*-norbixina, ácido eicosatrienoico, ácido 6,7'-diapocaroteno-6,7'-dioico, *Z*-norbixina, *E*-bixina, *Z*-bixina, geranilgeraniol, metil-bixina, ácido β -12'-apo-carotenoico, α -tocotrienol y γ -tocotrienol.

El uso terapéutico que se le atribuye a esta especie es muy variado y depende de la parte que se va a utilizar, se emplea las semillas para tratar bronquitis, hemorroides, en quemaduras, antidiarreico, antiemético, antidiabético y expectorante [15]. La raíz es considerada antidisentérica, antivenérea e hipoglucemiante y las hojas son usadas como desinflamatorio bucal, diurético, antiinflamatorio prostático. En la medicina popular venezolana se emplean las hojas

en decocción para curar las enfermedades del hígado y limpiar la sangre, como refrescante, en el dolor de muela y de cabeza [5]. A los apocarotenos (bixina, norbixina e isobixina) se le atribuyen varias propiedades farmacológicas, pero no se les ha demostrado acción antimalárica [8].

El objetivo de esta investigación fue determinar la composición química cualitativa, contenido de polifenoles totales, actividad antioxidante y garrapaticida, de los extractos de las hojas de *B. orellana* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal: La especie *B. orellana* L. fue recolectada en el sector “Las Flores”, Municipio Ayacucho, Parroquia San Juan de Colón, estado Táchira, a una altitud de 802 m s. n. m. La identificación botánica la realizó el Ingeniero Forestal Juan Carmona, adscrito al Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes (ULA). Una muestra bajo el voucher N° 05 de fecha 30 de septiembre de 2017, quedó depositada en el Herbario MERF Dr. José L. Ruiz Terán, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes.

Obtención de los extractos de las hojas de *B. orellana* L.: Las hojas secas y molidas (100 g) se maceraron por 48 horas con hexano, a temperatura ambiente, posteriormente, se filtró y se llevó a total sequedad empleando un rotavapor IKA RV 10 digital a 45 °C, este procedimiento se repitió tres veces y luego se cambió el solvente a diclorometano y finalmente a etanol, siguiendo el mismo procedimiento para cada uno, finalmente los extractos fueron almacenados en frascos herméticamente tapados, previamente tarados y rotulados, se procedió a la identificación de los metabolitos secundarios, a través de pruebas específicas.

Estudio fitoquímico preliminar: Para la caracterización química de los metabolitos secundarios presentes en los extractos hexanoico, diclorometanoico y etanólico, de las hojas de *B. orellana* L. se efectuó una serie de pruebas

químicas cualitativas siguiendo la metodología descrita por Marcano y Hasegawa (2002) [16].

Determinación del contenido de polifenoles totales: La determinación del contenido de fenoles totales se realizó a través del método Folin-Ciocalteu a pH básico. Todos los reactivos químicos utilizados, incluyendo los disolventes fueron de grado analítico. El reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), la absorbancia se midió en un Espectrofotómetro UV-Visible (Spectronic GENESYS TM 10 Bio) a 760 nm. La determinación de fenoles totales en el extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L., es considerado un valor arbitrario, ya que se relaciona la absorbancia de la muestra con la absorbancia del fenol estándar a través de sus respectivas curvas de calibración. Se determina de acuerdo a la ecuación obtenida a partir de la curva de calibración del ácido gálico ($y = ax + b$). Las cantidades reportadas, se expresarán como μg equivalentes de ácido gálico por mg de extracto [17].

Actividad antioxidante método DPPH: Todos los reactivos químicos utilizados, incluyendo los disolventes fueron de grado analítico. El reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) de Sigma-Aldrich, el ácido ascórbico y metanol marca Merck. Se utilizó un Espectrofotómetro UV-Visible (Spectronic GENESYS TM 10 Bio) a 517 nm, para evaluar el comportamiento de los extractos como agentes antioxidantes.

La evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos hexanoico, diclorometanoico y etanólico de las hojas de *B. orellana*, se realizó siguiendo el ensayo del test de actividad secuestrante de radicales libres del DPPH, según la metodología descrita [18, 19, 20, 21, 22].

Esta técnica consistió en preparar una solución stock de cada uno de los extractos, tomando 4 mg de cada uno, en tubos eppendorf y se disolvieron en 1 mL de metanol, el ensayo se realizó por triplicado para cada uno de los extractos. Para tal fin, se prepararon 3 tubos de cada uno, que contenía 700 μL de DPPH (6×10^{-2} mM) y 300 μL del extracto, se dejó en reposo en la oscuridad por 30 minutos. Pasado los 30 minutos se procedió a medir la absorbancia a 517 nm. Con cada uno de los extractos que presentaron un porcentaje de inhibición (% I) del radical DPPH igual o superior

a 50 % a 4 mg/mL, se preparó una solución madre de concentración de 1 mg/mL y a partir de la misma se prepararon varias diluciones (0,75; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 mg/mL) y se procedió a determinar la actividad antioxidante. Se realizó una curva patrón con ácido ascórbico, partiendo de una solución madre con una concentración de 1 mM (17,6 mg en 100 mL de metanol). El porcentaje de inhibición (% I) de radicales libres de DPPH•, se calculó mediante la siguiente ecuación: $\%I = [(A_{DPPH} - A_{Extracto}) / A_{DPPH}] \times 100$. La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) se determinó por regresión lineal para cada muestra en función de la concentración del analito [18, 19, 20, 21, 22].

Concentración eficiente 50 (IC₅₀) en mg/mL (n=3) de los extractos etanólicos y diclorometanoicos de las hojas de *B. orellana* L.: La determinación de IC₅₀ (mg/mL) de los extractos etanólico y diclorometanoico de las hojas de esta especie se calculó a partir de la ecuación de la recta $y = ax + b$, donde “a” es la pendiente; “b” la intersección de corte en la recta, $y = 50$ y $x = IC_{50}$ [23].

Determinación de la actividad garrapaticida por el método Prueba de Paquete de Larvas (PPL) [24].

Recolección de los parásitos en el ganado vacuno: Las garrapatas del ganado, fueron recolectadas el 12 de julio de 2019, en la finca del “señor Humberto Belandria”, ubicada en Chiguará, estado Mérida (Municipio Sucre, a una altitud de 840 m.s.n.m. y una temperatura promedio de 28 °C) a 40 minutos de la ciudad de Mérida y a 15 minutos de la ciudad de El Vigía. Para tal fin se tomaron 30 garrapatas adultas ingurgitadas, directamente del animal, se colocaron en un frasco de vidrio limpio, seco y con tapa perforada y se trasladaron al laboratorio.

Identificación del parásito: La especie de garrapata utilizada en esta investigación fue identificada por el Prof. Antonio Ascensão del Laboratorio de Biodiversidad de Artrópodos, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, ULA. Su nombre científico es *Rhipicephalus microplus*, de la Familia Ixodidae-Argasidae.

Inmovilización de la garrapata: Las garrapatas recolectadas (30 en total) fueron colocadas en placas de vidrio e inmovilizadas con cinta adhesiva (Figura 1).



Fig. 1. Garrapatas adultas ingurgitadas, sobre la cinta adhesiva. Foto: Vanessa Hernández

Obtención de los huevos: Tras la incubación de las garrapatas en una cabina de vidrio durante 18 días a 26 °C, con humedad de ± 85 %, ocurrió la ovoposición (Figura 2). La masa de huevos de *R. microplus*, se recolectó en tubos de ensayo que se sellaron con cantidad suficiente de algodón para no permitir la fuga de las larvas, fueron llevados a incubación nuevamente bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad, por 21 días.



Fig. 2. Ovoposición de *R. microplus*. Foto: Vanessa Hernández

Obtención de las larvas: Luego de la eclosión de los huevos se dejaron madurar las larvas de *R. microplus*, por 14 días más (Figura 3).



Fig. 3. Larvas de *R. microplus*, observadas a través de la lupa estereoscópica. Foto: Vanessa Hernández

Preparación del extracto: El extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L. al 20 %, se preparó con una solución de tween 80 (2 %).

Control positivo y control negativo: Se prepararon tres placas de Petri del control negativo

(Solución Tween 80 al 2 % en agua destilada) y tres placas para el control positivo Ivermectina al 0,1 % (diluida con agua destilada). Con una pipeta automática se procedió a impregnar los papeles filtro, dentro de las placas identificadas, con 2 mL de la concentración correspondiente del extracto de las hojas. Posteriormente se colocaron sobre el papel filtro, aproximadamente entre 100-120 larvas por placa (con un pincel), las placas se sellaron herméticamente utilizando cinta adhesiva.

Todas las placas (extracto y controles) fueron colocadas en una cámara de vidrio, en las mismas condiciones de temperatura y humedad explicadas anteriormente y se esperó 24 horas para hacer el conteo de las larvas muertas y vivas utilizando una lupa estereoscópica y pinzas entomológicas.

En caso de que el extracto llegara a mostrar actividad, se prepararían, 5 diluciones más del mismo a 10; 5; 2,5; 1,25 y 0,625 %, usando el mismo control positivo y negativo, se probaría la actividad garrapaticida por triplicado, siguiendo el mismo procedimiento.

Para la determinación del porcentaje (%) de mortalidad: Se consideran larvas muertas aquellas que no caminan ni mueve sus patas cuando son

estimuladas con la pinza entomológica. Se cuenta el número de larvas muertas y el total de larvas por placa utilizando una lupa estereoscópica y pinzas entomológicas, se calcula la mortalidad corregida con la fórmula de Abbott [25].

Estudio estadístico: Los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistic editor de datos, versión 21 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU). Con la finalidad de determinar diferencias estadísticas en cada uno de los analitos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, como valores de media (n=3) y desviación estándar (DE).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se llevó a cabo una serie de pruebas para determinar cualitativamente los compuestos químicos presentes en los diferentes extractos de las hojas de *B. orellana* L., que permitieron comprobar en los extractos hexanoico y diclorometanoico la presencia de esteroides y en el extracto etanólico, alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos (Tabla 1).

Tabla 1.
Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de las hojas de *B. orellana* L.

Metabolitos Secundarios	Reacción de coloración o precipitación	EH	ED	EE
Alcaloides	Dragendorff			+++
	Wagner			+++
	Mayer			+++
Esteroides	Liebermann-Burchard	+++	+++	+++
Terpenos		-	-	-
Compuestos fenólicos	Fe Cl ₃	-	-	+++
Flavonoides	Shinoda	-	-	-
Saponinas	Prueba de la espuma	-	-	-
Taninos	Prueba de gelatina	-	-	-
Cumarinas	NH ₄ OH/Luz UV	-	-	-
Quinonas	Prueba NH ₄ OH	-	-	-

+++ abundante, ++ moderado, + escaso, - ausente. EH: Extracto hexanoico, ED: Extracto diclorometanoico; EE: Extracto etanólico.

Los resultados obtenidos en este estudio, coinciden, con lo reportado por Padro y cols., (2017) [26], quienes determinaron la composición química en la tintura al 10 % de *B. orellana* L. recolectada en Cuba y lograron identificar alcaloides, esteroides y fenoles, sin embargo, difieren con este estudio, en algunos compuestos químicos como, cumarinas, saponinas, flavonoides, triterpenos y taninos.

Por otra parte, Shahid-ul-Islam y cols., (2016) [9], mencionaron 46 compuestos químicos, aislados e identificados por otros investigadores, de diferentes partes de la especie *B. orellana* L., entre los que se encontraban, carotenoides, terpenoides, compuestos volátiles y otros compuestos, como esteroides, flavonoides y polifenoles. En esta investigación se identificaron cualitativamente, esteroides, compuestos fenólicos y alcaloides pero no flavonoides.

De igual manera Muñoz (2015) [27], determinó la composición de metabolitos secundarios presentes en las hojas de *B. orellana* L., los resultados obtenidos, coinciden con este aporte, en la presencia de alcaloides y esteroides, sin embargo, difieren en algunos metabolitos secundarios como, triterpenos, flavonoides, saponinas y taninos, los cuales están ausentes en los extractos.

Las diferencias observadas al comparar este trabajo con el de otros investigadores pueden deberse tanto a los factores climáticos como fisiológicos de la planta, se conoce que determinados rangos de temperatura, luz, precipitaciones intervienen directamente en la germinación, crecimiento y desarrollo de las

plantas y que estos factores no se comportan por igual para todas, ni durante todo su ciclo de vida [28]. Debido a que, en los diferentes estudios realizados por otros investigadores, muestran diferentes composiciones químicas de *B. orellana* L., recolectada en diferentes partes del mundo donde hay características ambientales diferentes a Venezuela, podría ser este, un factor a tomar en cuenta, que explicaría la diferencia en cuanto a la composición química.

Según Waterman y Mole (1994) [29], el contenido de metabolitos secundarios está influenciado por la velocidad de crecimiento, la madurez, la condición nutricional del suelo, la depredación y las enfermedades. Así mismo Santacoloma y Granados (2012) [30], afirmaron que la aparición de los metabolitos secundarios está relacionada con los mecanismos de defensa de la planta y los efectos del suelo y del clima

Curva de calibración del ácido gálico: En la determinación del contenido de compuestos fenólicos del extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L., las curvas de calibración del ácido gálico, se realizaron por triplicado, y las correspondientes ecuaciones de la recta ($y = 0,0251X - 0,1211$ $R^2 = 0,9944$; $y = 0,024X - 0,0707$ $R^2 = 0,9951$; $y = 0,0229X - 0,0204$ $R^2 = 0,9957$), se emplearon para cuantificar el contenido total de fenoles en la muestra analizada. Los valores de absorbancia del extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L., fueron reemplazados en la ecuación. En este estudio, el contenido de fenoles totales del extracto etanólico, se corresponde a $0,89 \pm 0,07$ $\mu\text{g AG/mg}$ de extracto seco (Tabla 2).

Tabla 2.

Cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L

Extracto	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia 760 nm			[] $\mu\text{g AG/mg}$ de extracto seco			[] $\mu\text{g AG/mg}$ de extracto seco \pm DE
		λ_1	λ_2	λ_3	C ₁	C ₂	C ₃	
Etanólico	50	1,137	1,135	1,136	0,89	0,81	0,97	$0,89 \pm 0,07$

AG = ácido gálico; No existen diferencias estadísticamente significativa entre datos ($p > 0,05$), con un nivel de confianza de 95%

Ul Islam y cols. (2011) [31] reportaron un contenido de fenoles totales, en el extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* Linn, recolectada en Bangladesh, de 99,99 mg de AG/g de extracto (99,99 $\mu\text{g/mg}$ de extracto), un valor muy por

encima al reportado en este trabajo de investigación.

Guimet (2012) [32], evaluó la concentración de polifenoles totales, del extracto de las hojas de ocho morfotipos de esta especie, recolectados en Perú, obteniendo valores entre $43,45 \pm 0,52$ mg de

catequina (CTQ)/100g y $48,72 \pm 0,36$ mg CTQ/100g. Este estudio no puede ser comparado de forma objetiva con esta investigación ya que los investigadores utilizaron catequina como patrón y no ácido gálico.

Los metabolitos secundarios varían de acuerdo a la edad de la planta, demostrando que el estado de desarrollo de ésta afecta la biosíntesis y acumulación de estos compuestos químicos, siendo las hojas jóvenes maduras las que secretan mayor cantidad de ellos, de esta manera puede afectar la producción y acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides [33].

Otro factor que influye en la variedad de compuestos fenólicos producidos por la planta, es la disponibilidad de nutrientes, por ejemplo, el estrés producido por nitrógeno provoca la expresión de genes de la ruta de los flavonoides, mientras que para el caso de la disponibilidad de nitrato la ruta directamente afectada es la de los fenilpropanoides (Sousa y cols., 2008) [34].

Las diferencias en la síntesis de metabolitos secundarios como flavonoides, terpenos y fenoles, podrían deberse a que en la mayoría de los ecosistemas existen grandes diferencias meteorológicas a lo largo del año e interanualmente (Valares, 2011) [35]. Factores ambientales como temperatura y luz son desencadenantes de las vías biosintéticas, de manera que las concentraciones de compuestos fenólicos se incrementan cuando las plantas están expuestas a la luz solar [36].

Actividad antioxidante de los extractos de las hojas de *B. orellana* L.

Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH: Los resultados de la determinación del porcentaje de inhibición (% I) del radical DPPH, de los diferentes extractos a una concentración de 4 mg/mL (barrido inicial), se muestran en la Figura 4.

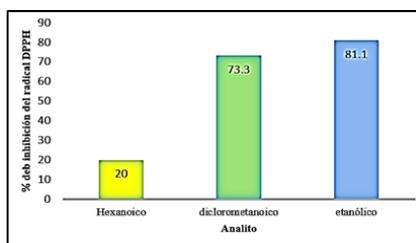


Fig. 4. % de inhibición del radical DPPH de los extractos de las hojas de *B. orellana* L. a 4 mg/mL.

Porcentaje de inhibición del extracto etanólico y diclorometanoico, de las hojas de *B. orellana* L.:

La actividad antioxidante se determinó en los extractos etanólico y diclorometanoico de las hojas de esta especie. En la Figura 5 se muestra la comparación de % I de los extractos etanólico y diclorometanoico de las hojas de la especie en relación a las diferentes concentraciones.

En base a los datos obtenidos, se puede inferir que el extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L. presentó una mayor actividad antioxidante, con % I por encima del 50 % con respecto al % I del extracto diclorometanoico en todas las concentraciones (Figura 5).

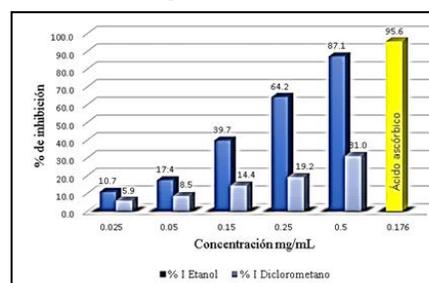


Fig. 5. Porcentaje de inhibición (%I) de los extractos etanólico y diclorometanoico de las hojas de *B. orellana* L.

Concentración eficiente 50 (IC₅₀) en mg/mL (n=3) de los extractos etanólico y diclorometanoico de las hojas de *B. orellana* L.:

En este estudio, el extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L. mostró un IC₅₀ de 0,26 mg/mL y el extracto diclorometanoico 0,87 mg/mL (Figura 6).

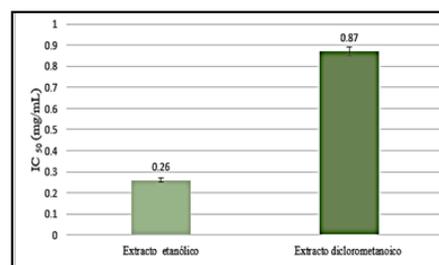


Fig. 6. IC₅₀ de los extractos etanólico y diclorometanoico, de las hojas de *B. orellana* L.

Los resultados de IC₅₀ encontrados en esta investigación, difiere de lo reportado por Meñaca y cols. (2018) [37], quienes evaluaron la actividad antioxidante a través del método DPPH, de los extractos de las semillas de *B. orellana* L,

recolectadas en el Jardín Botánico de Tuluá, Valle del Cauca, Colombia, encontrando que estos extractos que fueron obtenidos a través de fluidos supercríticos (CO₂), presentaron una IC₅₀ de 23,5; 28,8; 37,2; 81,1 y 193,8 µg/mL; Ul Islam y cols. (2011) [31] reportaron un IC₅₀ de 13 µg/mL, en el extracto acuoso de las hojas de *B. orellana* Linn, recolectada en Bangladesh, mientras que en este estudio los valores de IC₅₀, fueron 0,26 mg/mL (260 µg/mL) para el extracto etanólico y 0,87 mg/mL (870 µg/mL) para el diclorometanoico. Es decir, los extractos en esta investigación mostraron una menor actividad antioxidante.

Abayomi y cols. [38] determinaron la actividad antioxidante con DPPH del extracto del colorante obtenido de *B. orellana*, recolectada en Jamaica; el material vegetal fue extraído utilizando un protocolo ácido-base, obteniendo % I del radical DPPH entre 5% a 48,9% (a concentraciones entre 0,25 y 2,5 µg/mL), estos resultados estuvieron por encima de los resultados conseguidos para el extracto etanólico en el presente trabajo que se encontraron entre 64,2 y 87,1 % a concentraciones de 0,25 y 0,5 mg/mL respectivamente.

Estas diferencias pueden deberse a varios factores que influyen en la concentración de metabolitos secundarios con actividad antioxidante en la planta como son: Variedad del fruto, lugar de la cosecha, altura y condiciones del suelo, parte de la planta estudiada, clima. De igual forma, la luz, es posiblemente el factor de mayor significación, ya que está estrechamente relacionada con la temperatura, varía con la estación del año y juega un papel importante en la producción de metabolitos activos [28, 39].

Actividad garrapaticida del extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L. contra *R. microplus*, a través del método Prueba de Paquete de Larvas (PPL): La actividad garrapaticida del extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L. sobre *R. microplus* se realizó por triplicado (n=3), a través del método de Prueba de Paquete de Larvas (PPL) [24]. Se pudo evidenciar a través de este método que no se observó mortalidad, es decir todas las larvas sobrevivieron al tratamiento con el extracto etanólico de las hojas al 20 %, en solución acuosa de Tween 80 (2 %) (Tabla 3).

Tabla 3.

Resultados de la supervivencia de las larvas de *R. microplus*, tratada con el extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L. al 20%, en solución acuosa de Tween 80 al 2%.

Muestra	% de Mortalidad		
	M ₁	M ₂	M ₃
Extracto etanólico	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0
Sol Tween 80 (2%)	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0
Ivermectina 0,1 %	100±0,0	100±0,0	100 ±0,0

M_{1,2,3}= muestras. Las determinaciones se realizaron por triplicado (n=3), los resultados se muestran cómo % mortalidad ± DE

De acuerdo a los resultados obtenidos, el extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L. no mostró actividad sobre las larvas de *R. microplus*, es decir, resultó ser inocuo, obteniendo 100 % de supervivencia de las mismas (Tabla 3).

Se ha evaluado la actividad garrapaticida en extractos de aproximadamente 55 especies de plantas pertenecientes a 26 familias, recolectadas en diferentes regiones del mundo contra *R. microplus* [39]. Entre las especies reportadas con actividad garrapaticida tenemos: *Trachyspermum ammi* [40]; *Melia azedarach* [41]; *Azadirachta indica* [42]; *Palicourea marcgravii* [43]; *Manilkara zapota* [44] entre otras, sin embargo, no se ha reportado hasta la actualidad el uso de la especie *B. orellana* L. para el control de *R. microplus*.

Es importante mencionar que Dimas (2011) [45], relacionó la mortalidad de larvas de *R. microplus*, con una saponina llamada sapotoxina. Se ha demostrado que las saponinas, estimulan la penetración de compuestos tóxicos en las células generando una acción sinérgica [46,47].

En esta investigación, el extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L., no mostró presencia de saponinas, taninos ni otros metabolitos a los que se les haya reportado actividad garrapaticida, ni tampoco presentó actividad contra las larvas de *R. microplus*, se podría inferir que la ausencia de estos metabolitos secundarios podría ser el origen de este resultado.

Sin embargo, a esta especie si se le ha atribuido otras propiedades medicinales en animales domésticos, como en el hongo de cerdos y aves [48], en la coriza infecciosa de las gallinas, producida por *A. paragallinarum* [49]. Estos reportes condujeron a tratar de probar la efectividad del extracto polar de las hojas de esta planta sobre la larva de la garrapata del ganado vacuno, que

tantas pérdidas económicas causan en Venezuela, Latinoamérica y el resto del mundo. Sin embargo, no se logró demostrar actividad sobre las mismas.

CONCLUSIONES

Los extractos hexanoico y diclorometanoico de las hojas de *B. orellana* L. mostraron la presencia de esteroides y el extracto etanólico, alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos. El contenido de fenoles totales del extracto etanólico es 0,89 µg AG/mg.

Los extractos etanólico y diclorometanoico, presentaron una concentración inhibitoria (IC₅₀) de 0,26 mg/mL y 0,87 mg/mL y el % I del radical DPPH fue de 87,1 y 31,0 respectivamente a la concentración de 0,75 mg/mL.

El extracto etanólico de hojas de esta especie no mostró actividad sobre las larvas de la garrapata del ganado (*R. microplus*), ya que estas tuvieron un porcentaje de supervivencia de 100 % después del tratamiento.

AGRADECIMIENTOS

Los autores reconocen y agradecen al Instituto de Investigaciones, Departamento de Ciencia de Los Alimentos y Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA. (Mérida, Venezuela), por el apoyo brindado para finalizar con éxito esta investigación. Al Prof. Antonio Ascensão del Laboratorio de Biodiversidad de Artrópodos, Departamento de Biología. Facultad de Ciencias, ULA, por realizar la identificación de la especie de garrapata utilizada en esta investigación. A la Ing. Yesenia Pérez por la colaboración prestada en la obtención de los extractos de la especie en estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Jiménez D. El achiote, *Bixa orellana* Linn. Fam. Bixaceae. Rev. Inst. Def. Café de C. R. 1947; 155-156 (23): 361-367.
 [2] Little EL, Dixon RG. Árboles comunes de la provincia de Esmeraldas, Ecuador, Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, Organización

de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. Roma. 1969.

[3] Rivera D, Flores E. Morfología floral del achiote, *Bixa orellana* L. (Bixaceae). Rev Biol. Trop. 1988; 36(2B): 499-509.

[4] Zuloaga FO, Morrone O, Belgrano MJ. Bixaceae. Cochlospermaceae. Catálogo de las Plantas vasculares del Cono Sur, Missouri (Eds). Botanical Garden Press: St. Luis, Missouri, USA.1627. 2008.

[5] Leal F, Clavijo C. Acerca de la historia, taxonomía como botánica y uso de *Bixa orellana* L. Rev. Unell Cienc Tec. 2010; 28, 78-76.

[6] Mazzani E, Marin C, Segovia V. Estudio de la variabilidad existente en la colección de onoto (*Bixa orellana* L.) del CENIAP FONAIAP Venezuela. Rev Fac. Agron. 2000; 17(6): 492-504.

[7] Lourido H, Martínez G. La *Bixa orellana* L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. Rev. Cuba. de Farm. 2010; 44(2): 231-244.

[8] Hamzah J, Skinner-Adams TS, Davis TME. *In vitro* antimalarial activity of retinoids and the influence of selective retinoic acid receptor antagonists. Acta Trop. 2003; 87(3): 345-353.

[9] Shahid-ul-Islam, Rather L, Mohammad F. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications. A review. J Adv Res. 2016; 7: 499-514.

[10] Stringheta PC, Silva PI, Costa AGV. Annatto/Urucum *Bixa orellana*. Exotic Fruits. 2018; 23-30.

[11] Shahid-ul-Islam, Rather L, Shahid M, Khan M, Mohammad F. Study the effect of ammonia post-treatment on color characteristics of annatto-dyed textile substrate using reflectance spectrophotometry. Ind. Crops Prod. 2014; 59: 337-342.

[12] Scotter M, Wilson L, Appleton G, Castle L. Analysis of annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. J Agric Food Chem. 1998; 46: 1031-8.

[13] Stringheta PC, Silva PI. (Org.). Pigmentos do urucum: extração, reações químicas, usos e aplicações. 1. ed. Viçosa-MG: Gráfica e Editora

Suprema, 2008.

[14] De Oliveira Júnior RG, Bonnet A, Braconnier E, Groult H, Prunier G, Beaugeard L, et al. Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 2019; 125: 549-561.

[15] Alamed J, Chaiyasit W, McClements DJ, Decker EA. Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(7): 2969-2976.

[16] Marcano D, Hasegawa M. Fitoquímica Orgánica. 2da Edición. Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico: Caracas, Venezuela, 2002.

[17] Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc.* 2007; 2(4): 875-877.

[18] Goupy P, Hugues M, Boivin P, Amiot M. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.* 1999; 79(12):1625-1634.

[19] Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J Sci Technol.* 2004; 26(2): 211-219.

[20] Díaz L, De Monjito S, Medina A, Meléndez P, Laurence V, Marti-Mestres G. Activity of ethanolic extracts leaves of *Machaerium floribundum* against acne-inducing bacteria, and their cytoprotective and antioxidant effects on fibroblast. *Rev Per Biol.* 2011; 18(2): 153-158.

[21] Plaza CM, Díaz L, Lücking RK, Vizcaya M, Medina GE. Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of lichens from Venezuelan Andes. *JPP Res.* 2014; 2(5):138-147.

[22] Contreras-Moreno B, Díaz L, Celis MT, Rojas J, Méndez L, Rosenzweig LP, Ontiveros J. Actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de *Pimenta racemosa* var. *racemosa* (Mill.) J.W. Moore (Myrtaceae) de Táchira – Venezuela. *Ciencia e Ingeniería.* 2017; 38(3): 1-14.

[23] Malavé MJ, Mendoza Z, Morillo M, Visbal T, Rondón ME, Carmona J. Composición química y

actividad biológica de los extractos de las partes aéreas de *Leonurus japonicus* (Houtt.). *Rev. Fac. Farm.* 2019; 61(Número Especial): 25-35.

[24] Resistance management and integrated parasite control in ruminants-guidelines, module I-Ticks: acaricide resistance-diagnosis, management and prevention. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome; 2014. [Página Web] [Acceso: 10 de octubre de 2019]. Disponible <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/010/ag014e/ag014e05.pdf>

[25] Abbott W. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomology.* 1925; 18: 265-267.

[26] Padro-Rodríguez L, López-González T, Nuviola-Frometa D. Caracterización preliminar de tinturas al 10 % de *Bixa orellana* L. *Rev Cub Quim.* 2017; 29(1): 103-114.

[27] Muñoz L. Estudio farmacológico y cuantificación de flavonoides totales de la hojas de *Bixa orellana* (achiote). Proveniente del Distrito de Usquil Provincia Otuzco región la Libertad. [Tesis de pregrado] Universidad Nacional de Trujillo, Perú; 2015.

[28] Acosta, L. Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 2003; 8(1) [online]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000100008.

[29] Waterman P, Mole S. *Method in ecology. Analysis of phenolic plant metabolites.* Boston, United State: Blackwell Sci; 1994.

[30] Santacoloma VLE, Granados JE. (2012). Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* y algunas propiedades fisicoquímicas del suelo. *RIAA.* 2012; 3(1): 53-62.

[31] Ul Islam SMB, Hossain MK, Gomes I, Gomes DJ, Rahman SR, Rahman MS, Rashid MA. Antimicrobial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities of *Bixa orellana* Linn. *Lat. Am. J. Pharm.* 2011; 30 (6), 1126-1134.

[32] Guimet R. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación de polifenoles totales *in vitro*, de las hojas de ocho morfotipos de *Bixa orellana* L. [Tesis de Pregrado]. Universidad

- Nacional de La Amazonia Peruana, Iquitos-Perú; 2012.
- [33] Cabrera J, Jaramillo C, Dután F, Cun J, García P, Rojas L. Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam. En función de su edad y altura. *Bioagro*. 2017; 29(1): 53-60.
- [34] Sousa C, Pereira D, Pereira J, Bento A, Rodrigues M, Dopico-García S et al. Multivariate analysis of *Trochuda cabbage* (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) phenolics: influence of fertilizers. *J Agr Food Chem*. 2008; 56: 2231-2239.
- [35] Valares C. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. [Tesis de doctorado]. Universidad de Extremadura, Badajoz, España; 2011.
- [36] Jahangir M, Abdel-Farid IB, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. *Environ Exp Bot*. 2009; 67(1): 23-33.
- [37] Meñaca EV, Restrepo J, Colmenares AJ. Actividad antioxidante del complejo de inclusión del extracto de semilla de *Bixa orellana* en β -ciclodextrina obtenido por CO₂. *Vitae (Antioquia)*. 2018; 25(2): 83-91.
- [38] Abayomi M, Adebayo AS, Bennett D, Porter R, Shelly-Campbell J. *In vitro* antioxidant activity of *Bixa orellana* (Annatto) Seed Extract. *J. Appl. Pharm. Sci*. 2014; 4(02), 101-106.
- [39] Borges M, Sousa A, Barbosa D. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2011; 20(2): 89-96.
- [40] Zaman MA, Iqbal Z, Abbas RZ, Khan MN, Muhammad G, Younus M, Ahmed S. *In vitro* and *in vivo* acaricidal activity of a herbal extracts. *Vet Parasitol*. 2012; 186(3-4):431-436.
- [41] Borges LM, Ferri PH, Silva WJ, Silva WC, Silva JG. *In vitro* efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. *Med Vet Entomol*. 2003; 17(2): 228-231.
- [42] Yaguana K. Evaluación *in vitro* de extractos vegetales obtenidos manualmente en el laboratorio de diagnóstico veterinario de la Universidad Nacional de Loja para el Control de garrapatas en bovinos. [Tesis de Pregrado]. Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador; 2016.
- [43] Silva WC, Martins JR de S, Cesio MV, Azevedo JL, et al. Acaricidal activity of *Palicourea marcgravii*, a species from the Amazon forest, on cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol*. 2011; 179(1-3): 189-194.
- [44] Rajakumar G, Abdul-Rahuman A. Acaricidal activity of aqueous extract and synthesized silver nanoparticles from *Manilkara zapota* against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Res Vet Sci*. 2012; 93(1): 303-309.
- [45] Dimas PD. Evaluación *in vitro* de los extractos crudos de *Sapindus saponaria* sobre huevos y larvas *Boophilus microplus*. [Tesis de Pregrado]. Universidad Nacional Agraria De La Selva, Tingo María, Perú; 2011.
- [46] Abreu GOA. Potencial medicinal del género *Sapindus* L. (Sapindaceae) y de la especie *Sapindus saponaria* L. *Rev. Cubana Plantas Med*. 2005; 10(3-4): 1-10.
- [47] Tsuzuki J, Svidzinski T, Shinobu C, Silva L, Rodríguez E, Cortez D, Ferreira L. Actividad antifúngica de los extractos y de saponinas *Sapindus saponaria*. *ABC*. 2007; 79(4): 577-583.
- [48] Burga MP. Identificación de especies de plantas medicinales usadas en la fitoterapia de animales domésticos, en la ciudad de Jenaro herrera, bajo Ucayali, Loreto. Iquitos, Perú. [Tesis de Pregrado]. Universidad Nacional De La Amazonia, Iquitos, Perú; 2016.
- [49] Rodríguez-Vivas RI, Alfonso-Díaz MA, Rodríguez-Arevalo F, Fragosó-Sánchez H, Santamaría VM, Rosario-Cruz R. Prevalence and potential risk factors for organophosphates and pyrethroids resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Vet. Parasitol*. 2006; 136(3-4): 335-342.
- Chacón Arian**, Orcid ID: 0000-0001-6654-9897
- Morillo Marielba**, Orcid ID: 0000-0002-6048-0590
- Rondón María**, Orcid ID: 0000-0002-6048-0590
- Hernández Vanessa**, Orcid ID: 0000-0001-7887-8161
- Carmona Juan**, Orcid ID: 0000-0002-3599-5672
- Visbal Tomás**, Orcid ID: 0000-0003-1644-2228