



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“DR. ALFREDO NICOLÁS USUBILLAGA DEL HIERRO”



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE LAS PARTES AÉREAS DE *Bixa***

orellana L.
www.bdigital.ula.ve

Tesista:

Br. Arian I. Chacón G.

Tutora:

Prof. Marielba Morillo

Mérida, Octubre 2019.

DEDICATORIA

Primeramente a Dios todo poderoso, por darme sabiduría y guiarme en todo momento para poder cumplir una meta más.

A mi madre, por ser esa persona incondicional dándome siempre su apoyo, su amor, por su trabajo, sacrificio y dedicación para ayudarme a salir adelante, por creer en mí y darme la motivación para llegar hasta aquí.

A mi padre, por ser mi ejemplo a seguir, por sus buenas enseñanzas, por su atención y cariño. Gracias por todo el esfuerzo, trabajo y amor.

Especialmente a mi hermano, Jesús Manuel por ser mi alma gemela, por su cariño, su amor, su comprensión, por ser más que mi hermano un amigo fuiste el mejor.

A mi prima Gabriela mi hermana del alma, gracias por sus consejos y su cariño.

A mis hermanos Julio y Lenin por estar presente acompañándome y ayudándome en todo momento, por su cariño y bondad.

A mi sobrino Santiago que con su sonrisa ilumina mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por iluminar mi vida y guiarme en todo momento.

A la Ilustre Universidad de Los Andes, por ser mí casa de estudio y permitirme cumplir esta meta.

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” por prestar su colaboración y ser parte del desarrollo de esta investigación.

Al Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos y al Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Por toda la colaboración brindada que fue fundamental para el desarrollo de esta investigación.

A la Profesora Marielba Morillo, agradezco su orientación, apoyo y paciencia para la elaboración de este trabajo de investigación.

A los profesores. Tomás Visbal, María Eugenia Rondón y Vanesa Hernández por la ayuda y colaboración prestada en este trabajo.

A los jurados, Luis Rojas y Dra. Rosa Aparicio, por su colaboración en esta investigación para mejorarla y enriquecerla.

Al Ing. Juan Carmona por su colaboración en la identificación de la planta usada en la investigación.

Al Prof. Antonio de Ascensão del Departamento de Biología animal. Laboratorio de biodiversidad de artrópodos de la Facultad de Ciencias de la ULA, Mérida, por la identificación de la especie de garrapata utilizada en esta investigación.

A la Ing. Yesenia Pérez, por colaborar en la elaboración de los extractos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE TABLA	Ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiii
RESÚMEN	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	3
Planteamiento del problema	3
Justificación e importancia de la investigación	5
Objetivo de la investigación	6
Objetivo General	6
Objetivo específico	6
Alcances y limitaciones de la investigación	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	8
Trabajos previos	8
Antecedentes históricos o epistemológicos	11
Bases teóricas	12
Familia Bixaceae	12
Características Botánicas de la familia Bixaceae	12
Género <i>Amoreuxia</i>	13

Género <i>Bixa</i>	13
Género <i>Cochlospermum</i>	14
Género <i>Diegodendron</i>	15
<i>Bixa orellana</i> L.	15
Características botánicas de <i>Bixa orellana</i> L.	16
Compuestos químicos reportados en <i>Bixa orellana</i> L.	18
Usos Farmacológicos de <i>Bixa orellana</i> L.	26
Producto natural	27
Metabolitos Secundarios	28
Extractos vegetales	34
Preparación de los extractos	34
Procesos de extracción	35
Extracción con solventes orgánicos	36
Extractos etanólicos	37
Obtención de los extractos	37
Estudio fitoquímico	38
Selección del material	38
Examen químico de las muestras	39
Pruebas químicas de campo	39
Pruebas químicas de laboratorio	39
Determinación del contenido de polifenoles	41
Origen, estructura y distribución de los polifenoles	42
Fundamento del método Folin-Ciocalteu	43

Actividad antioxidante	44
Clasificación de los antioxidantes	45
Principales antioxidantes presentes en la naturaleza	46
Método del DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)	47
Actividad garrapaticida	48
Garrapatas	48
Especies de garrapatas comunes en el ganado de Venezuela	49
Control de garrapatas en Venezuela	49
Resistencia	50
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	51
Características generales de la garrapata del género <i>Boophilus</i>	53
Ciclo biológico de la garrapata del género <i>Boophilus</i>	54
Métodos para determinar la actividad garrapaticida	56
Sistema de variables	57
Hipótesis	60
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	61
Tipo de investigación	61
Diseño de la investigación	61
Población y muestra	61
Recolección del material vegetal	62
Secado y molienda del material vegetal	64
Obtención de los extractos de la <i>Bixa orellana</i> L.	65

Determinación de la Composición química cualitativa a través de las pruebas correspondientes (Tamizaje fitoquímico).	65
Prueba para alcaloides: reacción de Dragendorff, Wagner y Meyer	66
Prueba para fenoles: reacción de Cloruro férrico (FeCl ₃)	66
Prueba para flavonoides: reacción de Shinoda	67
Prueba para taninos: reacción de gelatina	67
Prueba paratriterpenos y/o esteroides: reacción de Lieberman	67
Prueba para saponinas: reacción de espuma	67
Prueba para cumarinas	68
Prueba para quinonas	68
Determinación de los polifenoles totales, a través del método de Folin-Ciocalteu	68
Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)	70
Procedimiento para la determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH, de los extractos de <i>Bixa orellana</i> L.	70
Determinación de la actividad garrapaticida por el método prueba de paquete de larvas (PPL).	73
CAPÍTULO IV. RESULTADO Y DISCUSIÓN	80
Estudio fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	80
Cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	83
Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	88

Determinación de la actividad garrapaticida	100
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	103
Conclusiones	103
Referencias bibliográficas	104

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.	
Tabla	1	Taxonomía de <i>Bixa orellana</i> L.	18
Tabla	2	Compuestos químicos de <i>Bixa orellana</i> L.	20
Tabla	3	Compuestos identificados en <i>Bixa orellana</i> L.a través de análisis UPLC-DAD-MS/MS	24
Tabla	4	Clasificación taxonómica de la garrapata <i>Boophilus microplus</i>	53
Tabla	5	Operacionalización de las variables	58
Tabla	6	Rendimiento de los extractos obtenidos de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	65
Tabla	7	Diferentes concentraciones de ácido gálico, con la que se construyó la curva de calibración	69
Tabla	8	Diluciones del extracto para determinar la actividad antioxidante por el método DPPH	71
Tabla	9	Diluciones empleadas para realizar la curva patrón de ácido ascórbico	72
Tabla	10	Estudio fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	80
Tabla	11	Lectura de absorbancia de las distintas concentraciones de la solución de ácido gálico empleada como patrón	84
Tabla	12	Cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	85
Tabla	13	Estudio estadístico de la cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	86

Tabla	14	Análisis de varianza de la cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	86
Tabla	15	Determinación del potencial antioxidante de los extractos de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L. a una concentración de 4 mg/mL	88
Tabla	16	Curva patrón de ácido ascórbico	90
Tabla	17	Actividad antioxidante de los extractos etanólicos y diclorometanoico de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	91
Tabla	18	IC ₅₀ de los extractos etanólico y diclorometanoico de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	93
Tabla	19	Datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto etanólico, de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	93
Tabla	20	Análisis de varianza ANOVA de una sola vía de la actividad antioxidante del extracto etanólico, de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	95
Tabla	21	Datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto diclorometanoico de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	95
Tabla	22	Análisis de varianza ANOVA, de una sola vía de la actividad antioxidante del extracto diclorometanoico, de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	97
Tabla	23	Porcentaje de mortalidad de la garrapata <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , tratada con el extracto etanólico de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L. al 20 %, en solución acuosa de Tween 80 al 2 %.	100

ÍNDICE DE FIGURA

		Pág.	
Figura	1	Frutos y semillas de <i>Bixa orellana</i> L.	17
Figura	2	Características botánicas de <i>Bixa orellana</i> L.	17
Figura	3	Bixina, sal de norbixina y norbixina	23
Figura	4	Estructura de los compuestos identificados en <i>Bixa orellana</i> L.	25
Figura	5	Actividad farmacológica de <i>Bixa orellana</i> L.	27
Figura	6	Estructura química del alcaloide heroína	28
Figura	7	Estructura química de los triterpenos	29
Figura	8	Estructura química de las saponinas	30
Figura	9	Estructura química de los flavonoides	31
Figura	10	Estructura química de los fenoles	32
Figura	11	Estructura química de las quinonas	32
Figura	12	Estructura química de tanino	33
Figura	13	Estructura química de las cumarinas	34
Figura	14	Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu	43
Figura	15	Reacción química entre el radical DPPH y una especie antioxidante	47
Figura	16	Hembra adulta de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .	52
Figura	17	Recolección de la especie <i>Bixa orellana</i> L.	63
Figura	18	Vaucher de <i>Bixa orellana</i> L.	64
Figura	19	Balanza analítica Denver Instrument XL 3100	64
Figura	20	Baño de maría en la prueba de alcaloides	66

Figura	21	Diluciones de la actividad antioxidante	72
Figura	22	Espectrofotómetro Genesys 10 Bio Thermo Electron Corporation	73
Figura	23	Garrapatas adultas ingurgitadas, sobre la cinta adhesiva	74
Figura	24	Oviposición de huevos	75
Figura	25	Recolección de masa de huevos en tubos de ensayo	75
Figura	26	Larvas de las garrapatas	76
Figura	27	Placas de Petri con papel filtro	76
Figura	28	Control positivo	77
Figura	29	Las larvas sembradas con el extracto	77
Figura	30	Placas de Petri con los extracto en cámara de vidrio	78
Figura	31	Lupa estereoscópica del Laboratorio de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA.	78
Figura	32	Resultados de pruebas cualitativas de tamizaje fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	81

ÍNDICE DE GRÁFICOS

		Pág.	
Gráfico	1	Curvade calibración del ácido gálico	84
Gráfico	2	Porcentaje de inhibición (% I) del ácido ascórbico.	90
Gráfico	3	Porcentaje de inhibición del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	92
Gráfico	4	Porcentaje de inhibición del extracto diclorometanoico de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	94
Gráfico	5	Porcentaje de inhibición (% I) de los extractos etanólico y diclorometanoico de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	96
Gráfico	6	IC ₅₀ de los extractos etanólico y diclorometanoico, de las partes aéreas de <i>Bixa orellana</i> L.	98

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“DR. ALFREDO NICOLÁS USUBILLAGA DEL HIERRO”



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE LAS PARTES AÉREAS DE *Bixa orellana* L.**

Mérida – Venezuela

Trabajo de Grado

Realizado por:

Br. Arian I. Chacón G.

Tutora: Prof. Marielba Morillo

RESÚMEN

Se obtuvieron los extractos hexanóico, diclorometanoico y etanólico, de las partes aéreas de *Bixa orellana* L., perteneciente a la familia Bixaceae, recolectada en el municipio Colón del Estado Táchira, Venezuela. Se determinó la composición química a través de pruebas específicas de laboratorio, donde los extractos hexanóico y diclorometanoico evidenciaron la presencia de esteroides y el etanólico, alcaloides, esteroides y polifenoles. Se realizó la cuantificación de fenoles en el extracto polar, por el método de Folin-Ciocalteu, el contenido de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L., fue de $0,89 \pm 0,07$ μg AG/mg de extracto seco. Además, se determinó la actividad antioxidante de los extractos vegetales de los cuales solo el etanólico y diclorometanoico, presentaron actividad, con un porcentaje de inhibición del radical DPPH de $87,1 \pm 0,1$ y $31,0 \pm 0,1$ % respectivamente, comparado con 96,1 % del ácido ascórbico, así mismo el extracto etanólico presentó un IC_{50} de 0,26 mg/mL y el diclorometanoico 0,89 mg/mL. Por último, se evaluó la actividad garrapaticida por el método de prueba de paquete de larvas, del extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L., demostrando que no hubo actividad frente a las larvas de *Rhipicephalus microplus*, que mostraron, 0 % de mortalidad.

Palabras clave: *Bixa orellana* L, % de inhibición, actividad garrapaticida, *Rhipicephalus microplus*

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, luego al desarrollarse la escritura y con la aparición del papiro como soporte de la misma, se comenzó a recoger la información, convirtiéndose la misma en patrimonio de unos pocos dentro de las sociedades por las cuales ha atravesado la humanidad hasta nuestros días. Esto hizo que se profundizara 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 (Barros y Domínguez, 2013).

En la actualidad, la fitoterapia se ha desarrollado con gran importancia, en el área científica. Esta ciencia está basada en el estudio de las plantas, de las cuales utilizan ramas, semillas y hojas para evaluar las distintas propiedades que cada una posee, con la 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 (Barros y Domínguez, 2013).

Se debe mencionar que entre las familias reconocidas del reino vegetal en plantas medicinales se encuentra la Bixaceae, se caracteriza por ser 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 (Mazzani, Marín y Segovia, 2000).

En Venezuela se encuentra la especie *Bixa orellana* L., la cual es una planta doméstica, que se siembra en los patios de las casas campesinas como planta ornamental y en cercas o pequeñas parcelas para la obtención de colorante para uso familiar (Mazzani y col., 2000). De *Bixa orellana* L. se extrae un colorante soluble en agua, con muy baja toxicidad para el humano, reportándose escasos incidentes de eventos alérgicos (Lourido y Martínez, 2010).

El objetivo de esta investigación es determinar la composición química cualitativa, contenido de polifenoles y la actividad biológica (antioxidante y garrapaticida) de los extractos de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

El trabajo se dividió en cinco capítulos, distribuidos de la siguiente forma. En el capítulo I, se abarca la problemática, justificación, objetivos y la denominación de las variables del estudio. En el capítulo II, se abordan los antecedentes que acompañan el estudio y los fundamentos necesarios para la realización y comprensión de las variables, se establece la hipótesis y la conceptualización de las variables. En el capítulo III, se describe el diseño, metodología, técnicas necesarias para la investigación, además se define la población y la muestra. En el capítulo IV, se presentan los resultados obtenidos durante la investigación, datos estadísticos, gráficas y se discute sobre el significado de cada resultado y en el capítulo V, las conclusiones y recomendaciones.

CAPÍTULO I

El problema

Planteamiento del problema

Las plantas se han utilizado desde siglos como agentes terapéuticos. En nuestro continente americano, los nativos, por su curiosidad innata conocieron los productos naturales, suministrados por la naturaleza. Supieron de muchas plantas nativas de su ambiente natural productos de sustancia que emplearon como digestivos, febrífugos, antiinflamatorios, sedantes, analgésicos, estimulantes entre otros. Hoy día esta práctica terapéutica naturista continúa vigente en nuestros pueblos (Albornoz, 1980).

En las últimas décadas se ha intensificado la investigación científica para extraer y separar sustancias con actividad biológica o terapéutica. Así por ejemplo durante el año 1978, se publicaron en el mundo numerosos trabajos científicos que informaron acerca de unos 6500 productos aislados, de los cuales el 40 % eran desconocidos anteriormente. De este grupo, un 10 %, mostraron ser potenciales agentes terapéuticos (Albornoz, 1980).

De igual manera, las plantas se han utilizado como materia prima para la elaboración de preparaciones tradicionales (infusiones o jugos) usadas para controlar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, resolver problemas de resistencia a microorganismos y los efectos colaterales de algunos antimicrobianos sintéticos (Vera, Pastrana, Fernández y Voña, 2007).

Por consiguiente, las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo, en este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80 % de la población mundial utiliza la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los

tratamientos tradicionales se basan en el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Oliveira, Velázquez y Bermúdez, 2005).

Se debe mencionar que a la especie vegetal *Bixa orellana* L., se le han atribuido muchas propiedades medicinales, tanto a sus hojas como a sus semillas, entre las cuales están: antitumoral, antiinflamatorio, astringente, antiséptico, antibacteriano, antioxidante, expectorante, cicatrizante, febrífugo, fuente de vitaminas, antiacné, antiasmático, en sarampión, viruela y dermatosis, entre otras (Duke, Bogenschutz, y Duke, 2003).

Cabe acotar, que de las semillas de la planta tropical *Bixa orellana* L. se extrae un pigmento que está compuesto básicamente por carotenoides (bixina, norbixina). Por su resistencia a la acción de los agentes químicos, pero no a los efectos del sol, se emplea con preferencia para colorear alimentos y bebidas (Lourido y Martínez, 2010).

Resulta oportuno, referir que los antioxidantes son compuestos que luchan con los radicales libres y ha sido demostrado que inhiben la oxidación del ADN, lo cual es la causa de algunos cánceres. Los antioxidantes en general son sustancias que pueden inhibir o retardar el proceso oxidativo, interfiriendo con la iniciación o propagación de las reacciones en cadena de la auto-oxidación (Quiñones, 2017).

Por otra parte, la infestación por garrapatas en muchos países implica un grave problema que limita la producción agropecuaria, altera la salud de animales productores de alimento, de animales de compañía y quizá en muchas ocasiones también del ser humano (Isea, Rodríguez, y Hernández, 2013). Es por esta razón que se va a determinar el potencial como garrapaticida del extracto polar de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

Ya establecida la situación del problema, la investigación pretende dar respuesta a las siguientes preguntas:

¿Qué metabolitos secundarios, están presentes en las partes aéreas de *Bixa orellana* L. una vez aplicada la técnica de tamizaje fitoquímico?

¿Cuál es el contenido de polifenoles en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.?

¿Cuál es la actividad antioxidante de los componentes químicos presentes en los extractos de las partes aéreas de *Bixa orellana* L., a través del método DPPH?

¿Cuál es la actividad garrapaticida que presentan los componentes químicos presentes en el extracto etanólico las partes aéreas de *Bixa orellana* L.?

Justificación e importancia de la investigación

El empleo de plantas a nivel terapéutico puede registrarse desde tiempos muy remotos, aún cuando no existían documentos escritos ya se utilizaban plantas con fines terapéuticos. La fitoterapia tal como se conoce en la actualidad, es la ciencia del tratamiento de las enfermedades con plantas medicinales, basados tanto en la investigación como en la experiencia popular (Villar y Villavicencio, 2001). De allí, la importancia de las plantas con fines terapéuticos, ya que ofrecen una amplia variedad de principios activos con diversas actividades biológicas, situación que en los últimos años se ha revalorizado en función de los productos naturales, considerados como fuente de sustancias de interés médico, veterinario, cosmético y agroquímico. De igual manera, estas plantas presentan bajo riesgo ante una patología debido a que no causa efectos secundarios y además son de bajo costo.

En este contexto, la determinación de la composición química permitirá correlacionar la presencia de algunos metabolitos secundarios con la actividad biológica de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

Así mismo, se puede referir que los extractos de las partes aéreas de la *Bixa orellana* L. constituyen un coadyuvante natural para la salud debido a sus propiedades curativas. De manera tal, que es empleada en la medicina tradicional como antibacteriana, antioxidante, diurético, antidiarreico, entre otras.

Objetivo de la investigación

Objetivo General

Determinar la composición química y la actividad biológica de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

Objetivos Específicos

- Determinar la composición química de los extractos de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.
- Cuantificar la cantidad de polifenoles presentes en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.
- Evaluar la actividad antioxidante de los componentes químicos presentes en los extractos de las partes aéreas de *Bixa orellana* L., a través del método DPPH.
- Estudiar la actividad garrapaticida que presenta el extracto etanólico, de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Los alcances de esta investigación se relacionan con la profundidad del conocimiento que los investigadores pretenden obtener. En tal sentido, se considera lo puntualizado por quiénes refieren lo siguiente: Si hemos decidido, una vez hecha la revisión de la literatura, que nuestra investigación vale la pena y debemos realizarla, el siguiente paso consiste en visualizar el alcance que tendrá, no se deben considerar los alcances como “tipos” de investigación, ya que, más que ser una clasificación, constituyen un continuo de “causalidad” que puede tener un estudio (Hernández, Fernández y Baptista, 2010).

La presente investigación tiene un alcance de tipo confirmatorio de la composición química, y actividad biológica de los componentes químicos presentes en los extractos de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

Un estudio puede presentar limitaciones, refiriendo que son obstáculos que eventualmente pudieran presentarse durante el desarrollo del estudio y que escapan del control del investigador (Arias, 2012).

En tal sentido en esta investigación se pueden destacar limitaciones en la falta de financiamiento, altos costos de los reactivos de laboratorio para llevar a cabo los análisis químicos dados por la condición actual del país.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

De Oliveira Júnior y col., (2019). Evaluaron el efecto de la bixina, aislada de *Bixa orellana* L., recolectadas en Brasil, en la sensibilización de las células de melanoma humano (A2058) en tratamiento con dacarbazina. En los extractos de semillas de *Bixa orellana* L., identificaron dos nuevos apocarotenoides: Ácido 6,8'-diapocaroteno-6,8'-dioico y Ácido 6,7'-diapocaroteno-6,7'-dioico a través del análisis UPLC-DAD-MS/MS (Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento con detector de matriz de diodos acoplada a espectrometría de masa). En esta investigación los datos sugirieron que la bixina, ejerce actividad intrínseca antimelanoma por mecanismos complementarios a los de la dacarbazina, alentando su uso en terapia combinada para el tratamiento del melanoma cutáneo.

Meñaca, Restrepo y Colmenares (2018). Estudiaron diferentes condiciones de temperatura y presión de extracción por FSC-CO₂ (Fluido supercrítico CO₂), para determinar cuál de estas condiciones permiten obtener un extracto de *Bixa orellana* L. con mayor actividad antioxidante, y evaluaron el efecto de la inclusión en β -ciclodextrina, en la capacidad antioxidante. Se evaluó la actividad antioxidante de los extractos obtenidos mediante el método DPPH, determinando su IC₅₀. El extracto con mayor actividad antioxidante se obtuvo con un IC₅₀ de 23,55 μ g/mL, seguido del extracto II (28,76 μ g/mL), del extracto III (37,23 μ g/mL), del extracto V (81,09 μ g/mL) y del extracto I (193,82 μ g/mL), los cuales presentaron diferencias significativas (P<0,01). Los espectros obtenidos por IR, Barrido de calorimetría diferencial (DSC) y RMN, El valor IC₅₀, del complejo

extracto β -CD fue de 104,84 $\mu\text{g/mL}$, siendo significativamente mayor al valor obtenido para el extracto puro (23,55 $\mu\text{g/mL}$). El extracto de *Bixa orellana* L. con una actividad antioxidante mayor se obtuvo por fluido supercrítico a 5076 psi de presión y 45 °C de temperatura. Las variaciones de los espectros IR, DSC y RMN demuestran la inclusión del extracto en la β -CD, y los valores de IC_{50} indican el efecto protector de la β -CD ante la reacción con el radical DPPH.

Padro, López y Nuviola (2017), realizaron un análisis en Cuba, en el cual determinaron la caracterización preliminar física y fisicoquímica cualitativa de las tinturas al 10 % de *Bixa orellana* L., estas fueron obtenidas a partir de las semillas de dicha especie empleando diferentes métodos de extracción. El análisis capilar mostró una imagen vivamente coloreada, observándose una franja de color naranja, casi lineal, una subfranja de color amarillo, y una banda de color marrón. La determinación de la composición química cualitativa para ambas tinturas mostró un comportamiento muy parecido, evidenciándose la presencia de alcaloides, cumarinas, saponinas, flavonoides, azúcares reductores, triterpenos, esteroides, aminos, aminoácidos, fenoles y taninos.

Sepúlveda, Gómez y Zapata (2016), realizaron un estudio con el objetivo de evaluar el efecto del tiempo de extracción y la relación del solvente sobre el contenido de fenoles totales, así como el efecto del contenido de sólidos y el pH de la solución, sobre la actividad antioxidante del extracto de hojas de *Bixa orellana* L. El contenido total de fenoles fue evaluado por el método de *Folin-Ciocalteu*. Se demostró que la cantidad de fenoles totales extraídos de hojas de *Bixa orellana* L., dependen de la relación solvente-material vegetal y del tiempo de extracción; así mismo, se encontró que el pH tiene efecto

sobre la actividad antioxidante determinada por la reacción con el radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) y la medida de la capacidad reductora sobre el Fe^{+3} .

Muñoz (2015), determinó la composición de fitoconstituyentes presentes en las hojas de *Bixa orellana* L., mediante la reacción de coloración, precipitación y cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales, para tal fin, se preparó el extracto por reflujo y se le determinó a través de tamizaje fitoquímico: Alcaloides, triterpenos, esteroides, antocianidinas, flavonoides, saponinas y taninos. Así mismo se cuantificó los flavonoides totales expresados como quercetina mediante espectrofotometría UV/Visible a 256 nm (longitud de onda de máxima absorción) encontrándose en un porcentaje promedio 1,25 %.

Guimet (2012), evaluó la actividad antioxidante *in vitro* y determinó la concentración de polifenoles totales, de extractos de las hojas de *Bixa orellana* L. en ocho morfotipos existentes en la ciudad. El morfotipo 5 de los ocho morfotipos fue el que presentó mayor porcentaje de inhibición frente al radical DPPH con $86,17 \pm 0,61$ %, y el de menor porcentaje de inhibición fue el morfotipo 3 con $79,90 \pm 1,26$; en cuanto a los polifenoles totales el morfotipo 3 fue el que presentó mayor cantidad de polifenoles totales con $48,72 \pm 0,36$ mg de Catequina (CTQ)/100 g de extracto y el que tuvo menor cantidad de polifenoles totales fue el morfotipo 4 con $43,45 \pm 0,52$ mg de CTQ/100 g de extracto. La correlación entre el promedio de la concentración de polifenoles totales y la capacidad de inhibición al 50 % de los extractos *Bixa orellana* L., en los 8 morfotipos fue negativa porque no existió diferencia estadística significativa.

Fernández, Mendiola, Acuña, Scull y Gutiérrez (2011), evaluaron la actividad antimalárica *in vitro* e *in vivo* de un extracto de *Bixa orellana* L. cultivada en Cuba. El objetivo fue evaluar la actividad antimalárica del extracto hidroalcohólico de semillas de

esta especie, se evaluó *in vitro*. Además, caracterizaron preliminarmente la composición química del extracto por tamizaje fitoquímico, obtuvieron triterpenoides y/o esteroides, alcaloides, compuestos lactónicos, compuestos fenólicos, taninos y flavonoides. Concluyeron que el extracto hidroalcohólico de semillas de *Bixa orellana* L. mostró actividad antimalárica moderada tanto *in vitro* como *in vivo*.

Antecedentes Históricos

Desde la prehistoria se conocen plantas cuyos extractos han sido usados en pócimas o en curaciones, este conocimiento ha sido transmitido de padre a hijo, de brujo a médico, de sacerdote a los aprendices, principalmente de manera verbal (Marcano y Hasegawa, 2002).

El papiro de Ebers, escrito alrededor de 1550 a.C., representa una colección de 800 prescripciones referentes 700 especies de plantas y medicamentos utilizados para la terapia, como la granada, planta de aceite de ricino, aloe, sen, ajo, cebolla, higo, sauce, cilantro, enebro, entre otras. En la historia antigua, el escritor más prominente en drogas vegetales fue Dioscórides, el padre de la farmacognosia, quien estudió las plantas en los sitios donde viajó con el ejército romano de Nerón, este clasificó una serie de plantas domésticas apreciadas, dentro de las cuales se encontraban la salvia y del cual se diferencia un número de especies del género *Menta*, que se cultivaba y se utilizaba para aliviar el dolor de cabeza y dolor de estómago (Petrovska, 2012).

La medicina natural y tradicional forma parte del acervo cultural de la humanidad, y se ha desarrollado en muchos países con características propias, en franca tendencia a los recursos disponibles en ellos, sobre la base, además, de la idiosincrasia de sus habitantes; por tanto, es el resultado de una evolución lenta, pero avalada por la experiencia práctica. El empleo de las plantas para la alimentación del hombre y la curación de diversas

enfermedades, se remonta a la creación del mundo. Esta experiencia fue transmitida de generación en generación, a tal punto, que en la actualidad, en pleno siglo XXI, son denominadas plantas de uso tradicional, lo cual continuará hasta el fin de los tiempos. Al respecto, la medicina herbaria, que también se conoce como medicina botánica, fitoterapia o fitomedicina, es la forma más antigua de atención médica que se ha conocido en la humanidad. En la actualidad existen extensas documentaciones e investigaciones relacionadas con el uso de las plantas para curar diversas enfermedades (Pascual, Pérez, Morales, Castellanos y González, 2014).

Bases Teóricas

Familia: Bixaceae

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. Muchos autores consideran la familia unigenérica y uniespecífica, con una sola especie *Bixa orellana* L. (Rivera y Flores, 1988).

Se cultiva entre las latitudes 250N y 250S a una altitud de 300 a 1000m.s.n.m. El ámbito de temperatura óptimo para su crecimiento oscila entre 24-30 °C.

Características Botánicas de la familia Bixaceae

Caracterizado por poseer arboles pequeños o arbustos, la familia se caracteriza por poseer hojas alternas, simples, enteras, palmatinervias y con estípulas; posee pecíolos largos y pubescentes. Tanto la hojas como el tallo contienen una savia rojiza, las flores son regulares; bisexuales en inflorescencias paniculares con cinco pétalos imbricados y retorcidos en la yema. Los estambres numerosos con filamentos firmes. El fruto es una

capsula con espinas cortas o sin ellas. El fruto contiene espinas numerosas, ovoides con una testa roja, esta testa contiene el colorante amarillo-rojizo (Leal y Clavijo., 2010).

Por otra parte, otros autores consideran que, Bixaceae agrupa plantas perennes, comprende 25 especies en cuatro géneros:

- *Amoreuxia*
- *Bixa*
- *Cochlospermum*
- *Diegodendron* (Rivera y Flores, 1988).

Todas ellas distribuidas en México, pero no limitadas al país (Poppendiek, 1980-1981, Pio y col., 2014).

Género *Amoreuxia*

Abarca cuatro especies a nivel mundial, distribuidas desde el Suroeste de los Estados Unidos de Norteamérica, pasando por Centroamérica y el Caribe, hasta el Norte de Suramérica (Günther, 1986). En Venezuela solo existe *Amoreuxia wrightii* está restringida a pequeñas poblaciones en pantanos estacionales de agua dulce de los alrededores de Coro, Estado Falcón, al Sur del Parque Nacional Médanos de Coro, además se considera como una especie en amenaza de extinción en prácticamente todos los ámbitos locales de su rango de distribución (Castillo, 2009).

Genero *Bixa*

El género *Bixa* es originado de América tropical y cultivado en los trópicos, está representado por pequeños y grandes árboles, una especie ampliamente cultivada, es *Bixa orellana* L., las otras especies están restringidas a bosques de tierras bajas. Estas tienen

como características porte únicamente leñoso, siendo arbustivas o arbóreas con látex rojo anaranjado, hojas alternas simples, inflorescencias en panículas terminales, flores hermafroditas, fruto de tipo capsula ovoidea a esferoidal con apéndice agudo, semillas con testa carnosa (Leal y Clavijo, 2010).

El género *Bixa*, está formado por las siguientes especies:

- *Bixa orellana* L.
- *Bixa arborea*
- *Bixa excelsa*
- *Bixa platycarpa*

Género *Cochlospermum*

Varios representantes de *Cochlospermum*, se usan con propósitos ornamentales, pues son árboles que cuando están desprovistos de hojas tienen a menudo flores llamativas grandes, amarillas. Algunas *Cochlospermaceae* se usan en la medicina vernácula o nativa (Poppendieck, 1980).

Formada por las siguientes especies

- *Cochlospermum angolense*
- *Cochlospermum fraseri*
- *Cochlospermum gillivraei*
- *Cochlospermum intermedium*
- *Cochlospermum noldei*
- *Cochlospermum orinocense*
- *Cochlospermum planchonii*

- *Cochlospermum regium*
- *Cochlospermum religiosum* (L.)
- *Cochlospermum tetraporum*
- *Cochlospermum tinctorium*
- *Cochlospermum vitifolium*.
- *Cochlospermum wittei* (Govaerts, 2019).

Género *Diegodendron*

Es un género monotípico perteneciente a la familia de las bixáceas que tiene una única especie, *Diegodendron humbertii*. Es originaria de Madagascar (Capuron, 1963).

Las familias Cochlospermaceae y Diegodendraceae son incluidas actualmente en la familia Bixaceae soportado por análisis de la secuencia rbcL (Gen cloroplastídico) (Soltis, Soltis, Endress y Chase, 2005).

***Bixa orellana* L.**

Sus nombres comunes son: Axiote, achiote, bija, bijol, urucú, urucum, rocú, annatto, orellana, entre otros.

Es un tinte a base de carotenoides que se extrae de las semillas de la planta tropical *Bixa orellana* L. La etimología del nombre binomial corresponde a *Bixa*, latinización del portugués *bija* que significa “color rojo”, y *orellana*, dedicado al explorador español, *Francisco de Orellana* (Giuliano, Rosati y Bramley, 2003).

Esta especie es originalmente de América tropical (Smith, Williams, Plucknet y Talbot, 1992); Stringheta y Silva 2008), se cultiva en los trópicos de todo el mundo (Ramalho, Pinheiro y Diniz, 1987).

En Brasil, se ha identificado como una planta nativa de los Estados del norte y noroeste, principalmente Amazonas Para, Paraiba, Piaui, Maranhao, Ceará y Bahía.

Características botánicas de Bixa orellana L.

Es un árbol pequeño, generalmente de menos de 6 m, que alcanza hasta 8 m, con un diámetro de 15 a 20 cm en la base del tallo, copa ancha y abundantemente ramificado (Cruz, Da Costa y Otoni, 2008).

Los frutos son ovoides y capsulas aplanadas oval, hemisféricoelipsoide o cónico, que contienen numerosas semillas, rodeado de una pulpa rojiza. Las cápsulas se abren en dos partes iguales y sus colores varían desde marrón oscuro o rojizo a verde o amarillo pálido, según la variedad de plantas (Cruz y col., 2008).

Están densamente cubiertas por espinas flexibles y tienen un promedio de 54 semillas que contienen pigmento. Se produce fructificación en todo el año con un fuerte incremento en invierno. Los frutos maduran a fines del verano y principios del otoño, las semillas son angulares 3 a 4 mm de largo, cubiertas por una sustancia resinosa de color rojo amarillento, que se vuelve seca dura y oscura al madurar. Bixina es el pigmento presente en mayor concentración en la semillas, que presenta más del 80 % del total de carotenoides (Stringheta y Silva, 2008; Costa y col., 2008). En la Figura 1, se muestran los frutos y semillas de *Bixa orellana L.*



Figura 1. Frutos y semillas de *Bixa orellana* L. (Stringheta y Silva, 2008).

La demanda interna es cubierta por importación, debido a que no se le ha prestado atención al cultivo. Cabe destacar que no existen cultivares mejorados, apenas tipos seleccionados. Los agricultores, en su mayoría, cultivan plantas resultantes de mezcla de semillas nativas y provenientes de diferentes zonas del país, encontrándose variaciones evidentes en las características del fruto (Mazzani y col., 2000). En la Figura 2, se muestran las características botánicas de *Bixa orellana* L.



Figura 2. Características botánicas de *Bixa orellana* L. (Shahid-Ul-Islam, Rather, Mohammad, 2016).

Bixa orellana L. tiene importancia económica en América tropical como planta tintórea. Los indios utilizan las semillas del onoto para extraer el color rojo, toman las semillas maduras, que contienen el carotenoide bixina, las colocan en agua caliente y las agitan constantemente hasta que el color pasa al agua, lo dejan asentarse y le dan forma de panecillos, el tinte obtenido lo usan en sus adornos rituales. También lo utilizan para colorear chocolate, queso y guisos (Heywood, 1985). En la Tabla 1, se muestra la taxonomía de *Bixa orellana* L. (Leal y Clavijo, 2010).

Tabla 1.

Taxonomía Bixa orellana L.

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malvales

Familia: Bixaceae

Género: *Bixa*

Especie: *Bixa orellana* L.

Nombre botánico: *Bixa orellana* L.

Parte usada: hoja, flor, pigmento de las semillas.

***Compuestos químicos reportados en Bixa orellana* L.**

Los pigmentos más abundantes son los apocarotenos: Bixina, norbixina e isobixina, para los cuales se describen varias propiedades farmacológicas pero no se les ha demostrado acción antimalárica. También están presentes otros carotenoides: Orellina, β -caroteno (pro-vitamina A), luteína, criptoxantina y zeaxantina (Hamzah, Skinner y Davis, 2003).

Según Shahidul, Luqman y Faqeer (2016), hay muchos constituyentes químicos de *Bixa orellana* L., que incluyen carotenoides, apocarotenoides, esteroides, compuestos alifáticos,

monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos y otros compuestos misceláneos que han sido aislados e identificados de la semilla, corteza de las semillas y hojas de esta planta. En la Tabla 2, se muestran 46 componentes químicos, aislados en diferentes partes de *Bixa orellana* L. Según lo reportado por Shahid-ul-Islam y col. (2016).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 2.

Compuestos químicos de Bixa orellana L.

Numero	Clasificación	Componentes	Parte de la planta	Referencias
(1)	Carotenoides	Metilhidrogeno-(9'Z)-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato (Bixina)	Corteza de la semilla	(Jondiko y Pattenden, 1989)
(2)		Luteína	Semillas	(Tirimanna, 1981)
(3)		Zeaxantina	Semillas	(Tirimanna, 1981)
(4)		Dimetil(9Z,9'Z)-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato	Corteza de semillas	(Jondiko y Pattenden, 1989)
(5)		Norbixina	Semillas	(Scotter, Wilson, Appleton y Castle, 1998)
(6)		Metil (9'Z)-apo-6'-licopeonoato	Corteza de la semilla	(Mercadante, Steck, Rodríguez, Pfander y Britton, 1996)
(7)		Metil-(7Z,9Z,9'Z)-apo-6'-licopeonoato	Corteza de la semilla	(Mercadante y col., 1996)
(8)		Metil-(9Z)-apo-8'-licopeonoato	Corteza de la semilla	(Mercadante y col., 1996)
(9)		Metil-(all-E)-apo-8'-licopeonoato	Corteza de la semilla	(Mercadante y col., 1996)
(10)		Metil-(all-E)-apo-6'-licopeonoato	Corteza de la semilla	(Mercadante y col., 1996)
(11)		Metil (9Z)-10'-oxo-6,10'-diapocaroteno-6-oate	Corteza de la semilla	(Mercadante, Steck y Pfander, 1997)
(12)		Metil (9Z)-6'-oxo-6,5'-diapocaroteno-6-oate	Semillas	(Mercadante y col., 1997)
(13)		Metil (9Z)-6'-oxo-6,6'-diapocaroteno-6-oate	Semillas	(Mercadante y col., 1997)
(14)		Metil-(4Z)-4,8-dimetil-12-oxododecia-1,2,4,6,8,10-pentanoato	Semillas	(Mercadante y col., 1997)
(15)		6-Geranylgeranyl-8'-metil-6,8'-diapocaroteno-6,8'-dioate	Semillas	(Mercadante y col., 1997)
(16)		6-Geranylgeranyl-6'-metil-(9'Z)-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioate	Semillas	(Mercadante y col., 1997)
(17)		6-Geranylgeranyl-6'-metil-(9'Z)-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioate	Semillas	(Mercadante y col., 1999)
(18)		<i>trans</i> -Bixina	Semillas	(Mercadante y col., 1999) (Andersonw, Nair, Chandra y Morrison, 1997)
(19)	Terpenoides	Farnesilacetona	Semillas	(Jondiko y Pattenden, 1989)
(20)		Octadecanoato geranylgeranilo	Semillas	(Jondiko y Pattenden, 1989)
(21)		Formiato geranylgeranilo	Semillas	(Jondiko y Pattenden, 1989)
(22)		δ -tocotrienol	Semillas	(Frega, Mozon y Bocci, 1998)
(23)		β -tocotrienol	Semillas	(Frega y col., 1998)
(24)	Terpenos	β -humuleno	Raíces	Galindo, Lubran y Rankin 2002; 2010)
(25)		α -cariofileno	Hojas y raíces	(Stohs 2014; Galindo y col., 2002; 2010)
(26)		α -Copaeno	Hojas y raíces	(Stohs, 2014)
(27)		α -Elemene	Hojas	(Stohs, 2014)
(28)		<i>cis</i> -ocimene	Hojas	(Schneidere, Aron y Hinman 1965)
(29)		Ácido tomentosico	Raíces	

Tabla 2.

Compuestos químicos de Bixa orellana L.

Numero	Clasificación	Componentes	Parte de la planta	Referencias
(30)	Compuestos volátiles	(Z, E)-Acetato de farnesilo (11,6 %)	Aceite de semilla	(Pino y Correa, 2011)
(31)		Acetato de occidenalol(9,8 %)	Aceite de semilla	(Pino y Correa, 2011)
(32)		Espatulenol (9,6%)	Raíces, semilla	(Pino y Correa, 2011)
(33)			Aceite de semilla	(Pino y Correa, 2011)
(34)	Otros compuestos	Ácido acético	Raíces	(Yong y col., 2013)
(35)		2-Butanamina	Raíces	(Yong y col., 2013)
(36)		Ácido pentanoico	Raíces	(Yong y col., 2013)
(37)		fenol	Raíces	(Yong y col., 2013)
(38)		Pantolactona	Raíces	(Yong y col., 2013)
(39)		Ácido benzoico	Raíces	(Yong y col., 2013)
(40)		Fitol	Hojas	(Raga, Espiritu, Chien y Ragasa, 2011)
(41)		Estigmasterol	Hojas	(Raga y col., 2011)
(42)		Sitosterol	Hojas	(Raga y col., 2011)
(43)		Lecocianidina	Hojas	(Harborne, 1975)
(44)		Ácido elágico	Hojas	(Harborne, 1975)
(45)		Luteolin	Hojas	(Harborne, 1975)
(46)	Apigenina	Hojas	(Harborne, 1975)	

(Shahid-ul-Islam y col. 2016)

www.bdigital.ula.ve

Stringheta, Silva y Costa (2018), indicaron que Bixina (**1**) [6'-metil hidrogeno (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 la semilla (Shahid-UI-Islam y col., 2014; Shahid-UI-Islam y col., 2016).

Bixina, es el pigmento presente en "Paprika", una especie utilizada en América del Sur, y está presente en la preparación de *B. orellana* L. en aceite, mientras que la norbixina y sus sales son el pigmento principal para la preparación de pigmento de *B. orellana* L. soluble en agua (Stringheta y Silva, 2008).

Bixina, es el metil éster del ácido dicarboxílico de norbixina (Scotter y col., 1998), es soluble en soluciones alcalinas concentradas, donde se somete a saponificación, formando la sal de norbixina, esta sal en medio ácido forma el ácido dicarboxílico de norbixina (Stringheta y Silva, 2008). Como se muestra en la Figura 3, bixina (**1**), norbixina (**5**) y sal de norbixina (**47**)

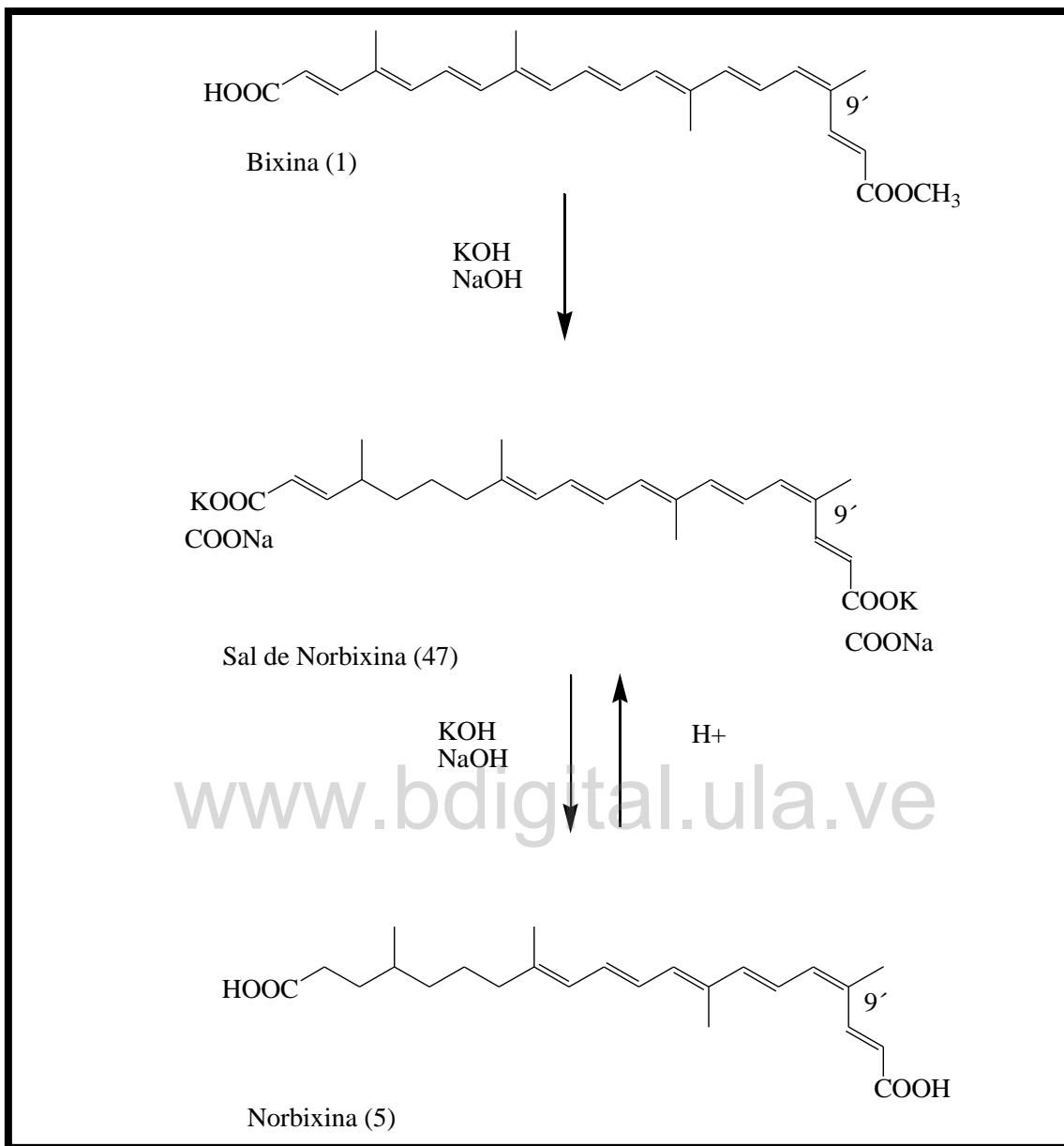


Figura 3. Bixina, sal de norbixina y norbixina (Stringheta y col., 2018)

De Oliveira Júnior y col., (2019). Lograron aislar trece (13) componentes químicos de la semilla seca de *B. orrellana* L., a través de análisis UPLC-DAD-MS/MS (Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento con detector de matriz de diodos acoplada a espectrometría de masa).

En la Tabla 3 y Figura 4, se muestran los nombres y estructuras respectivamente, identificados en los extractos de las semillas de *B. orellana* L. por De Oliveira Júnior y col., (2019).

Tabla 3.
Compuestos identificados en Bixa orellana L.a través de análisis UPLC-DAD-MS/MS (De Oliveira Júnior y col., 2019)

Número	Compuesto
48	Naringenina
49	Ácido 6,8'-diapocaroteno-6,8'-dioico
50	<i>E</i> -norbixina
51	Ácido eicosatrienoico
52	Ácido 6,7'-diapocaroteno-6,7'-dioico
53	<i>Z</i> -norbixina
18	<i>E</i> -bixina
54	<i>Z</i> -bixina
55	Geranilgeraniol
56	Metil-bixina
57	Ácido β -12'-apo-carotenoico
58	δ -tocotrienol
59	γ -tocotrienol

www.bdigital.ula.ve

Usos Farmacológicos de Bixa orellana L.

El uso terapéutico que se atribuye a la planta es muy variado y depende de la parte que se va a utilizar. La información recogida por entrevista, durante la recolección de la muestra y en diversas publicaciones, menciona que se emplea las semillas para tratar bronquitis, hemorroides, enquemaduras, antidiarreico, antiemético, antidiabético y expectorante (Alamed, Chaiyasit, McClements y Decker, 2009). La raíz es considerada antidisentérica, antivenérea e hipoglicemiante y las hojas como desinflamatorio bucal, diurético, antiinflamatorio prostático (que es una de las propiedades más difundida), enfermedades del hígado. En la medicina popular venezolana se emplea las hojas en decocción para curar las enfermedades del hígado y limpiar la sangre. Cuando se las aplica en la frente y sienes actúan como refrescante, en el dolor de muela y de cabeza (Leal y Clavijo, 2010).

En la Figura 5, se muestra en forma resumida la actividad farmacológica de *Bixa orellana L.* según, Shahid-Ul-Islam y col.(2016).

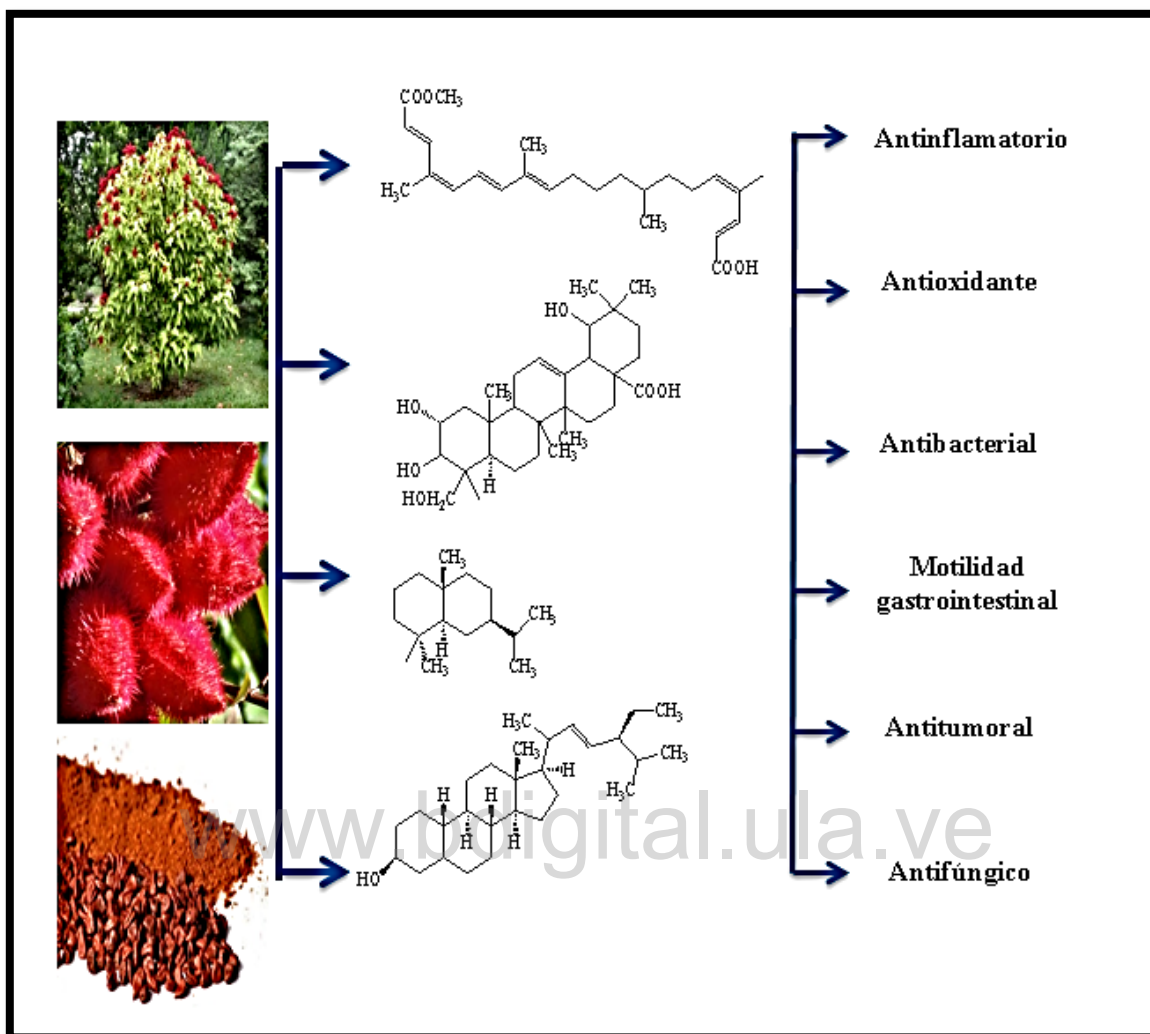


Figura 5. Actividad farmacológica de *Bixa orellana* L. según (Shahid-ul-Islam y col., 2016).

Producto natural

Es aquel que es propio de una especie, se le conoce también como producto químico y en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza, a diferencia de los metabolitos primarios o productos bioquímicos que presentan una utilidad definida y que son comunes a todos los seres vivos (Marcano y Hasegawa, 2002).

Metabolitos secundarios

Las rutas metabólicas básicas constituyen los orígenes del metabolismo secundario de las plantas, dando lugar a una variada serie de compuestos, algunos de estos son responsables de olores, colores de los vegetales, otros son responsables de virtudes culinarias, medicinales o venenosas. Los metabolitos secundarios se acumulan en grandes cantidades en las células vegetales o pueden ser expulsados fuera de éstas (Carrión y García, 2010).

Las plantas producen una gran variedad de compuestos bioactivos y metabolitos secundarios como medio de defensa al ataque de insectos, microorganismos y de adaptación a ambientes adversos (temperatura, humedad, intensidad de luz, sequía, entre otros) (Ramakrishna y Aswathanarayana, 2011).

Alcaloides

Son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica (Ávalo y Pérez, 2009). En la Figura 6, se muestra la estructura química de la heroína (60) que pertenece al grupo de alcaloides.

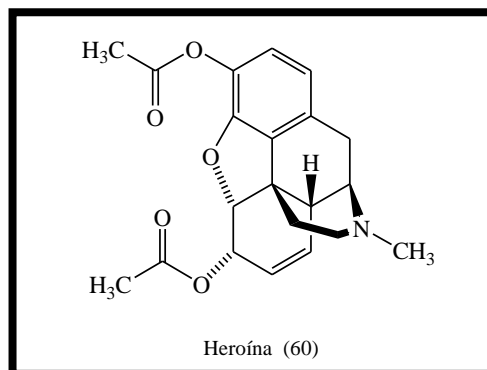


Figura6. Estructura química del alcaloide Heroína (Ávalo y Pérez, 2009).

Triterpenos

Entre los triterpenos, se encuentran esteroides y esterol derivados del escualeno, una molécula de cadena lineal de 30 carbonos de la que derivan todos los triterpenos cíclicos. Los esteroides que contienen un grupo alcohol, y es el caso de casi todos los esteroides vegetales, se denominan esterol. Los más abundantes en plantas son el Estigmasterol y el Sitosterol, que sólo difiere del estigmasterol en la ausencia del doble enlace entre C 22 y C 23 (Ávalos y Pérez, 2009).

En la figura 7, Se muestran las estructuras químicas de fungisterol (61), estigmasterol (41) y sitosterol (42) que pertenecen al grupo de los triterpenos.

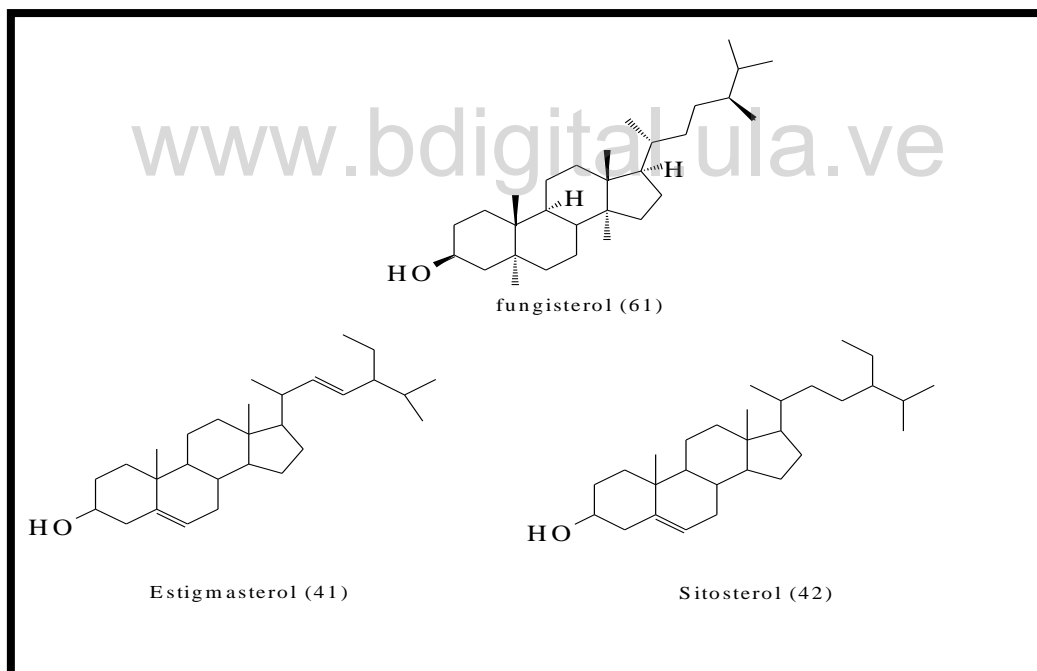


Figura 7. Estructura química de algunos triterpenos (Ávalos y Pérez, 2009).

Saponinas

Son compuestos bioactivos encontrados principalmente en plantas, pero también en algunos organismos marinos e insectos. Las saponinas son metabolitos secundarios que

constituyen una gran familia de compuestos estructuralmente constituidos por un anillo terpenoide o esteroidal, conocidos como aglicona o saponina, sustituidos por oligosacáridos a través de enlaces glucosídicos que les confieren un carácter anfifílico (Heng y col., 2006). En la Figura 8, se muestran las estructuras químicas de la saponina (62) y ácido 3-O-β-D-glucopiranosil oleanólico (63) que pertenecen al grupo de las saponinas.

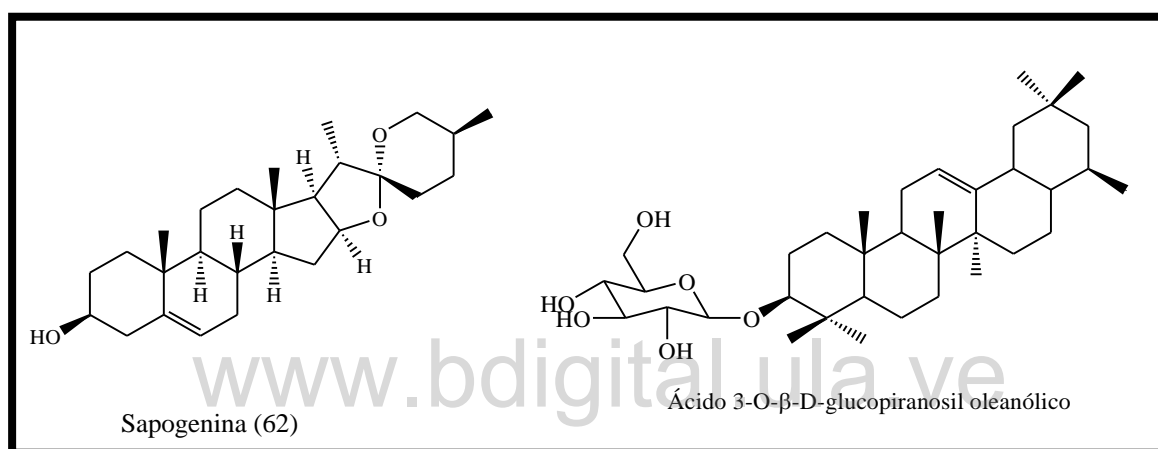


Figura 8. Estructuras químicas de las saponinas (Heng y col., 2006).

Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpirano, compuesto por dos anillos de fenilos ligados a través de un anillo de pirano (heterocíclico) (Martínez, González, Culebras y Tuñón, 2002). En la Figura 9, se muestra las estructuras químicas de

antocianidina (64), flavanona (65) y chalcona(66) que pertenecen al grupo de los flavonoides.

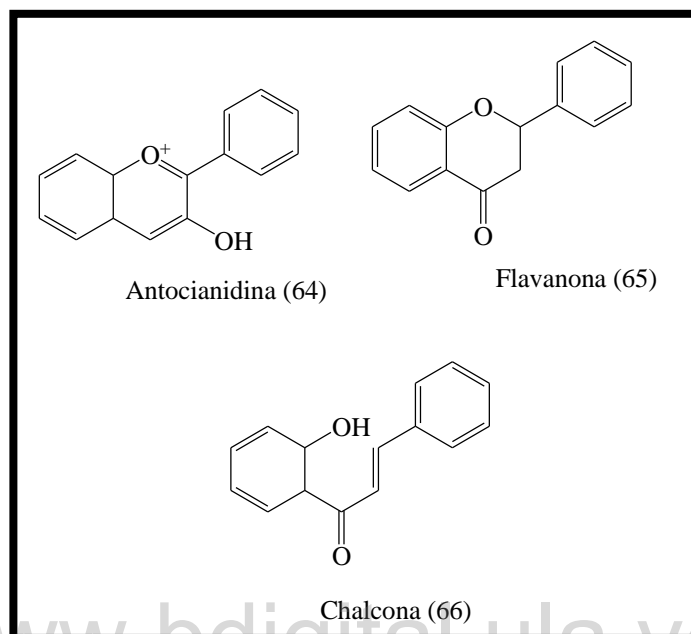


Figura 9. Estructura químicas de algunos Flavonoides (Martínez y col., 2002).

Fenoles

Los compuestos fenólicos son moléculas que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático. Junto con las vitaminas, los compuestos fenólicos se consideran importantes antioxidantes en la dieta, por ejemplo, se encuentran presentes en frutas, hortalizas, raíces y cereales (Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila y Bravo, 2014). En la Figura 10, se muestran las estructuras químicas del ácido cafeico (67) timol (68) que pertenecen al grupo de los fenoles.

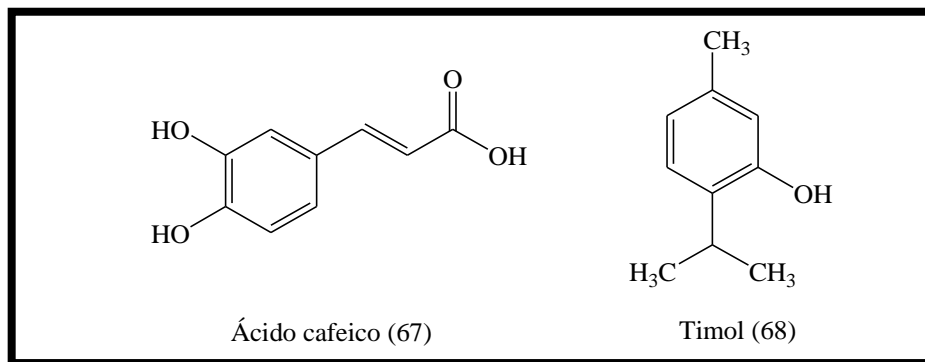


Figura 10. Estructuras químicas de algunos fenoles (Peñarrieta y col., 2014).

Quinonas

Entre los productos naturales, las quinonas están ampliamente representadas, bien sea como núcleo principal de una estructura o formando parte de moléculas complejas aromáticas o aromáticas-alifáticas y a veces diméricas. Las quinonas constituyen un grupo importante de pigmentos vegetales y animales (Marcano y Hasegawa, 2002). En la Figura 11, se muestran las estructuras químicas de *p*-quinona (69), *o*-quinona (70) y pirroloquinolona (71) que pertenecen al grupo de quinonas.

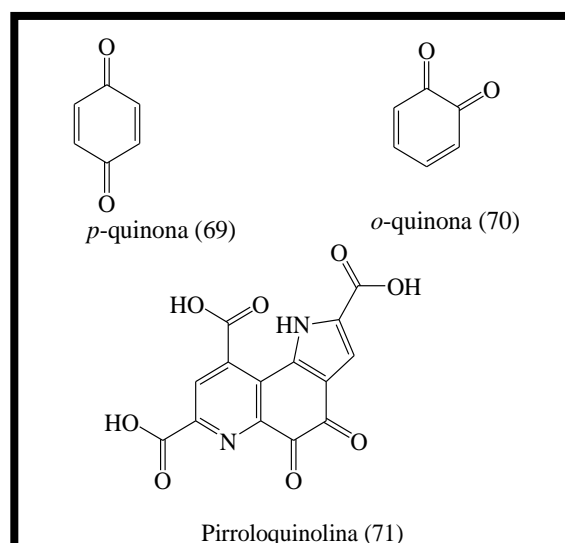


Figura 11. Estructuras químicas de las quinonas (Marcano y Hasegawa, 2002)

Taninos

Son sustancias de origen vegetal, no nitrogenadas de estructura polifenólica, solubles en agua, alcohol y cetona. Estas sustancias son de sabor astringente y tienen la propiedad común de curtir la piel, haciéndola imputrescible e impermeable al fijarse sobre sus proteínas (Domingo y López, 2003). En la Figura 12, se muestra la estructura química de la corilagina (72) que pertenece al grupo de los taninos.

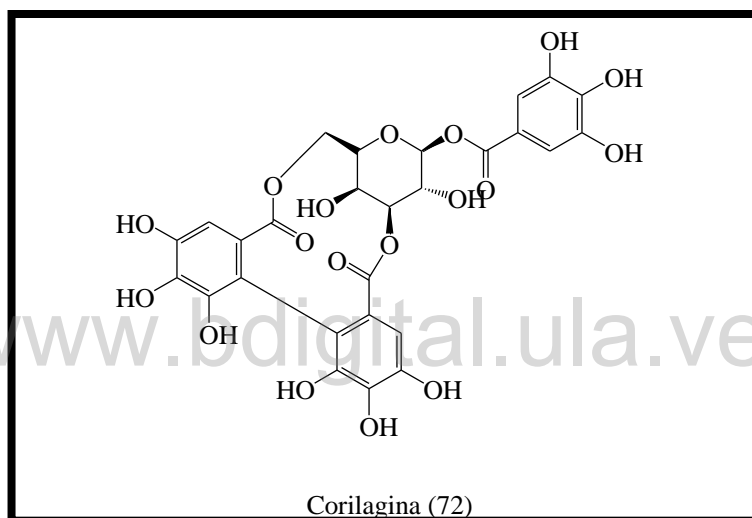


Figura 12. Estructura química de un tanino (Cruz y col., 2001).

Cumarinas

Las cumarinas son una amplia familia de lactonas, más de 1500 identificadas en más de 800 especies de plantas, que actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación (Ávalo y col., 2009). En la Figura 13, se muestran las estructuras químicas de isocumarina (73), dicumarol (74) y psoraleno (75) que pertenecen al grupo de las cumarinas.

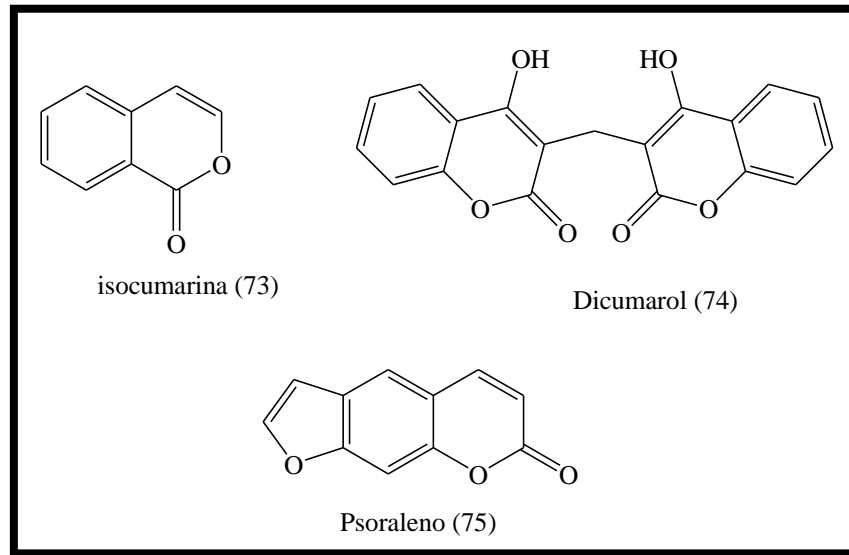


Figura13. Estructuras químicas de las cumarinas (Ávalos y Pérez, 2009).

Extractos vegetales

Son mezclas complejas de metabolitos secundarios, aislados de las plantas por diversos métodos. Cubren un amplio espectro de efectos farmacológicos mostrando diversas propiedades como antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos (Carrión y García, 2010).

Preparación de los extractos

Los extractos son preparados concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia, derivados generalmente de material vegetal desecado, se obtienen al evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal. Los extractos según su consistencia y concentración de principio activo se clasifican en: extractos fluidos, secos, blandos (Carrión y García, 2010).

Extractos Fluidos

Los extractos fluidos son extractos de drogas que con la concentración prescrita de etanol, están preparados de forma que una parte de droga corresponde a una parte o dos

partes del extracto fluido; teniendo en cuenta que 85 partes de droga seca corresponden a 100 partes de planta fresca. Por lo general los extractos fluidos se obtienen por percolación (Carrión y García., 2010).

Extractos secos

Los extractos secos son aquellos que tienen una consistencia seca y son fácilmente pulverizables, se obtienen por evaporación del disolvente y desecación del residuo. Los extractos secos no deben presentar un contenido de humedad mayor del 5% (Voigt, 1982), presentan una concentración muy superior de principio activo que la droga original, son preparados bastante estables (aunque en ocasiones resultan higroscópicos) y de fácil manipulación; como líquido extractor se utiliza alcohol de diversa concentración y agua. Actualmente es posible obtener extractos secos nebulizados, que son más estables que los tradicionales, por ser menos higroscópicos (Carrión y García, 2010).

Extractos blandos

Poseen una concentración de principio activo superior a la de la droga original y tienen consistencia semisólida, el disolvente suele ser agua con mezclas hidroalcohólicas. Los extractos blandos son poco estables y resultan difíciles de manipular; por lo que no se utilizan (Carrión y García, 2010).

Procesos de extracción

Los procesos de extracción más simples empleados se dividen de acuerdo al disolvente utilizado en:

Extracción con agua

Infusión, destilación por arrastre con vapor de agua y decocción.

Extracción con solventes orgánicos

Maceración, lixiviación o percolación, extracción Soxhlet, digestión y por fluido supercrítico. La selección de uno de ellos dependerá de las necesidades y facilidades tanto técnicas como económicas con que se cuenten (González, 2004).

Extracción Soxhlet

Método en caliente, que se desarrolla empleando solventes con puntos de ebullición bajo, para evitar la degradación de la muestra, conveniente para obtener los extractos crudos de las plantas (González, 2004).

Digestión

En este proceso se agrega solvente caliente (con temperaturas no mayores a los 50 °C) al material vegetal molido colocado en un material de vidrio de boca pequeña, la temperatura del solvente permite una mayor extracción de compuestos ya que la solubilidad de la mayoría de las especies aumenta con la temperatura (González, 2004).

Infusión y Decocción

Tanto la infusión como la decocción son procesos simples de extracción con agua, en el primer caso se agrega agua caliente o fría al material molido y luego se filtra; en el segundo el material se hierve por espacio de 15 minutos con el agua (González, 2004).

Selección del solvente

La elección del disolvente depende de parámetros técnicos y económicos como:

Selectividad, estabilidad, inercia química, temperatura de ebullición no demasiado elevada para permitir su eliminación total, no demasiado baja para evitar las pérdidas; seguridad de manipulación (si es posible no tóxico ni inflamable) (González, 2004).

Los disolventes más utilizados son los hidrocarburos alifáticos (hexano, propano o butano líquido) y éter de petróleo. Aunque el benceno es un buen disolvente, su toxicidad limita cada vez más su utilización. Igualmente, se ha recurrido a disolventes halogenados y al etanol. También se utilizan otros solventes como soluciones ácidas o alcalinas para la extracción selectiva de algunos compuestos, sin embargo se debe tener precaución con el pH de las mezclas para prevenir hidrólisis o reordenamiento de compuestos sensibles (González, 2004).

Extractos etanólicos

Extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. Estos procesos pueden ser sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado (González, 2004).

Obtención de los extractos:

Maceración

Es una extracción que se realiza a temperatura ambiente. Consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentada en un solvente (agua o etanol, se prefiere el etanol puesto que a largos tiempos de extracción el agua puede propiciar la fermentación o la formación de mohos) hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no sea atacado con el disolvente; en éste se colocan el material vegetal con el disolvente y tapado se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto (González, 2004).

Percolación

También conocido como lixiviación, es uno de los procesos más difundidos pues se puede realizar con disolventes orgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener el material. Consiste en colocar el material fragmentado en un embudo o recipiente cónico y hacer pasar un disolvente adecuado a través del mismo. No es apropiado para resinas o materiales que se hinchen dado que el disolvente no percolará. Se requiere agregar solvente constantemente (González, 2004).

Estudio fitoquímico

Comprende el estudio de los metabolitos secundarios de origen vegetal y la metodología que se sigue depende de los objetivos de los mismos. Sin embargo, existen etapas comunes que no necesariamente ocurren al mismo tiempo. Las cuales se resumirán a continuación (Marcano y Hasegawa., 2002).

Selección del material

Prueba de actividad biológica

Examen químico de las muestras

Pruebas químicas de campo

Pruebas químicas de laboratorio

Selección de las partes del material a analizar

Métodos de extracción y fraccionamiento

Cromatografía.

Examen químico de las muestras

Pruebas químicas de campo

Es conveniente llevar un “kit de pruebas” durante la recolección que permite hacer los exámenes más sencillos y frecuente en muestras recién cosechadas ocurre a veces que los resultados en el campo no son reproducidos en el laboratorio, cuando el material vegetal no es fresco, como consecuencia de la descomposición promovida por enzimas presentes en el vegetal las pruebas más comunes (Marcano y Hasegawa, 2002).

Alcaloides: El extracto proveniente de la maceración del material con HCl diluido si precipita con reactivo de Meyer o se somete a reacciones de color con reactivo de Dragendorfo ácido yodo platinico.

Saponinas: El extracto acuoso se agita. La aparición de espuma es indicio de estos compuestos.

Tanino: El extracto en NaOH al 10% se trata con unas gotas de solución de gelatina al 1% la presencia de taninos se manifiesta con la precipitación del complejo proteína-tanino.

Flavonoides: El extracto alcohólico se trata con un trozo de Mg y HCl. La formación de una coloración roja es indicativa de flavonoides (Marcano y Hasegawa, 2002).

Pruebas químicas de laboratorio

Las mismas pruebas preliminares de campo hay que repetirlas en el laboratorio, pero en este caso los materiales deben ser aplicados a un extracto un poco más elaborado. Sin embargo, es conveniente efectuar una serie de pruebas rápidas que permiten decidir la estrategia de separación, la evaluación fitoquímica se repite para los grupos principales de sustancias tanto en el vegetal fresco, como en un “crudo” preparado por extracción del material vegetal molido(Marcano y Hasegawa, 2002).

Alcaloides: El crudo se evapora hasta casi sequedad; si durante este proceso se detecta olor de amoníaco o aminas, se evidencia alcaloides que además deben ser inestables. El extracto casi seco se retoma con HCl 10 % y se agita con un solvente inmiscible (diclorometano, cloroformo y acetato de etilo) y éste se separa. La fase acuosa se alcaliniza y se extrae con un solvente inmiscible. Las tres fases se analizan para alcaloides por separado (reactivo de Mayer, Dragendorf y Wagner) lo que permite detectar alcaloides débilmente básicos, básicos y sales cuaternarias de amonio en los tres extractos, respectivamente (Marcano y Hasegawa, 2002).

Saponinas y esteroides: Estas se manifiestan por la formación de una espuma cuando se agita el material vegetal con agua. Esta espuma dificulta la extracción. Una parte del crudo total se hidroliza (HCl 10 % o H₂SO₄ 5 %, reflujo) y el hidrolizado se concentra y se extrae con acetato de etilo o cloroformo.

La fracción orgánica debe contener las saponinas (agliconas de saponinas) y otros materiales no hidrolizables. Tanto el crudo como el extracto orgánico proveniente del hidrólisis, se analiza para esteroides y triterpenos (reacción de Lieberman Bucher).

Los glicósidos se detectan por reacción con una mezcla 1:1 recién preparada, de ácido 3,5-dinitrobenzoico (2 %) y KOH (0,5 N) lo que produce coloración violeta (Marcano y Hasegawa, 2002)

Flavonoides: El crudo total se lleva a sequedad y se desgrasa con éter de petróleo. El residuo se trata con HCl concentrado y virutas de magnesio. El test será positivo para flavonoides si se produce una coloración roja al dejar en reposo la reacción por unos 10 a 20 minutos y una gota del extracto total se absorbe sobre papel de filtro y se rocía con una

mancha fluorescente amarilla bajo luz UV es indicativa de flavonoides (Marcano y Hasegawa, 2002)

Taninos y polifenoles: Los compuestos fenólicos se detectan por la coloración parda que producen en presencia de una solución de cloruro férrico al 1 %. Para ello el extracto total es evaporado a sequedad y filtrado antes de la reacción con cloruro férrico. Si los fenoles están presentes producen una coloración marrón y si al tratar el crudo con solución al 1 % de gelatina en NaCl al 1 %, se produce una precipitación, el crudo contiene taninos (Marcano y Hasegawa, 2002)

Antraquinonas: El crudo total llevado a sequedad, se extrae con KOH (0.5 N), se filtra, se acidifica con ácido acético y se agita con benceno. Si la capa orgánica toma una coloración roja al alcalinizarla con hidróxido de amonio, hay antraquinonas presentes (Marcano y Hasegawa, 2002)

Glicósidos cianógenos: Al material fresco macerado se añaden gotas de cloroformo y se calienta a 50 – 70 °C en tubo cerrados, los vapores se ponen en contacto con un papel de filtro impregnado en una solución al 1 % de ácido pícrico en carbonato de sodio al 10 %. Los compuestos cianógenos se manifiestan como una mancha roja sobre el papel; el tiempo de reacción varia, puede tomar hasta 2 horas (Marcano y Hasegawa, 2002)

Determinación del contenido total de polifenoles:

Los polifenoles (PF) o compuestos fenólicos (CF), son moléculas naturales del metabolismo secundario de las plantas que derivan de las vías de shiquimato y de los fenilpropanoides (Munin y Lévy, 2011).

El contenido de PF en las plantas y frutos tiene variaciones que dependen del genotipo, especie, condiciones ambientales, grado de madurez, composición del suelo, ubicación geográfica y condiciones de almacenamiento (Haminiuk, Maciel, Oviedo y Peralta, 2012).

Además de participar en la función fisiológica de los vegetales; También son componentes importantes de la dieta humana, aunque no se consideran como nutrientes (Procházková, Boušová, y Wilhelmová, 2011).

Origen, estructura y distribución de los polifenoles

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos podemos denominarlos polifenoles. Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales, otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.). Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos (Quiñones, Miguel y Aleixandre, 2012).

En los últimos años numerosos estudios han avalado los efectos beneficiosos de la ingesta de polifenoles sobre la salud, especialmente sobre el sistema cardiovascular. Esto es importante, porque las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo. Los efectos de los polifenoles son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes. Estos compuestos presentan efectos vasodilatadores, son capaces además de mejorar el perfil lipídico y atenúan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Quiñones y col., 2012).

Fundamento del método Folin-Ciocalteu

El ensayo Folin-Ciocalteu, se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra (García, Fernández, y Fuentes, 2015).

El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles. En la Figura 14, se muestra la reacción química del del reactivo de Folin-Ciocalteu y un compuesto fenólico (García y col., 2015).

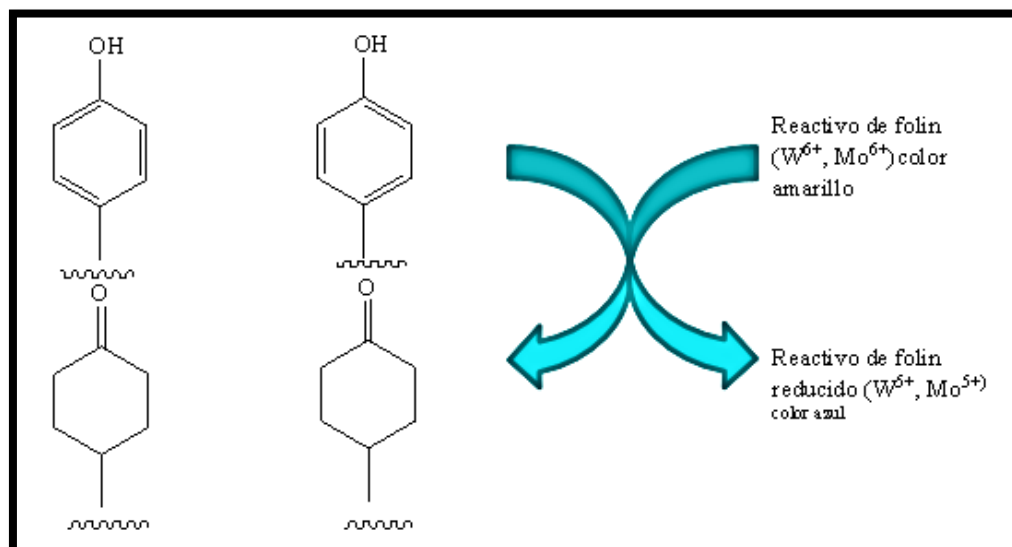


Figura 14. Reacción química del reactivo de Folin-Ciocalteu y un compuesto fenólico (García y col., 2015)

El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total. La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico. Se trata de un método preciso y sensible, que puede padecer numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción (García y col., 2015).

Actividad antioxidante

Los antioxidantes son sustancias que actúan protegiendo al organismo de la acción de los radicales libres, retrasando el proceso de envejecimiento y combatiendo la degeneración y muerte de las células que provocan los mismos. Existen alimentos que contienen una gran variedad de fitonutrientes, muchos de los cuales tienen estas propiedades, además de las bien conocidas, vitamina C, E y los carotenoides (Gutiérrez, Ledesma, Gracia y Grajales, 2007).

Los radicales libres, son la principal amenaza oxidativa de las células, estos radicales pueden ser endógenos y exógenos, pueden inducir un amplio espectro de reacciones nocivas para el organismo animal en especial el ser humano. Sin embargo, existen sustancias que actúan como protectores, que, en conjunto con las moléculas ricas en electrones, que el propio organismo produce pueden contrarrestar los efectos dañinos y estabilizar los radicales libres, dichas sustancias son conocidas como antioxidantes (Bello, 2005).

En los seres vivos, existen sistemas de defensa antioxidante que tienen la propiedad de impedir la acción nociva de los radicales libres, habiéndose identificado compuestos con

propiedades antioxidantes de naturaleza enzimática como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc., así como, sustancias no enzimáticas: ascorbato, ferritina, ceruloplasmina, polifenoles, antocianinas (Guija, Inocente, Ponce, Zarzosa, 2015).

Cuando la defensa antioxidante es insuficiente para proteger al organismo de efectos dañinos de los radicales libres puede conducirlo al estrés oxidativo, condición que está estrechamente vinculado a una gran diversidad de patologías como la psoriasis, cáncer, diabetes mellitus, aterosclerosis, cataratas, hipertensión arterial (Guija y col., 2015).

Clasificación de los antioxidantes.

Los antioxidantes pueden ser clasificados en dos tipos: antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

Antioxidantes enzimáticos: Las células de los tejidos biológicos poseen sistemas enzimáticos que actúan como protectores de la oxidación por medio de la inactivación de sustancias potencialmente oxidativas como las especies reactivas de oxígeno (EROS) dentro de las que se incluyen el O_2 , el H_2O y el OH , inactivando el estado de oxidación de los metales de transición, que son potenciales catalizadores de la oxidación (Martínez y col., 2008).

Entre las enzimas con las actividades antes descritas están la catalasa que cataliza la descomposición de peróxido de hidrogeno (H_2O_2), la superóxidodismutasa que inhibe la oxidación lipídica catalizando la transformación de superóxido (O_2^-), la glutatión peroxidasa que cataliza la reducción de los peróxidos lípidos y el peróxido de hidrogeno por medio de la glucationa y las ferroxidasas que son enzimas catalizadoras de la oxidación del óxido ferroso FeO a férrico Fe_2O_3 (Frontera, Herring, Micheli, y Silver, 2008).

Antioxidantes no enzimáticos: Son un complemento de los enzimáticos que son intracelulares, los antioxidantes no enzimáticos se encargan de compensar a los radicales libres que son liberados o que pertenecen al espacio intracelular; en este grupo se incluye a la vitamina E, el β -caroteno o precursor de la vitamina A y también la vitamina B que forma parte de la enzima glutatión reductasa que regenera al glutatión (Herrerías, Díaz y Jiménez, 1996).

Principales antioxidantes presentes en la naturaleza

Vitamina C: funciona fisiológicamente como un antioxidante soluble en agua, en virtud de su alto poder reductor, es un cofactor para las enzimas involucradas en la biosíntesis de colágeno, carnitina, y neurotransmisores in vitro y esto puede apagar una variedad de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno en ambientes acuosos (Krinsky, Beecher, Burk, Chan, 2000).

Vitamina E: Funciona principalmente como un antioxidante que rompe la cadena que impide la propagación de la peroxidación lipídica. Durante los procesos metabólicos se producen constantemente radicales libres tóxicos y esta vitamina, es capaz de captar estos compuestos y metabolizarlos, por lo que protege las membranas celulares, estructuralmente son compuestos de naturaleza fenólica. Es un antioxidante que rompe la cadena que evita la propagación de reacciones de radicales libres (Packer, 1994).

Carotenoides: Estos compuestos se encuentran ampliamente difundidos en los vegetales, en forma de pigmentos rojos, naranjas y amarillos. El betacaroteno es el carotenoide más conocido y se puede encontrar en casi todas las frutas y hortalizas de color anaranjado, así como en los vegetales de hojas verdes, es un precursor de la vitamina A. Los carotenoides tienen la función de proteger las células vegetales de la oxidación y por

consiguiente, de la descomposición, protegen las membranas celulares de la acción de los radicales libres (Arguedas, Mora, Sanabria, 2015).

Método del DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)

Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas medicinales, pero aquella que ha recibido una preferencial atención es la técnica que utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo. Este radical libre es susceptible a reaccionar con compuestos a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrogeno proporcionado por el agente antioxidante (Guija y col., 2015).

El fundamento del método DPPH, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres (Castañeda, Llica y Vásquez, 2008). En la Figura 15, se muestra la reacción química entre el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y una molécula antioxidante.

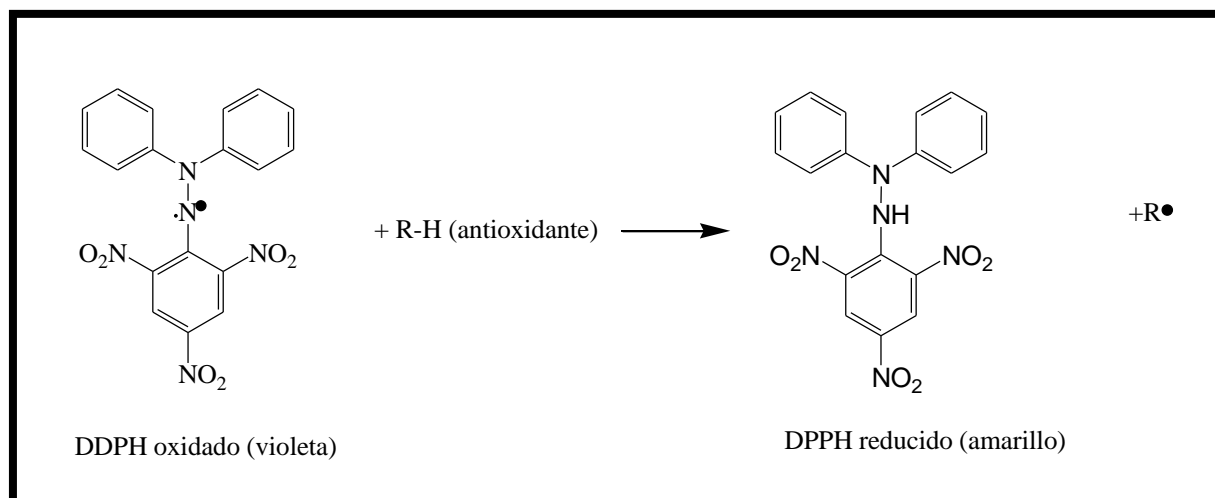


Figura 15. Reacción química entre el radical DPPH y una especie antioxidante (Castañeda y col., 2008).

Actividad Garrapaticida

En zonas tropicales y subtropicales del mundo, la actividad ganadera se ve influenciada por un sinnúmero de factores, tanto de carácter climático, como por enfermedades y parásitos, que reducen considerablemente la producción y fecundidad de los animales domésticos, pilar fundamental del sustento nutricional y económico de varios países (Yaguana, 2016).

Uno de los principales parásitos que afecta a la actividad ganadera en Sudamérica es la garrapata, cuyos daños son devastadores; por su acción hematófaga, por lo que, al chupar gran cantidad de sangre de sus hospedadores, ocasionan anemia, y por ende, disminución del desarrollo corporal, de la producción láctea, producción de carne, bajo rendimiento en el trabajo, bajo índice de fecundidad y una grave predisposición a enfermedades infecciosas, o por su acción expoliatriz, provocando grave daño a la piel, por lo cual pierden mucho su valor (Yaguana, 2016).

Garrapata

La garrapata, es un artrópodo arácnido de extensa distribución, que tiene importancia tanto en el aspecto económico como en la sanidad humana y animal. Es un factor limitante en el desarrollo del proceso ganadero, especialmente en países de clima cálido tropical y subtropical. Además, las garrapatas presentan aptitudes como vectores de la gran mayoría de rickettsias patógenas, de las borreliosis, piroplasmosis, theileriosis, anaplasmosis y enfermedades por virus (López, 1999).

Especies de garrapatas comunes en el ganado de Venezuela

Venezuela cuenta con extensas áreas de clima tropical favorables para el desarrollo de numerosos ectoparásitos, tales como *Boophilus microplus*, la garrapata tropical del bovino, la cual fue reportada por primera vez en Venezuela en 1919 (Díaz-Ungría, 1971). Este ixódido es responsable por la transmisión de enfermedades hemotrópicas del bovino, tales como la babesiosis y la anaplasmosis, las cuales están ampliamente distribuidas en el país (Toro, 1990). Sin embargo, estudios serológicos longitudinales de ambas enfermedades, realizadas en los últimos años han mostrado una incidencia de anaplasmosis más alta en la época de lluvias, por lo que se presume que *Anaplasma marginale* es transmitido también por otros artrópodos diferentes a *B. microplus* y por prácticas de manejo deficientes (James, Coronado, López y Meléndez, 1985).

Las especies de garrapatas que han sido citadas en el ganado bovino en Venezuela son las siguientes *Boophilus microplus* (Power y Silvestri, 1985), *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma maculatum*, y *Anocentor nitens* (Hernández, 1986).

El principal método de control de *B. microplus*, es la aplicación de ixodicidas (Fragoso y col., 1999; Redondo y col., 1999). El control químico se ha vuelto ineficaz en algunas regiones debido a la aparición de garrapatas resistentes a estos productos. La resistencia es uno de los mayores problemas, debido a que la disponibilidad de nuevos antiparasitarios es cada vez más escasa (Fragoso y col., 1999).

Control de garrapatas en Venezuela

El control de garrapatas en Venezuela está basado exclusivamente en el uso de acaricidas, debiendo resaltar el hecho de que el mismo no responde a ninguna política oficial de control (campana u otros). Consecuentemente, esas medidas de control son

aplicadas sin la supervisión oficial del MAC. La ausencia de una política oficial de control de garrapatas se ha traducido en el uso de acaricidas bajo esquemas o estrategias que responden a una presión de mercado, con escasa o nula asistencia técnica acerca del uso correcto de los acaricidas. Como ejemplo podemos citar que la bioecología de *B. microplus* es desconocida por la gran mayoría de los ganaderos, y por lo tanto, el control de este ixódido se realiza a través de la aplicación de acaricidas a cada 21 días, de acuerdo al ciclo de esta garrapata (Alvarado, 1996).

El control de garrapatas se efectúa básicamente mediante tratamientos garrapaticidas aplicados por aspersión, inmersión, sobre el dorso del animal y tópica (Núñez, Muños, y Moltedo, 1982). En Venezuela se ha reportado variación en la aplicación de garrapaticidas pero predominando la aplicación por aspersión. Así en el estado Zulia la aplicación de garrapaticidas por aspersión para 1978 en el distrito Urdaneta fue de 100 % (Hernández, 1978). Mientras que en el distrito Perijá para 1986 fue de 91,8 % (Hernández, 1986).

Hernández reporta que en el intervalo y número de tratamientos garrapaticidas por el animal es variable en los dos Distritos mencionados del estado Zulia. Así mismo, los principios activos de garrapaticidas utilizados y la permanencia de su utilización son también variables y no obedecen a directrices técnicas (Hernández, 1986).

Resistencia

Se define como la capacidad adquirida por individuos de una población parásita que les permite sobrevivir a dosis de químicos que generalmente son letales para una población normal (Woodham, González, López y Guereña, 1983; Nari y Hansen, 1999). Existen varios tipos de resistencia como:

La resistencia cruzada (RC) es el mecanismo que utilizan especies de insectos resistentes para sobrevivir a la exposición de insecticidas relacionados químicamente, usando un patrón de detoxificación genérico (Metcalf, 1989).

La resistencia múltiple (RM) es la utilización de varios mecanismos hacia la acción de varias clases de insecticidas no relacionados químicamente (Metcalf, 1989).

La resistencia a acaricidas de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* se ha documentado en todos los países donde el control químico ha sido el método de elección para tratar infestaciones del ganado (FAO, 2003; 2004). Según un estudio en el caso de Antioquia, Colombia, los estudios *in vivo* e *in vitro* en algunos municipios han mostrado que efectivamente existe un problema de resistencia a la mayoría de acaricidas comerciales (López Villar, Chaparro, Miller y Pérez, 2015; Puerta y col., 2015; Villar y col., 2016). Para demostrar que se trata de una resistencia innata y no de una mala aplicación o preparación de los productos, se han realizado pruebas *in vitro* recomendadas por la FAO (2004); simultáneamente se han hecho estudios de campo empleando las guías recomendadas por la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología (Holdsworth, Kemp y Green, 2006).

Rhipicephalus (Boophilus) microplus

R. microplus, se distribuye a nivel mundial en las regiones tropicales y subtropicales. Esta garrapata es endémica en el subcontinente indio, gran parte de Asia tropical y subtropical, el nordeste de Australia, Madagascar, el sudeste de África, el Caribe, México y varios países en América Central y del Sur. Ha sido erradicada de EE.UU., pero algunas veces se la puede encontrar en Texas o California en la zona de cuarentena que sirve como área de amortiguamiento en la frontera con México (Roque, 2015).

En la Figura 16, se muestra la hembra adulta de garrapata *Rhipicephalus microplus* (anteriormente conocida como *Boophilus microplus*). Considerada la garrapata más importante del ganado bovino a nivel mundial. Una alta carga de estas garrapatas en los animales puede disminuir la producción y dañar los cueros. *R. microplus* también puede transmitir la babesiosis y la anaplasmosis. Bajo condiciones experimentales, esta garrapata puede transmitir *Babesia equi*, que causa la piroplasmosis equina (Roque, 2015)



Figura 16. Hembra adulta de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Roque, 2015)

Rhipicephalus (Boophilus) microplus, garrapatas del ganado vacuno, son un grupo de parásitos artrópodos hematófagos causantes de una enfermedad parasitaria externa que afectan a los bovinos en todas sus edades, causándoles una anemia perjudicial para la producción e irritación y malestar en los animales. Son garrapatas simples con ojos, los machos miden de 3 a 4 mm, hembras de 10 a 12 mm (Solórzano, 2008).

El daño que causan las garrapatas a los bovinos varía en la mayoría de los casos según el número de parásitos, en animales severamente infestados ocurren casos de anemia y

pérdida de peso. Además de esto, algunas hembras generan una toxina paralizante. (Solórzano, 2008).

En la Tabla 4 se muestra la de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Cordero de Campillo y col., 1999).

Tabla 4.
*Clasificación taxonómica de la garrapata
 Boophilus microplus* (Cordero de Campillo y col., 1999).

Reino	Animal
Phylum	Arthropoda
Sub-phylum	Chelicera
Clase	Arácnida
Grupo	Parasitiformes
Orden	Acarina
Sub-orden	Ixodoidea
Familia	Ixodidae
Género	<i>Amblyomma, Bothriocroton, Dermacentor, Haemaphysalis, Hialomma, Ixodes, Nossomma, Rhipicentor y Rhipicephalus Boophilus</i>
Especie	<i>R. microplus</i>

www.bdigital.ula.ve

Características generales de la garrapata del género *Rhipicephalus (Boophilus)*

El cuerpo por lo general es robusto, semejante a un fríjol, constituido por una sola masa que se puede dividir en tres porciones conocidas como **gnathostoma**, **podosoma** y **opistosoma** (Mestra, 2004).

La primera porción o gnathostoma: Corresponde al aparato bucal, conformado por dos pinzas o kelas que utiliza para cortar la piel, dos pedipalpos que cumplen una función sensorial para detectar pieles delgadas y vascularizadas y un hipostoma con dientes dirigidos hacia atrás que utiliza como órgano de fijación (Mestra, 2004).

La región del podosoma: Es considerada como el cuerpo propiamente dicho y en ella se encuentran ocho patas. (Mestra, 2004).

El opistosoma: Es la parte posterior del cuerpo de la garrapata; en ella se encuentra el orificio anal y las placas quitinosas que protegen los órganos respiratorios conocidos como peritremo (Mestra, 2004).

En el borde posterior se forman pliegues que se dilatan cuando la garrapata se alimenta y son conocidos con el nombre de festones. La parte dorsal de las garrapatas duras se encuentra protegida por un escudo total en machos y parcial en hembras (Mestra, 2004).

Esta diferencia se debe a la necesidad que tienen las hembras de alimentarse de sangre y aumentar de tamaño para realizar el desove. En la cara ventral se encuentra una serie de escudos con diferentes denominaciones según su ubicación: escudos genitales, pregenitales, anales o adanales. La división entre las placas o escudos recibe el nombre de surcos, algunas veces con nombres similares (Mestra, 2004).

Ciclo de vida de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

R. microplus, es una garrapata de un sólo huésped; pasa todos sus estadios de vida en un animal. Los huevos hacen eclosión en el medio ambiente y las larvas se arrastran por el pasto u otras plantas para encontrar un huésped. También pueden ser transportadas por el viento. En el verano, las garrapatas de la especie *R. microplus*, pueden sobrevivir durante un período de hasta 3 o 4 meses sin alimentarse. En temperaturas más frías pueden vivir sin alimento hasta seis meses. Las garrapatas que no pueden encontrar un huésped finalmente mueren de inanición (Mestra, 2004).

Las garrapatas recién nacidas (larvas) se suelen encontrar adheridas a las zonas más finas de la epidermis tales como la cara interna de los muslos, los flancos y las patas traseras. También se las puede observar en el abdomen y el pecho. Después de alimentarse las larvas sufren dos mudas y se convierten en ninfas y posteriormente en garrapatas adultas. Cada estadio de desarrollo (larva, ninfa y adulta) se alimenta una sola vez, pero la alimentación dura varios días (Forti, da Silva, Neves, Alves, Peixoto y Dos Santos, 2010).

Las garrapatas macho adultas maduran sexualmente después de la alimentación y se aparean con hembras que están alimentándose. Una garrapata hembra adulta que se ha alimentado y apareado se separa de su huésped y deposita una gran cantidad de huevos en el medio ambiente. Por lo general, colocan los huevos en grietas o detritus, o debajo de las piedras. La garrapata hembra muere después de la oviposición. Las garrapatas en el subgénero *Boophilus* pueden completar su ciclo de vida en un plazo de 3 a 4 semanas; esta característica puede causar una gran carga de garrapatas en los animales (Forti y col, 2010).

La necesidad de métodos de control de garrapatas más seguros, menos agresivos al hombre y al medio ambiente ha estimulado la búsqueda de nuevos acaricidas a partir de extractos vegetales, que de forma aislada o en combinación, retrasen el desarrollo de resistencia o reduzcan el problema de los residuos por su característica biodegradable (Forti y col, 2010).

El desarrollo de plaguicidas “orgánicos” o “biológicos” obtenidos preferiblemente desde recursos autóctonos y que muestren una mejor relación costo-eficacia, es necesario establecer un uso adecuado, pues en general, cada vez que las garrapatas sobreviven a la aplicación de un producto químico natural o de síntesis, transmiten la información genética de cómo sobrevivir, a posteriores generaciones (Forti y col., 2010).

Se ha confirmado la resistencia al acaricida para organofosforados sintéticos. Piretroides, amitraz, ivermectina, fpronil y más recientemente fluazurón (Reck y col., 2014).

Métodos para determinar la actividad garrapaticida

Se han utilizado dos técnicas para evaluar la susceptibilidad a los acaricidas químicos utilizando larvas de garrapatas: la prueba de paquete larval (LPT) (Stone y Haydock, 1962) y la prueba de inmersión de larval (LIT) (Shaw, 1966). En ambas técnicas, la respuesta se evalúa en función del porcentaje de larvas muertas después del tratamiento. El método LPL, es recomendado por Food and Agriculture Organization de las Naciones Unidas (FAO, 2004), como método estándar para el diagnóstico de resistencia al acaricida. En el presente estudio, evaluó dos metodologías para evaluar (Webster y col., 2018).

Prueba de paquete de larvas (PPL): Está sustentada y desarrollada en una serie de ensayos con garrapatas *B. microplus* durante muchos años en el CSIRO, Australia y fue adoptada por la FAO (2004), como la principal prueba de diagnóstico de resistencia en garrapatas. Consiste en exponer larvas de garrapatas en una superficie de papel filtro previamente impregnado con ixodicidas. La mortalidad larval se cuantifica 24 horas después. (Rodríguez y col., 2005)

Prueba de inmersión de larvas (PIL): Este método descrito por Shaw (1966), no ha sido ampliamente usado en el diagnóstico de resistencia ni promovido por la FAO. Generalmente emite un diagnóstico en aproximadamente seis semanas, el mismo tiempo requerido para la prueba de paquete de larvas. Se han realizado estudios comparativos donde se concluye que los resultados de la prueba de inmersión pueden ser comparados con los resultados del paquete de larvas. (Rodríguez y col., 2005)

Prueba de inmersión de adultas (PIA): Esta prueba fue descrita y desarrollada por (Drummond, Graham, Ernest, 1967), para determinar la eficacia de nuevos ixodicidas contra varias especies de garrapatas. Fue adaptada como prueba de resistencia en varios laboratorios, pero nunca fue estandarizada. Los bioensayos estandarizados para el diagnóstico de resistencia de una muestra de garrapatas son valiosos, porque fenotipan la respuesta poblacional al ixodicida. Posiblemente su principal desventaja es que requieren de gran número de larvas y varias semanas para obtener resultados (Rodríguez y col., 2005). En nuestro estudio se utilizará el método de Prueba de paquete de larvas (PPL).

Sistema de Variables

Variable independiente:

Composición química de los extractos de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

Contenido de polifenoles totales en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

Variable dependiente:

Actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

Actividad garrapaticida del extracto etanólico, de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

Tabla 5

Operacionalización de la variable independiente componentes químicos del extracto.

Variable	Tipo de Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensión y categorías	Indicador
Composición química	Independiente	Estudio de los componentes químicos de las plantas que comprende la extracción, separación y detección de dichos componentes mediante formación de compuestos colorados, cromatografía, radiación o fluorescencia (Flores, Castañeda, Montiel, y Hernández, 2014).	A través de tamizaje fitoquímico	Presencia de Alcaloides, Carotenoides, Flavonoides, Fenoles Triterpenos, entre otros.	Formación de precipitado, reacciones de color, turbidez, entre otros.
Contenido de polifenoles (PF)	Independiente	Es la cantidad de compuestos polifenólicos y tipos presentes en un analito, varía en función de la especie vegetal, variedad y parte del vegetal considerada (fruto, semillas, brotes, hojas) (García y col., 2015).	A través del método Folin-Ciocalteu. Tungstodofosfato (molibdofosfato) a pH básico dando una coloración azul.	Contenido de compuestos fenólicos, que se evidencia por cambio de color y lectura en espectrómetro UV a 765 nm	Contenido de ácido gálico en mg del extracto, medido a partir de una curva patrón de ácido gálico.

(Chacón y Morillo, 2019).

Continuación Tabla 5.
Operacionalización de las variables

Variable	Tipo de Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensión y categorías	Indicador
Actividad antioxidante	Dependiente	Se centra principalmente en la búsqueda de compuestos capaces de capturar radicales del medio ambiente que lo rodea (Contreras y col., 2017).	Método del DPPH	Compuestos : Alcaloides Flavonoides Taninos Fenólicos, entre otros	% de inhibición. IC ₅₀
Actividad garrapaticida	Dependiente	Es la capacidad que poseen ciertas sustancias químicas inorgánicas o microbiológicas líquidas o sólidas que producen efectos sobre una garrapata (Cantú y García, 2013).	Prueba de paquete de larvas (PPL)	Contaje de larvas muertas y vivas	% de mortalidad de garrapatas a través de fórmula de Abbot DL ₅₀ , a través de análisis de regresión lineal PROBIT

(Chacón y Morillo, 2019).

Hipótesis

Bixa orellana L., pertenece a la familia Bixaceae y género *Bixa*, de acuerdo a los estudios realizados y la composición química reportada se le atribuye una amplia variedad de efectos farmacológicos, por lo anteriormente expuesto, es posible que los extractos de las partes aéreas de *Bixa orellana* L. recolectada en la localidad de San Juan de Colón, estado Táchira, posea actividad antioxidante y garrapaticida, contra la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, que afecta el ganado.

Hipótesis nula

Bixa orellana L., pertenece a la familia Bixaceae y género *Bixa*, de acuerdo a los estudios realizados y la composición química reportada se le atribuye una amplia variedad de efectos farmacológicos por lo anteriormente expuesto, es posible que los extractos de las partes aéreas de *Bixa orellana* L. recolectada en la localidad de San Juan de Colón, estado Táchira, no posea actividad antioxidante y ni garrapaticida, contra la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, que afecta el ganado.

CAPÍTULO III

Marco metodológico

Tipo de Investigación

El estudio realizado fue de tipo confirmatorio, según Hurtado (2010), lo define como un tipo de investigación cuyo propósito consiste en precisar diferencias y semejanzas entre dos o más grupos con respecto a un mismo evento. En este caso serían la composición química de *Bixa orellana* L. y su actividad biológica con el fin de determinar la relación que existe entre ambas.

Diseño de la investigación

Tomando en consideración que el diseño de la investigación se relaciona en cómo el investigador maneja la realidad partiendo de una serie de actividades organizadas que indican los pasos para la recolección y análisis de datos, por lo tanto el diseño es la estructura a seguir en una investigación, ejerciendo el control de la misma a fin de encontrar resultados confiables y su relación con los interrogantes surgidos de los supuestos e hipótesis del problema, así lo expresa Tamayo (2004). De manera tal, que la investigación se efectuó con un diseño experimental debido a que la especie vegetal *Bixa orellana* L. se sometió bajo condiciones controladas en el laboratorio con el fin de observar los efectos y reacciones producidas.

Población y Muestra

Población

La investigación requiere de una población determinada a fin de realizar el análisis pertinente, en este caso, la población es la totalidad de un fenómeno de estudio, incluye la totalidad de unidades de análisis o entidades de población que integran dicho fenómeno y

que debe cuantificarse para un determinado estudio integrando un conjunto de entidades que participan de una determinada característica, y se le denomina población por constituir la totalidad del fenómeno adscrito a un estudio o investigación (Tamayo, 2004). En el presente estudio, la población estuvo conformada por la especie vegetal *Bixa orellana* L, fue recolectada en la ciudad de San Juan de Colón, Estado Táchira.

Muestra

El estudio asume una muestra, la cual es una parte (sub-conjunto) de la población obtenida con el propósito de investigar propiedades que posee la población (Parra, 2003). En esta investigación la muestra estuvo conformada por las partes aéreas de la *Bixa orellana* L.

Materiales y Métodos

Recolección material del vegetal

La especie *Bixa orellana* L. fue recolectada en el sector de Las Flores en la localidad de San Juan de Colón, Municipio Ayacucho, Parroquia San Juan de Colón, altitud 802 m.s.n.m. Estado Táchira, fue identificada botánicamente por el Ing. Juan Carmona, del Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA.

Se depositó una muestra y se elaboró un voucher, bajo el N° 05, en el Herbario MERF. Dr. José L. Ruiz Terán, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, En la Figura 17, se muestra la recolección de la especie vegetal y en la Figura 18, los datos del voucher, que tiene fecha 30 de septiembre de 2017.



*Figura 17.*Recolección de la especie *Bixa orellana* L.

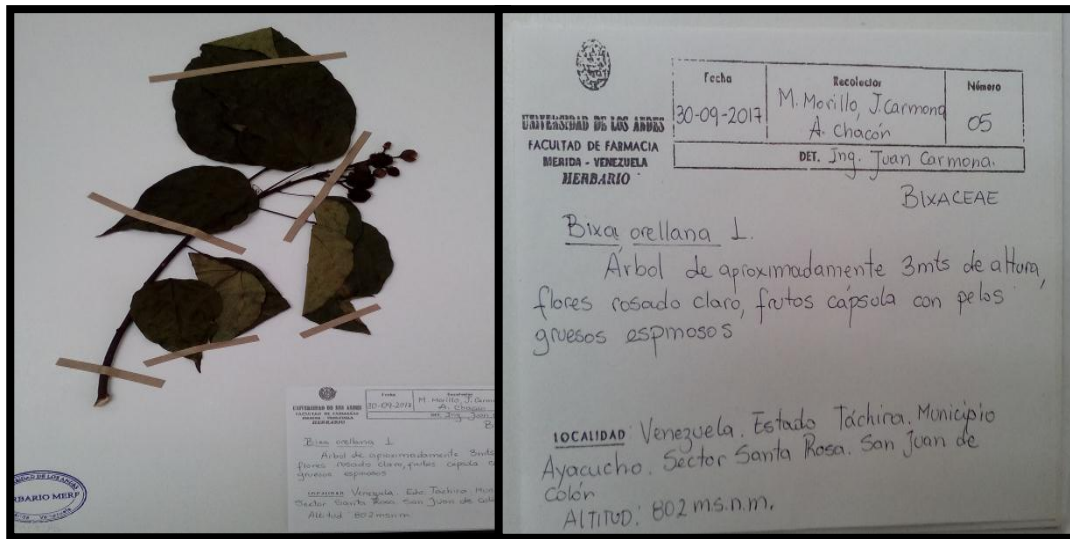


Figura 18. Vaucher de *Bixa orellana* L. depositado en el Herbario MERF. Dr. José L. Ruiz Terán, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA

Secado y molienda del material vegetal

Para tal fin, se utilizaron hojas, tallos y flores de la planta, aproximadamente 1 Kg, luego se cortaron en trozos pequeños, se colocaron en la estufa a 40 °C durante 48 horas, fueron molidas y se pesaron en la balanza Denver Instrument XL 3100 (Figura 19) obteniéndose 380 g del material vegetal seco y molido, este material fue empaquetado, rotulado y almacenado en un lugar seco a temperatura ambiente.

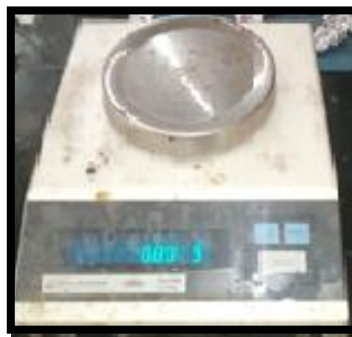


Figura 19. Balanza analítica Denver Instrument XL 3100

Obtención de los extractos de la *Bixa orellana* L.

Se pesaron 100 g del material vegetal seco y molido; de las partes aéreas de *B. orellana* L., se colocaron a macerar por 48 horas con el solvente hexano, se filtró, por gravedad para eliminar el sólido, y se concentraron hasta sequedad en un rotaevaporador 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; Cada uno de 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 (tamizaje fitoquímico).

En la Tabla 6 se muestra rendimiento obtenido de los extractos de las partes aéreas de *B. orellana* L.

Tabla 6. *Rendimiento de los extractos obtenidos de las partes aéreas de B. orellana L.*

Extracto	Gramos (g)	Rendimiento en %
Hexanoico	1,02	1,02
Diclorometanoico	3,78	3,78
Etanólico	1,98	1,98

Determinación de la Composición química cualitativa a través de las pruebas correspondientes (Tamizaje fitoquímico).

La determinación de la composición química de los extractos de las partes aéreas de *B. orellana* L., se realizó, en el Laboratorio de Productos Naturales, del Instituto de Investigaciones de La Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA, bajo la supervisión de la Prof. Marielba Morillo.

Estas pruebas se realizaron sobre los extractos hexanólico, diclorometanoico y etanólico. A continuación, se describen estas pruebas de identificación química cualitativa.

Prueba par alcaloides

Reacción de Dragendorff, Wagner y Meyer

Se pesaron 100 mg del extracto etanólico y se le adicionó 10 mL de HCl al 10 % y se colocaron en baño de maría hasta ebullición por 30 minutos (Figura 20). Se filtró y el filtrado obtenido se distribuyó en 3 tubos de ensayo. Se adicionó a cada tubo gotas del reactivo correspondiente (Dragendorff, Wagner y Meyer). La aparición de turbidez o precipitado indican la positividad de la prueba.



Figura 20. Baño de maría en la prueba de alcaloides

Prueba para Fenoles

Reacción de Cloruro férrico (FeCl₃): Se añadió 1 mL de solución alcohólica de cada una de los extractos, se agregó una gota de solución acuosa de FeCl₃ al 10 %. La formación de color azul o verde indicó la presencia de fenoles.

Prueba de Flavonoides

Reacción de Shinoda: se tomó 1 mL de solución de cada extracto. Se añadieron algunas virutas de Mg, se sujetó el tubo con una pinza, se añadió cuidadosamente por la pared del tubo unas gotas de HCl concentrado. La aparición de una coloración naranja o violeta, se considera una prueba positiva.

Prueba de Taninos

Reacción de Gelatina: el extracto etanólico se secó y se disolvió en agua, aparte se preparó una solución al 10 % de gelatina y se puso en contacto con el extracto acuoso. La desnaturalización de la proteína que se evidencia con la presencia de un precipitado o la ruptura de la gelatina, se considera positiva la prueba.

Prueba de Triterpenos y/o esteroides.

Reacción de Lieberman: se disolvieron los tres extractos (hexanoico, diclorometanólico y etanólico) en diclorometano, se añadió 0,5 mL de anhídrido acético a cada uno. Luego se le adicionó cuidadosamente por las paredes del tubo una gota de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de un color verde indica la presencia de esteroides y si es color rojo son terpenos.

Prueba de Saponinas

Reacción espuma: La presencia de saponinas se manifiesta por la formación de espuma cuando se agita vigorosamente el material vegetal con 1 mL de agua durante 1 minuto. La espuma debe permanecer por 5 minutos de lo contrario la prueba se considera negativa.

Prueba de Cumarinas

Disolver el extracto en su propio solvente (0,5 mL) adicionar gotas de hidróxido de amonio concentrado. Se considera positiva la prueba si se presenta una fluorescencia azul-violeta bajo luz UV.

Prueba de Quinonas

Se le adicionan gotas de hidróxido de amonio en el extracto disuelto en el etanol, se considera positiva la prueba para antraquinonas si hay la presencia de una coloración roja que aparece en los dos primeros minutos.

Determinación de los Polifenoles totales, a través del método de Folin-Ciocalteu.

La determinación de los polifenoles totales, se llevó a cabo en el Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos y el Instituto de Investigaciones de La Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Bajo la supervisión de las Profesoras: María Eugenia Rondón y Marielba Morillo.

Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (tungstofosfato y molibdofosfato) a pH básico dando una coloración azul que es sensible de medir a 765nm.

Procedimiento:

Solución de ácido gálico: En un matraz aforado, se disolvieron, 50 mg de ácido gálico en 100 mL de etanol (o acetona: agua 1:1 v/v). La solución se conservó en refrigeración.

Solución de carbonato de sodio 0.7 M: Se disolvieron 74,19 g de carbonato de sodio en 800 mL de agua desmineralizada y se llevó a ebullición. Se dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente y se completó hasta 1 L de agua.

Curva de calibración: se preparó una solución inicial del patrón (ácido gálico) a 50 mg/L se diluyeron 10 mL de la solución madre de ácido gálico a 100 mL con etanol. En la Tabla 7 se muestran las diferentes concentraciones de ácido gálico, con la que se construyó la curva de calibración, y las diferentes proporciones en mL de los diferentes componentes de la reacción de Folin-Ciocalteu.

Tabla 7.
Diferentes concentraciones de ácido gálico, con la que se construyó la curva de calibración

Componentes de la Reacción	Concentración en mg/L								
	0	5	10	20	25	30	40	50	
Solución de patrón ácido gálico	0	0,1	0,2	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	
Etanol (acetona/agua 1:1) (mL)	1	0,9	0,8	0,6	0,5	0,4	0,2	0	
Reactivo Folin Ciocalteu (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	
Reactivo carbonato-tartrato(mL)	8	8	8	8	8	8	8	8	

Procedimiento:

Se mezclaron bien los tubos, utilizando un agitador vortex, se colocaron en la oscuridad, hasta esperar 30 minutos para que se desarrollara el color azul y así proceder a efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a 760 nm. Trazar la curva de calibrado concentración/absorbancia

Análisis de los extractos: tomar 1 mL de la muestra filtrada y añadir 0,5 mL de Rx folin ciocalteu y a los dos minutos 2 mL de solución de carbonato de sodio, esperar 30 minutos para que se desarrolle el color. Efectuar la lectura en el espectrofotómetro a 760 nm y

extrapolar los valores de absorbancia en la curva de calibrado para obtener los valores de concentración de compuestos fenólicos en el extracto (Ainsworth y Gillespie, 2007).

Contenido de compuestos fenólicos:

La determinación de fenoles totales en el extracto etanólico de las partes aéreas 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 expresaran como μg equivalentes de ácido gálico por mg de extracto (Ainsworth y Gillespie, 2007).

Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)

La determinación de la actividad antioxidante, por el método DPPH, se llevó a cabo en el Departamento de Ciencias de Los Alimentos, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA bajo la supervisión de la profesora Marielba Morillo.

Procedimiento para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de Bixa orellana L.

- Se llevó acabo un barrido inicial para determinar si los extractos hexanoico, diclorometanoico y etanólico, mostraban actividad antioxidante.
- Se tomaron 4 mg del extracto hexanólico, diclorometanoico y etanólico y se colocaron en un tubo de eppendorf y cada uno se diluyó con 1 mL de metanol por separado.

- Utilizando 3 tubos de ensayo por cada uno de los extractos (por triplicado) se colocaron, 700 μL de DPPH y 300 μL de la dilución anterior, estos se dejaron en reposo durante 30 minutos en oscuridad.
- Luego de 30 minutos se procedió a medir la absorbancia en el espectrofotómetro Genesys 10 Bio Thermo Electron Corporation a una longitud de onda de 517 nm.
- Una vez que se determinó el % de inhibición (% I) de cada uno de los extractos, se seleccionaron los extractos que presentaron un % I igual o mayor a 50.
- Se preparó una solución madre de concentración 1 mg/mL, de cada uno de los extractos seleccionados y a partir de la misma se prepararon varias diluciones (500, 250, 150, 100, 50, 25 ppm), como se muestra en la Tabla 10, donde se pueden observar las diferentes proporciones en μL de solución madre y metanol.

Tabla 8.

Diluciones del extracto para determinar la actividad antioxidante por el método DPPH.

	Concentración en $\mu\text{g/mL}$					
	500 μL	250 μL	150 μL	100 μL	50 μL	25 μL
Solución madre (1 mg/mL)	500 μL	250 μL	150 μL	100 μL	50 μL	25 μL
Metanol	500 μL	750 μL	850 μL	900 μL	950 μL	975 μL

- Se prepararon varias diluciones de ácidos ascórbico para construir una curva patrón, como se muestra en la Tabla 9. donde se pueden observar las diferentes proporciones en μL de solución madre y metanol.

Tabla 9.

Diluciones empleadas para realizar la curva patrón de ácido ascórbico

	Concentración $\mu\text{g/mL}$			
	100	75	50	25
Solución madre (176 $\mu\text{g/mL}$)	568,2 μL	426,1 μL	284,1 μL	142,1 μL
Metanol	431,8 μL	573,9 μL	715,9 μL	857,9 μL

En la Figura 21 se muestra las diluciones de los extractos de las partes aéreas de *B. orellana* L., en presencia del reactivo DPPH y en la Figura 22, se muestra el espectrofotómetro Genesys 10. Bio Thermo Electron Corporation, del Departamento de Ciencias de Los Alimentos, Facultad de Farmacia, ULA, utilizado para hacer las mediciones de absorbancia a 517 nm, en la determinación de la actividad antioxidante.



Figura 21. se muestra las diluciones de los extractos de las partes aéreas de *B. orellana* L., en presencia del reactivo DPPH



Figura 22. Espectrofotómetro Genesys 10.
Bio Thermo Electron Corporation

También se utilizó la Balanza analítica Sartorius BP2215; max 220 g d= 0,1 mg

Determinación de la actividad garrapaticida por el método prueba de paquete de larvas (PPL).

La determinación de la actividad garrapaticida de los extractos de las partes aéreas de *B. orellana* L., fue realizada en el Laboratorio de Farmacognosia, del Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, bajo la supervisión de las profesoras: María Eugenia Rondón, Vanesa Hernández y Marielba Morillo.

Procedimiento:

Recolección de los parásitos en el ganado vacuno:

La recolección de las garrapatas, se realizó el día 12 de julio de 2019, en la finca del señor Humberto Belandria, ubicada en Chiguará, estado Mérida (Distrito Sucre a 40 minutos de la ciudad de Mérida y a 15 minutos de la ciudad del Vigía. La temperatura promedio es de 28° C y una altitud de 840 msnm), para tal fin se tomaron 30 garrapatas adultas ingurgitadas, directamente del animal y se almacenaron en un frasco seco, con tapa.

Inmovilización de la garrapata

Se utilizaron 30 garrapatas *R. microplus*, adultas ingurgitadas, las cuales se pegaron con cinta adhesiva en placas de vidrio para obtener la masa de huevos tras su incubación por 18 días a 26° C en cabinas de vidrio.

En la Figura 23, se muestra las garrapatas adultas de la especie *R. microplus*, ingurgitadas, sobre la cinta adhesiva.

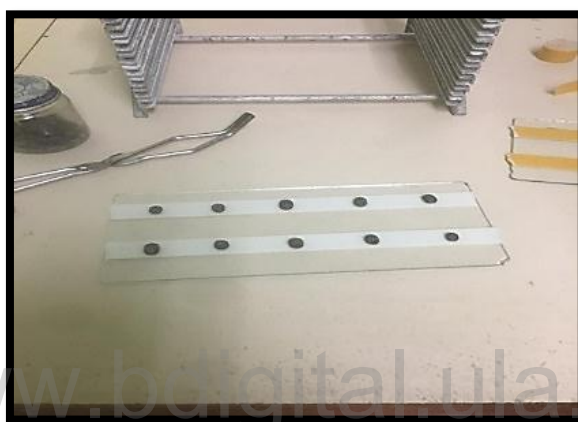


Figura 23. Garrapatas adultas de la especie *R. microplus*, ingurgitadas, sobre la cinta adhesiva.

Obtención de los huevos

Después de aproximadamente 7 días desde la recolección (19 de julio de 2019), ocurrió la ovoposición (Figura 24). La masa de huevos de *R. microplus*, se recolectó en tubos de ensayo tapados con algodón en cantidad suficiente para no permitir la fuga de las larvas (Figura 25), fueron llevados a incubación nuevamente bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad por 21 días.

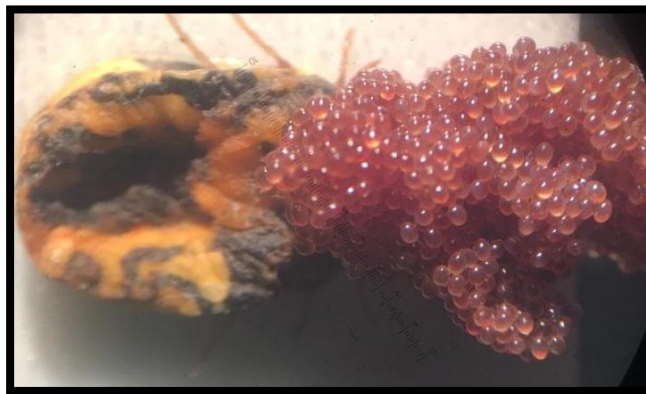


Figura 24. Oviposición de huevos de *R. microplus*



Figura 25. Recolección de masa de huevos de *R. microplus*, en tubos de ensayo

Obtención de las larvas

Luego de la eclosión de los huevos se dejó madurar las larvas de *R. microplus*, por 14 días más, en la Figura 26. Se observan las larvas de *R. microplus*, observadas a través de la lupa estereoscópica.



Figura 26. Larvas de *R. microplus*, observadas a través de la lupa estereoscópica

Desarrollo de la prueba

Utilizando capsulas de Petri con un papel filtro adosado en el fondo (Figura 27), se realizó una prueba inicial a la concentración máxima del extracto etanólico de las partes aéreas de *B. orellana* L. 20 %, para tal fin, se pesaron 2 g del extracto etanólico de *Bixa orellana* L. y se diluyó hasta 10 mL con una solución de Tween 80 en agua destilada al 2 %, para saber si el extracto mostraba actividad o no sobre las larvas de garrapata.



Figura 27. Placas de Petri con papel filtro

Control positivo y control negativo:

Se prepararon tres capsulas del control negativos (Solución Tween 80 al 2 % en agua destilada) y tres capsulas para el control positivo Ivermectinaal 1 % (diluida con agua destilada al 0,1 %).



Figura 28. Control positivo Ivermectina al 1 %

Con una pipeta automática se procedió a impregnar los papeles filtro, dentro de la capsulas identificadas, con 2 mL de la concentración, correspondiente del extracto de *Bixa orellana* L. Posteriormente se colocaron sobre el papel filtro de 100 - 120 larvas por capsula (con un pincel) y se sellaron con cinta adhesiva de manera hermética cada una, para evitar que se escapen las larvas, como se muestra en la Figura 29.



Figura 29. Capsulas de Petri, sembradas conlarvas de *R. microplus* y sometidas a la acción del extracto al 20 %.

Todas las capsulas (extracto y controles) fueron colocadas en una cámara de vidrio (Figura 30), 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 (Figura 31) y pinzas entomológicas.



Figura 30. Placas de Petri sembradas con larvas de *R. microplus* y sometidas a la acción del extracto al 20 % en cámara de vidrio.

www.bdigital.ula.ve



Figura 31. Lupa estereoscópica del Laboratorio de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA.

En caso de que el extracto tenga actividad, se prepararán, 5 diluciones más del mismo, de 10 %, 5 %, 2,5 %, 1,25 %, 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. Se contará el número de larvas muertas por capsula y el total de larvas por capsula utilizando una lupa estereoscópica y pinzas entomológicas calcula mortalidad corregida con la fórmula de Abbott (1925).

Esta corrección se logra a través de la fórmula de Abbott, en la cual:

$$\% Mc = \frac{X - Y}{X} \times 100$$

Dónde:

% Mc = Porcentaje de Mortalidad corregida

X = Porcentaje de larvas vivas en el control

Y = Porcentaje de larvas vivas en el tratamiento

Si el porcentaje de mortalidad en el control excede el 20 %, se debe descartar el bioensayo para ser repetido nuevamente (Busvine, 1971).

CAPÍTULO IV

Resultados y discusiones

Estudio fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

Se llevó a cabo una serie de pruebas para determinar cualitativamente los compuestos químicos presentes en los diferentes extractos de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

El tamizaje fitoquímico preliminar permitió comprobar en los extractos hexanoico y diclorometanoico la presencia de esteroides y en el extracto etanólico: Alcaloides, esteroides y polifenoles (Figura 32). En la Tabla 10, se presentan los resultados del estudio fitoquímico de los extractos hexanoico, diclorometanoico y etanólico de las partes aéreas de esta planta.

Tabla 10.

Estudio fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de Bixa orellana L.

Metabolitos Secundarios	Prueba	Extractos		
		Hexanoico	Diclorometanoico	Etanólico
Alcaloides	Dragendorf			+++
	Wagner			+++
	Mayer			+++
Esteroides	Lieberman-Buchner	+++	+++	+++
Terpenos	Lieberman-Buchner	-	-	-
Polifenoles	Fe Cl ₃	-	-	+++
Flavonoides	Shinoda	-	-	-
Saponinas	Prueba de la espuma	-	-	-
Taninos	Prueba de gelatina	-	-	-
Cumarinas	Luz UV	-	-	-
Y Quinonas	Hidróxido de amonio	-	-	-

+++ Muy abundante, ++ abundante, + presente en pocas concentraciones.

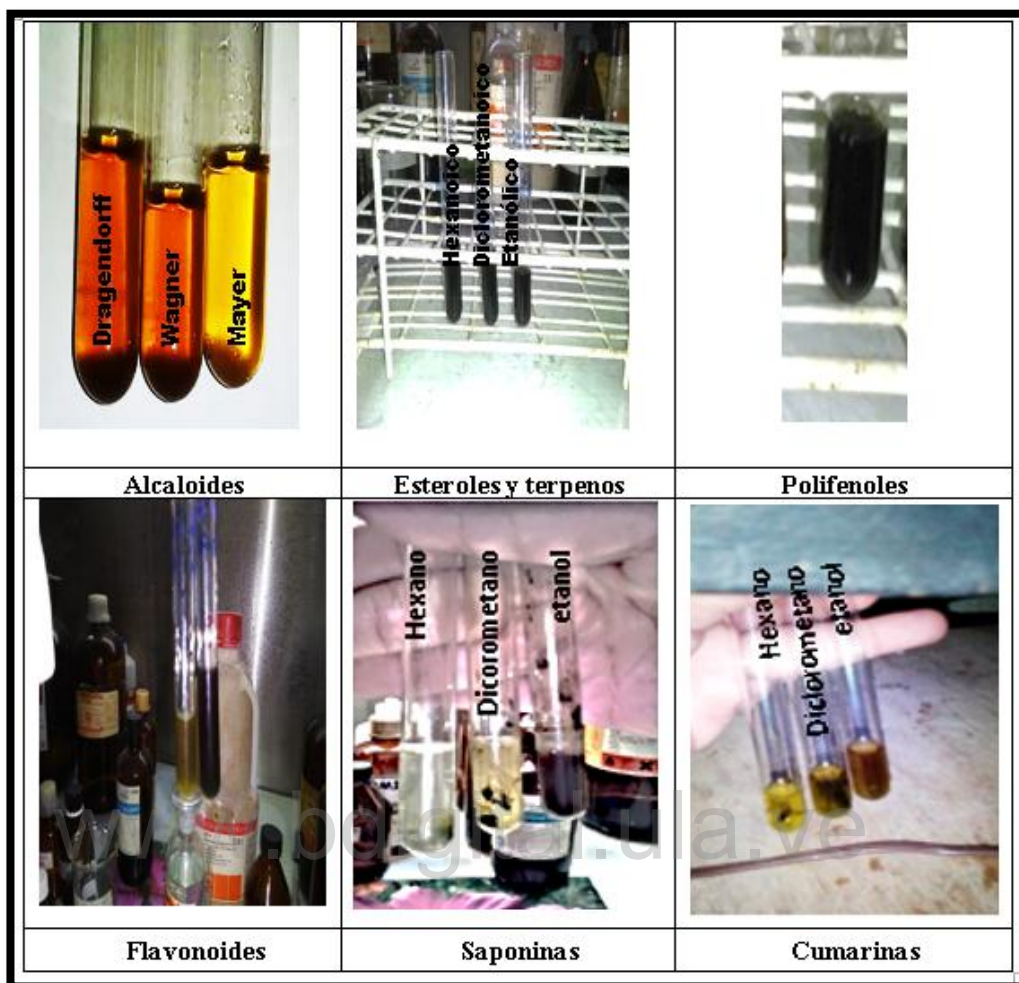


Figura 32. Resultados de Pruebas cualitativas de tamizaje fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de *B. orellana* L.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio fitoquímico, coinciden, con lo reportado por Padro y col., (2017), quienes determinaron la composición química en la tintura al 10 % de *Bixa orellana* L., recolectada en Cuba, reportaron, alcaloides, esteroles y fenoles, sin embargo, difieren de nuestro trabajo, en algunos compuestos químicos como: Cumarinas, saponinas, flavonoides, azúcares reductores, triterpenos y taninos.

Por otra parte, Shahid-ul-Islam y col., (2016), reportaron 46 compuestos químicos, identificados por algunos investigadores, en varios estudios realizados en diferentes partes

de la planta, de la especie, *Bixa orellana* L., entre los que se encontraban: Carotenoides, terpenoides, compuestos volátiles y otros compuestos, entre los que podemos mencionar esteroides, flavonoides y polifenoles. En nuestro estudio logramos identificar cualitativamente, esteroides y polifenoles, además de los alcaloides presentes en el extracto etanólico de la planta.

De igual manera Muñoz (2015), determinó la composición de fitoconstituyentes presentes en las hojas de *Bixa orellana* L., los resultados obtenidos, coinciden con los nuestros, en la presencia de alcaloides y esteroides, sin embargo, difieren en algunos metabolitos secundarios como: triterpenos, antocianidinas, flavonoides, saponinas y taninos, los cuales, están ausentes en nuestro estudio.

Las diferencias, observadas al comparar nuestro 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 (Acosta, 2003).

Debido a que, en los diferentes estudios realizados por otros investigadores, muestran diferentes composiciones químicas de *Bixa 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 de nuestros extractos.

Gershenson (1984), reportó que la disponibilidad de agua, contribuye a la producción de taninos condensados; al encontrarse en periodo de escasez de agua, las plantas cierran sus estomas y restringen el proceso de fotosíntesis, de este modo se esperaría una relación

negativa entre el estrés hídrico y la producción de compuestos fenólicos. Esto es muy importante ya que afecta, la producción de metabolitos secundarios.

Otro aspecto inherente a la planta y que incide en el contenido de taninos, es la parte de la planta a la cual pertenece, por lo cual, se ha determinado que el contenido de dichos metabolitos en el peciolo es diferente del que hay en la hoja. Por su parte, Oncina, Botía y Ortuño (2000), demostraron que las diferentes partes de la planta, presentan distintas productividades de metabolitos secundarios, y que se acumulan cantidades de metabolitos diferentes de acuerdo con la parte de la planta a la cual corresponde tal acumulación.

Según, Waterman y Mole (1994), 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 Varón y Granados(2012), afirmaron que la aparición de los compuestos secundarios está relacionada con los mecanismos de defensa de la planta y los efectos del suelo y del clima.

Cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L., por el método de Folin-Ciocalteu.

Curva de calibración del ácido gálico

El contenido de polifenoles del extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L., fue determinado por el método de Folin-Ciocalteu, en la Tabla 11 se muestra la lectura de absorbancia de las distintas concentraciones de la solución de ácido gálico empleada como patrón.

Tabla 11.

Lectura de absorbancia de las distintas concentraciones de la solución de ácido gálico empleada como patrón.

Concentración de Ácido gálico (mg/mL)	Absorbancia a 760 nm		
	λ_1	λ_2	λ_3
10	0,118	0,193	0,155
20	0,362	0,432	0,397
25	0,532	0,574	0,553
40	0,919	0,925	0,922
50	1,100	1,098	1,099

En el Grafico 1. Se muestra las curvas de calibración del ácido gálico, con sus correspondientes ecuaciones de la recta.

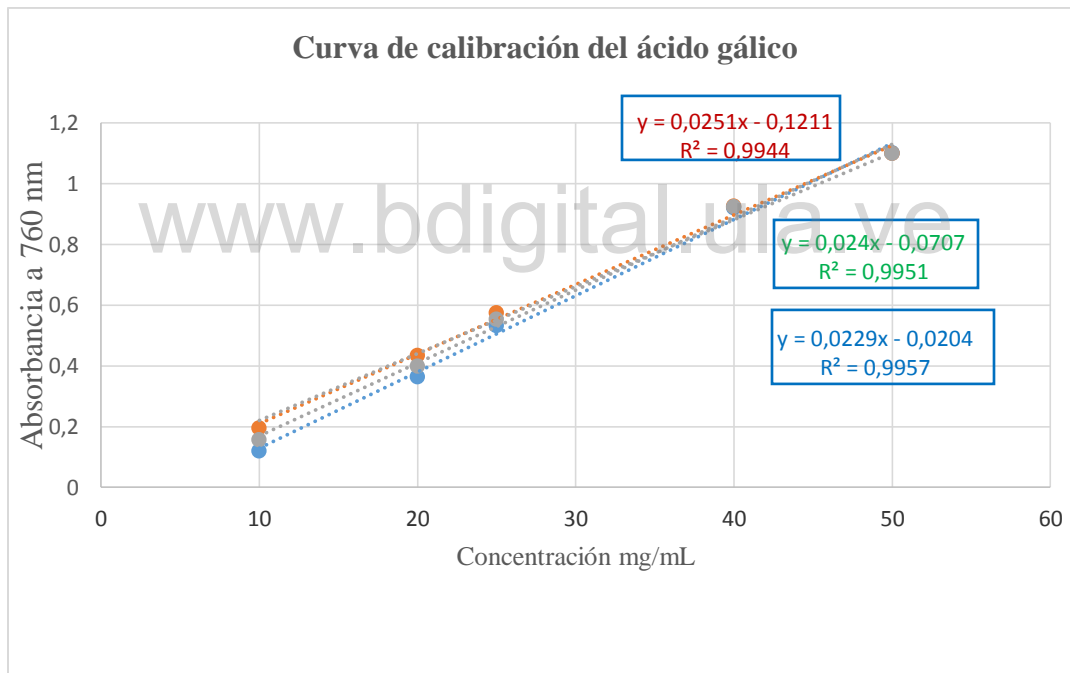


Gráfico 1. Curva de calibración de ácido gálico

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 partes aéreas de *Bixa orellana* L., fueron reemplazados en la ecuación,

pudiéndose determinar el contenido total de fenoles. En este estudio, el contenido de fenoles totales de los extractos etanólicos, de las partes aéreas de *Bixa orellana* L., se corresponde a $0,89 \pm 0,07 \mu\text{g AG/mg}$ de extracto seco (Tabla 12).

Tabla 12.

Cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de Bixa 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 %.

Estudio estadístico

En la Tabla 13, se muestra el estudio estadístico de la cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L. y en la Tabla 14, el análisis de varianza ANOVA.

Tabla 13.

Estudio estadístico de la cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de Bixa orellana L.

		Absorbancia 760 nm	Concentración µg de Ácido gálico / mg de extracto
N	Válidos	3	3
	Perdidos	0	0
Media		1,1410	0,8933
Error típ. de la media		0,00058	0,04910
Mediana		0,1360	0,8600
Desv. Típ.		0,00100	0,8800
Varianza		0,000	0,04359
Rango		0,00	0,002
Mínimo		0,14	0,08
Máximo		0,14	0,81

Tabla 14.

Análisis de varianza de la cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de Bixa orellana L.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cudrática	F	Sig.
Regresión	0,002	1	0,002	1,815	0,407
Residual	0,001	1	0,001		
Total	0,004	2			

La variable independiente es absorbancia 760 nm.

La variable dependiente es concentración µg de Ácido gálico/ mg de extracto

Son pocos los trabajos de investigación que reportan el contenido de polifenoles totales en la especie *B. orellana* L., sin embargo, Guimet (2012), evaluó la concentración de polifenoles totales, del extracto de las hojas de *Bixa orellana* L. en ocho morfotipos, recolectados en Perú. El morfotipo 3, fue el que presentó mayor cantidad de polifenoles, equivalente a $48,72 \pm 0,36$ mg de catequina (CTQ)/100 g, y el que tuvo menor cantidad fue

el morfotipo 4 con $43,45 \pm 0,52$ mg de CTQ/100 g. Presentando menor cantidad de polifenoles que el reportado en nuestro estudio, donde la concentración de polifenoles totales, del extracto etanólico de las partes aéreas de *B. orellana* L. fue de $0,86 \mu\text{g}$ de ácido gálico/mg de extracto (86 mg AG/100 g de extracto), esta diferencia se puede deber a la edad de la planta, desarrollo, factores extrínsecos como la temperatura, humedad, calidad del suelo, el clima y por factores intrínsecos a nivel genético, que inciden directamente en la producción de metabolitos secundarios (Sharapin, 2000).

Además, Cabrera y col. (2017), encontraron que los metabolitos secundarios varían de acuerdo a la edad de la planta, demostrando que el estado de desarrollo de éstas 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.

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 2008).

Valares (2011), afirmó, que la diferencia de factores climáticos en la síntesis de metabolitos secundarios como flavonoides, terpenos y fenoles, podrían deberse, a que, en la mayoría de los ecosistemas, existen grandes diferencias, en las variables meteorológicas a lo largo del año e interanualmente. Esto es muy importante al afectar la variabilidad temporal en la producción de metabolitos secundarios.

Jahangir, Abdel, Kim, Choi y Verpoorte, (2009), mostraron que 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.

Actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH.

La actividad antioxidante fue determinada por el método DPPH, previamente se realizó un barrido inicial con los extractos hexanólico diclorometanoico y etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L., con el fin de conocer si estas presentaban potencial antioxidante. En la Tabla 15, se muestran los resultados, de la determinación del porcentaje de inhibición (% I) del radical DPPH, de los diferentes extractos (barrido inicial) a una concentración de 4mg/mL.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 15.

*Determinación del potencial antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *Bixa orellana* L. a una concentración de 4 mg/mL.*

Extractos	517 nm			Media	% Inhibición
	Primera lectura	Segunda lectura	Tercera lectura		
Hexanólico	0.475	0.481	0.481	0.479	20, 0
Diclorometanoico	0.152	0.166	0.163	0.160	73, 3
Etanólico	0.108	0.117	0.115	0.113	81, 1
DPPH	0,599	0,599	0,599	0,599	

El potencial antioxidante fue calculado utilizando la siguiente ecuación

$$\% \text{ Inhibicion} = \frac{(\text{Absorbancia DPPH} - \text{Absorbancia Muestra})}{(\text{Absorbancia DPPH})} \times 100$$

Extracto hexanóico

$$\%I = \frac{(0,599 - 0,479)}{(0,599)} \times 100 = 20,03 \%$$

Extracto diclorometanoico

$$\%I = \frac{(0,599 - 0,160)}{(0,599)} \times 100 = 73,28 \%$$

Extracto etanólico

$$\%I = \frac{(0,599 - 0,113)}{(0,599)} \times 100 = 81,13 \%$$

Realizado el barrido inicial se pudo evidenciar que el extracto hexanóico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L. presentó un % de inhibición del radical DPPH, por debajo de 50 %, por lo que, se descartó, por no presentar, actividad antioxidante importante, a diferencia de los extractos diclorometanoico y etanólico que presentaron un % de inhibición del radical DPPH, mayor a 50 %, indicando que tienen actividad antioxidante.

Actividad antioxidante de los extractos etanólico y diclorometanoico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L. por el método DPPH.

En la Tabla 16, se muestran los resultados de % inhibición del radical DPPH, correspondiente a la curva patrón del ácido ascórbico y en el Gráfico 2, se muestra la curva de calibración del ácido del ácido ascórbico.

Tabla 16

Curva patrón de ácido ascórbico

[] µg/mL	Absorbancia			Promedio λ	DE	%I
	λ ₁	λ ₂	λ ₃			
176	0,022	0,022	0,029	0,024	0,0	95,6
100	0,044	0,038	0,031	0,038	0,01	93,9
75	0,16	0,162	0,172	0,165	0,01	73,4
50	0,271	0,304	0,291	0,289	0,02	53,4
25	0,461	0,463	0,456	0,460	0,0	25,7
DPPH	0,62	0,619	0,619	0,619	0,0	
Blanco	0,062	0,061	0,067			

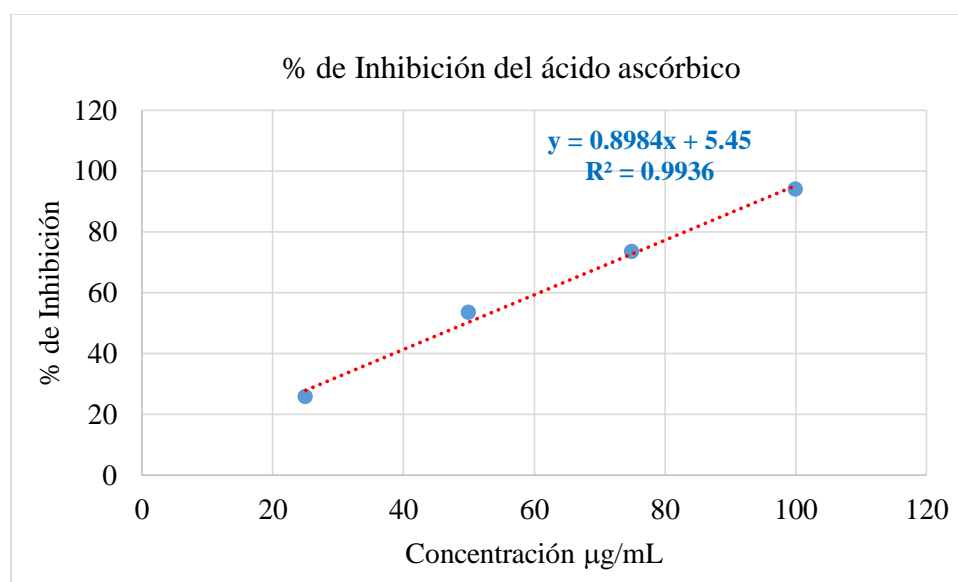


Gráfico 2: Porcentaje de inhibición (% I) del ácido ascórbico.

Porcentaje de inhibición del extracto etanólico y diclorometanoico, de las partes aéreas de *Bixaorellana* L.

La actividad antioxidante se determinó en los extractos etanólico y diclorometanoico de las partes aéreas de *Bixa orellana*L., a través del método DPPH, en la Tabla 17, se muestran los resultados de % I del radical DPPH, obtenidos en los extractos etanólico y diclorometanoico, de las partes aéreas de *Bixaorellana* L.

Tabla 17.
Actividad antioxidante de los extractos etanólico y diclorometanoico de las partes aéreas de Bixa orellana L.

Concentración (mg/mL)	% I Etanol	% I Diclorometano
0,025	10,7 ± 0,4	5,9 ± 0,2
0,05	17,4 ± 0,4	8,5 ± 0,6
0,1	26,5 ± 0,4	nd
0,15	39,7 ± 0,3	14,4 ± 0,3
0,25	64,2 ± 0,2	19,2 ± 0,7
0,5	87,1 ± 0,1	31,0 ± 0,1
0,176	95,6 ± 0,0	95,6 ± 0,0

nd= no determinado. Existen diferencias estadísticas significativas entre datos ($p > 0,05$), con un nivel de confianza de 95 %

En el Grafico 3, se muestra el porcentaje de inhibición (%I) del radical DPPH, por los componentes químicos presentes en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixaorellana* L, comparado con el %I del ácido ascórbico a la concentración de 0,176 mg/mL.

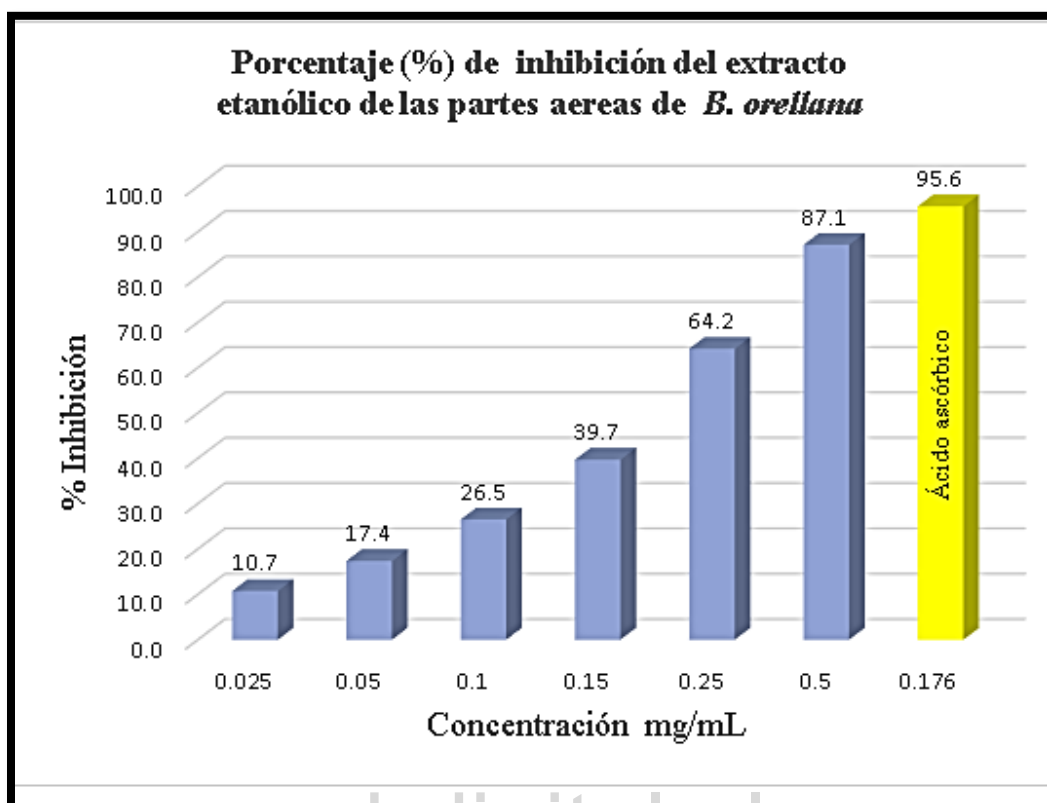


Grafico 3. Porcentaje de inhibición del extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixaorellana*L.

Se pudo observar y comprobar que el extracto etanólico, de las partes aéreas de *B. orellana* L., a su máxima concentración de dilución 0,5 mg/mL, mostró un porcentaje de inhibición de los radicales DPPH de $87,1 \pm 0,1$, muy cercano al % I del ácido ascórbico, utilizado como control positivo, que fue de 95,6 a la concentración de 0,176 mg/mL (Grafico 3).

Estudio estadístico

En la Tabla 18, se muestra los datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

Tabla 18.

Datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto etanólico, de las partes aéreas de Bixa orellana L.

		Concentración mg/mL	% Inhibición
N	Válidos	6	6
	Perdidos	0	0
Media		0,1792	40,9333
Error típ. de la media		0,07200	12,04217
Mediana		0,1250	33,1000
Moda		0,03 ^a	10,70 ^a
Desv. típica.		0,17636	29,49716
Varianza		0,031	870,083
Rango		0,48	76,40
Mínimo		0,03	10,70
Máximo		0,50	87,10
Suma		1,08	245,60

a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.

En la Tabla 19, se muestran los análisis de varianza ANOVA de una sola vía de la actividad antioxidante del extracto etanólico, de las partes aéreas de *Bixa orellana L.*

Tabla 19.

Análisis de varianza ANOVA de una sola vía de la actividad antioxidante del extracto etanólico, de las partes aéreas de Bixa orellana L.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	4128,536	1	4128,536	74,429	0,001
Residual	221,877	4	55,469		
Total	4350,413	5			

La variable independiente es concentración (mg/mL).

La variable dependiente % de inhibición (% I).

En el Grafico 4, se muestra el porcentaje de inhibición (% I) del radical DPPH, del extracto diclorometanoico, de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.comparado con el % I del ácido ascórbico a la concentración de 0,176 mg/mL.

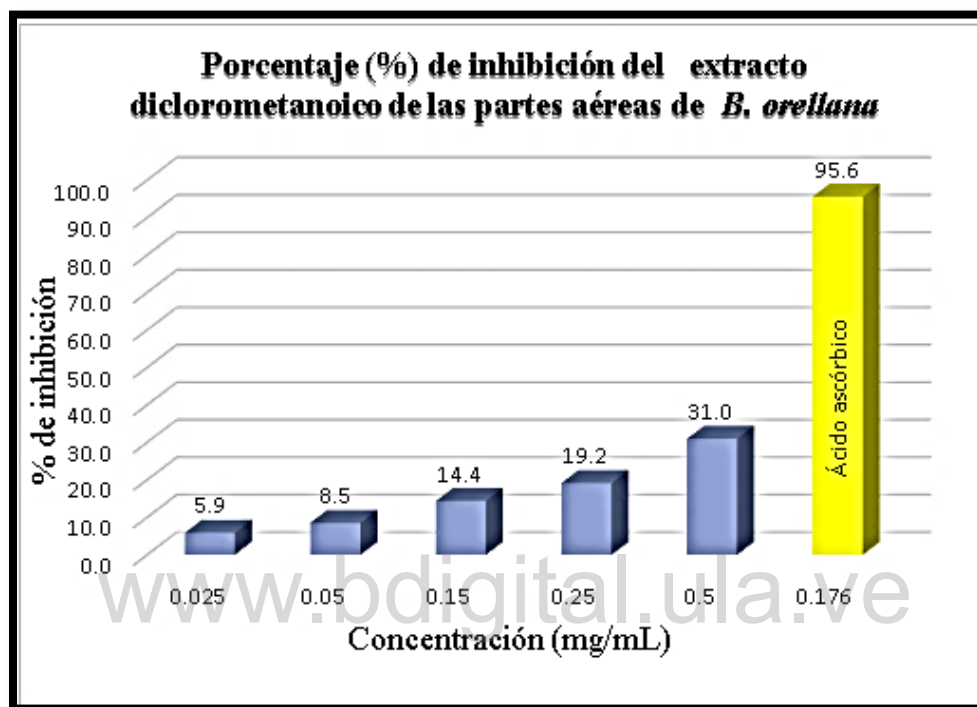


Grafico 4. Porcentaje de inhibición del extracto diclorometanoico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

Según los resultados, se pudo observar que la capacidad antioxidante del extracto diclorometanoico es moderada, ya que a su máxima concentración de dilución el porcentaje de inhibición fue de $31,0 \pm 0,1$, en comparación a 95,6 del ácido ascórbico utilizado como control positivo (Grafico 4).

En la Tabla 20, se muestra los datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto diclorometanoico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

Tabla 20.
Datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto diclorometanoico, de las partes aéreas de Bixa orellana L.

		Concentración mg/mL	% Inhibición
N	Válidos	5	5
	Perdidos	1	1
Media		0,1950	15,8000
Error típico. de la media		0,08602	4,44893
Mediana		0,1500	14,4000
Moda		0,03 ^a	5,90 ^a
Desv. típ.		0,19235	9,94812
Varianza		0,037	98,965
Rango		0,48	25,10
Mínimo		0,03	5,90
Máximo		0,50	31,00
Suma		0,98	79,00

a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.

En la Tabla 21, se muestran el análisis de varianza ANOVA, de una sola vía de la actividad antioxidante del extracto diclorometanoico, de las partes aéreas de *Bixa orellana*L.

Tabla 21.

Análisis de varianza ANOVA de una sola vía de la actividad antioxidante del extracto diclorometanoico, de las partes aéreas de Bixa orellana L.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	393,100	1	393,100	427,237	0,000
Residual	2,760	3	0,920		
Total	395,860	4			

La variable independiente es concentración (mg/mL).

La variable dependiente % de inhibición (% I).

Comparación del porcentaje (%) de inhibición, de los extractos etanólico y diclorometanoico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

En el Grafico 5, se muestra la comparación del porcentaje de inhibición (% I) de los extractos etanólico y diclorometanoico de las partes aéreas de *Bixa orellana*L.,a las diferentes concentraciones.

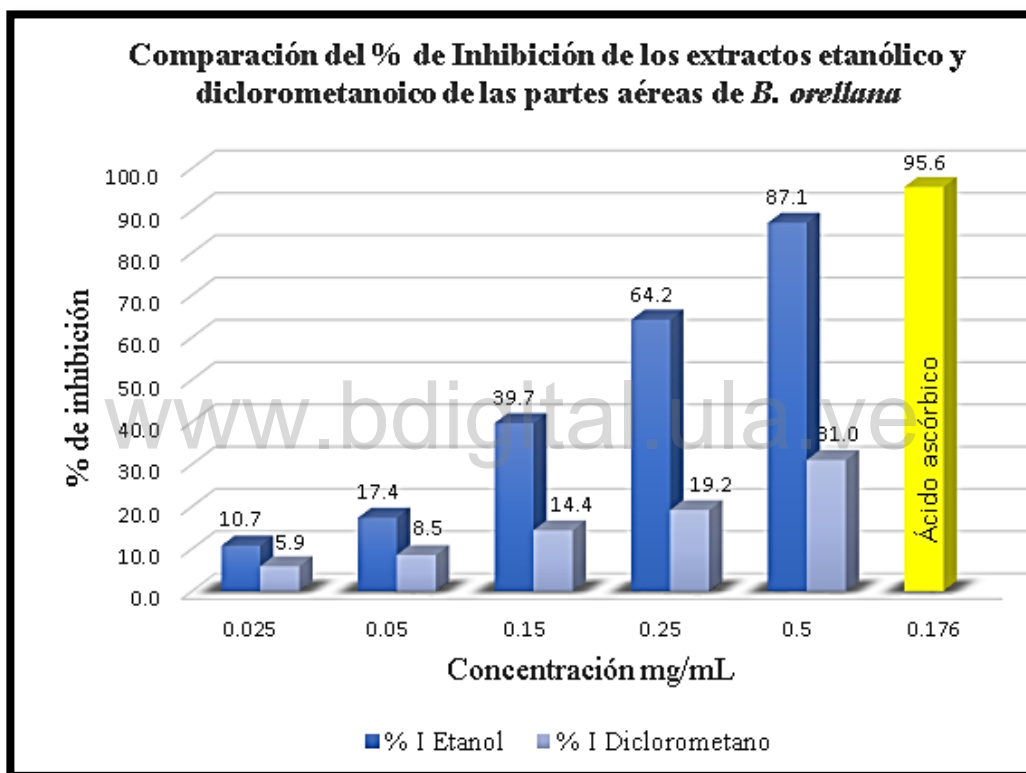


Gráfico 5. Porcentaje de inhibición (% I) de los extractos etanólico y diclorometanoico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

En base a los datos obtenidos, se puede inferir que el extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L. presentan una mayor actividad antioxidante, con un porcentaje de inhibición por encima del 50 %, de igual manera el extracto diclorometanoico presenta una actividad antioxidante moderada si se compara con el ácido ascórbico.

Concentración eficiente 50 (IC₅₀) en mg/mL, (n =3) de los extractos etanólicos y diclorometanoicos de las partes aéreas de *Bixa orellana*L.

En este estudio cabe aclarar, que la determinación de la concentración eficiente 50 (mg/mL) de los extractos etanólicos y diclorometanoicos de las partes aéreas de *Bixa orellana*L., 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 $x = IC_{50}$. En la Tabla 18, se muestran los valores de IC₅₀ (n = 3). Para los extractos etanólicos y diclorometanoicos.

En este estudio, el extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L, dio un IC₅₀ de 0,26 mg/mL y el extracto diclorometanoico 0,87 mg/mL. (Tabla 22 y Gráfico 6).

Tabla 22.

IC₅₀ de los extractos etanólico y diclorometanoico de las partes aéreas de Bixa orellana L.

Extracto	Recta	Pendiente	corte	R ²	IC ₅₀ mg/mL	Promedio IC ₅₀	DE
Etanólico	1	156,660	8,9276	0,9978	0,26	0,26	0,01
	2	152,4500	12,2660	0,9913	0,25		
	3	155,8300	9,1787	0,9978	0,26		
Diclorometanoico	1	47,2450	7,4423	0,9975	0.90	0,87	0,02
	2	51,8660	5,4293	0,9913	0,86		
	3	52,0970	5,6350	1,9911	0.85		

En el Gráfico 6, se muestra la IC₅₀, de los extractos etanólico y diclorometanoico, de las partes aéreas de *Bixa orellana* L.

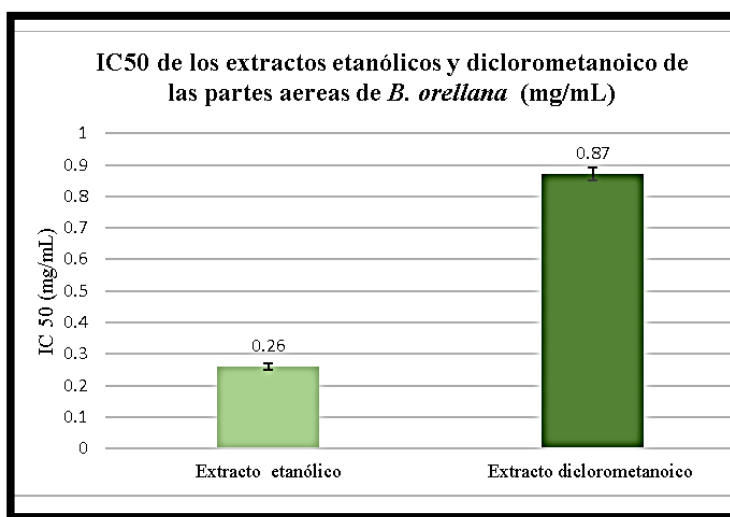


Gráfico 6. IC₅₀ de los extractos etanólico y diclorometanoico, de las partes aéreas de *Bixa orellana*. L.

Esta investigación difiere a lo reportado por Meñaca y col. (2018), quienes, evaluaron la actividad antioxidante de los extractos de las semillas de *Bixa orellana* L. mediante el método de DPPH, encontrando que los extractos presentaron una concentración inhibitoria IC₅₀ de 23,55; 28,76; 37,23; 81,09 y 193,82 $\mu\text{g/mL}$, los resultados obtenidos mostraron que los extractos de la semilla de *Bixa orellana* L. tienen potencial antioxidante. En nuestro estudio la concentración inhibitoria IC₅₀ de los extractos de las partes aéreas de *Bixa orellana* L., para captar radicales libres, fue: extracto etanólico 0.26 mg/mL (260 $\mu\text{g/mL}$) y diclorometanoico 0,87 mg/mL (870 $\mu\text{g/mL}$). Si comparamos ambos estudios, los extractos en nuestro estudio presentan una menor actividad antioxidante, ya que a mayor IC₅₀, menor % de inhibición del radical DPPH.

Esta diferencia, puede deberse principalmente a la diferencia de la parte de la planta de donde se obtuvieron los extractos, a la variedad del fruto, el lugar de cosecha, la altura, las condiciones del suelo, el clima, los nutrientes y el estado de madurez, entre otros factores

que influyen al momento de realizar un análisis. Olivares y col. (2016), demostraron que el grado de madurez de los frutos influye en el contenido de compuestos bioactivos tales como ácido ascórbico, fenólicos totales, carotenoides totales; así como en la capacidad antioxidante

Por otra parte, Guimet (2012), evaluó la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos de las hojas de *Bixa orellana* L. en 8 morfotipos existentes recolectados en Perú. El morfotipo 5 fue el que presentó mayor porcentaje de inhibición frente al radical DPPH con $86,17 \pm 0,61$ %, y el de menor porcentaje de inhibición fue el morfotipo 3 con $79,90 \pm 1,26$, estos resultados difieren de nuestra investigación, donde el extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L. presentó un porcentaje de inhibición de $87,1 \pm 0,1$ y el diclorometanoico fue de $31,0 \pm 0,1$, En el caso del extracto etanólico, este presentó mayor capacidad para inhibir el radical DPPH, que lo reportado por Guimet (2012).

Esta diferencia puede deberse a la luz, que es posiblemente el factor de mayor significación, está estrechamente relacionada con la temperatura y varía con la estación del año. La luz favorece el crecimiento de los tejidos jóvenes etapa en la cual ocurre la acumulación de los principios activos. De igual manera, la temperatura también juega un papel importante en la producción de metabolitos secundarios, influye grandemente en el crecimiento acelerado, en el equilibrio entre el proceso de fotosíntesis y respiración, por consiguiente, en la producción de los principios activos (Acosta, 2003).

Actividad garrapaticida del extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L. contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, a través del método Prueba de paquete de larvas (PPL).

La actividad garrapaticida del extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L. contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, se realizó por triplicado ($n = 3$), a través del método Prueba de paquete de larvas (PPL) (FAO, 2004). Y mostró un % de mortalidad de 0 %, es decir todas las larvas sobrevivieron al tratamiento con el extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L., al 20 %, en solución acuosa de Tween 80 (2 %).

En la Tabla 23, se muestra el porcentaje (%) de mortalidad de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, tratada con el extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L. al 20 %, en solución de Tween 80 al 2 %.

Tabla 23.

*Porcentaje de mortalidad de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, tratada con el extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L. al 20 %, en solución acuosa de Tween 80 al 2 %.*

Muestra	Especie vegetal	% mortalidad ₁	% mortalidad ₂	% mortalidad ₃
Extracto etanólico	<i>Bixa orellana</i> L.	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0
Solución de Tween 80 en agua destilada (2 %)	<i>Bixa orellana</i> L.	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0
Ivermectina 0,1 %	<i>Bixa orellana</i> L.	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0

Las determinaciones se realizaron por triplicado ($n = 3$), los resultados se muestran con % mortalidad \pm SD, control negativo (Solución de Tween 80 en agua destilada al 2 %), control negativo (Ivermectina 0,1 %).

De acuerdo a los resultados obtenidos, el extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L., no tuvo actividad sobre las larvas de *R. microplus*, es decir, resultó ser inocuo, reportando 0 % de mortalidad de las larvas (Tabla 23).

En varias partes del mundo, se han evaluado extractos de aproximadamente 55 especies de plantas pertenecientes a 26 familias contra *R. (Boophilus) microplus* (Borges, Sousa y Barbosa, 2011). Entre las especies reportadas con actividad garrapaticida contra *R. microplus* tenemos: *Trachyspermum ammi* (Zaman y col., 2012); *Melia azedarach* (Borges, Ferri, Silva, Silva, Silva, 2003); *Azadirachta indica* (Yaguana, 2016); *Palicourea marcgravii* (Silva y col., 2011); *Manilkara zapota* (Rajakumar y Rahuman, 2012), entre otros, sin embargo, podemos decir que no se ha reportado hasta la actualidad, el uso de la especie *Bixa orellana* L. para el control de *R. microplus*.

En nuestro estudio, el extracto etanólico, de *Bixa orellana* L., mostró la presencia de alcaloides, esteroides y polifenoles y hubo ausencia de metabolitos secundarios como cumarinas, flavonoides, taninos, saponinas. Según (Makkar y Singh, 1995), los taninos pueden ser tóxicos para las bacterias.

Es importante mencionar que, Tingo (2011), evaluó los extractos de (*Sapindus saponaria*) que muestra efectividad superior al 75% en mortalidad de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, se fundamentó en el hecho de que el fruto de esta planta (*Sapindus saponaria*) contiene metabolitos secundarios como la saponina, que es una saponina, se ha demostrado que las saponinas, estimulan la penetración de compuestos tóxicos en las células generando una acción sinérgica (Abreu, 2005; Tsuzuki y col., 2007).

Se puede inferir que, el extracto etanólico de *Bixa orellana* L., no presentó actividad contra las larvas de *R. microplus*, ya que en el estudio fitoquímico, no demostró la presencia de taninos, saponinas y otros metabolitos, a los que se le reportó actividad garrapaticida.

Sin embargo, podemos decir que a la especie *Bixaorellana*L. se le ha atribuido otras propiedades medicinales en animales domésticos. Burga (2016), afirmó, que esta especie ha sido usada para el hongo de cerdos y aves, así mismo, Rodríguez, Torres y Valenzuela (2005), reportaron que también se aplica para la coriza infecciosa en gallinas, producida por *Avibacterium paragallinarum*. Esto nos alertó sobre la importancia de esta especie para tratar ciertas afecciones en animales y quisimos probar la efectividad del extracto polar de las partes aéreas de esta especie sobre la larva de la garrapata del ganado vacuno, que tantas pérdidas económicas causan en nuestro país, latinoamérica y el resto del mundo. Sin embargo, no logramos demostrar que tenga actividad sobre larvas de *R. microplus*.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- Los extractos hexanoico y diclorometanoico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L. mostraron la presencia de esteroides, y el extracto etanólico, alcaloides, esteroides y polifenoles.
- El contenido de fenoles totales del extracto etanólico, de las partes aéreas de *Bixa orellana* L., fue de $0,89 \pm 0,07$ μg AG/mg de extracto seco.
- Los extractos etanólico y diclorometanoico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L. presentaron un % I, de $87,1 \pm 0,1$ y $31,0 \pm 0,1$, respectivamente, con una concentración inhibitoria IC_{50} de 0,26 mg/mL el extracto etanólico y 0,87 mg/mL el diclorometanoico.
- El extracto etanólico de las partes aéreas de *Bixa orellana* L., no mostró actividad sobre las larvas de *R. (Boophilus) microplus*, con 0 % de mortalidad de las mismas.

Referencias Bibliográficas

- Abbott, W. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265-267.
- Abreu, O. (2005). Potencial medicinal del género *Sapindus* L. (Sapindaceae) y de la especie *Sapindus saponaria* L. *Rev. Cuba. Plantas Med*, 10(3-4), 1-10.
- Acosta, L. (2003). Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. *Rev Cuba. de plantas medicinales*, 8(1).
- Ainsworth EA, Gillspie KM. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *NAt protoc*, 2(4), 875-877.
- Alamed, J., Chaiyasit, W., McClements, D., y Decker, E. (2009). Relationships between Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity in Foods. *J Agr Food Chem*, 57(7), 2969-2976.
- Albornoz, A. (1980). *Productos Naturales: Estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Caracas, Venezuela: Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela.
- Alvarado, L. (1996). Estado actual de la garrapata del bovino, *Boophilus Microplus*, en Venezuela. *Gaceta de Ciencias Veterinarias* 1, 67-74.
- Andersonw, S., Nair, M., Chandra, A., y Morrison, E. (1997). Supercritical fluid carbon dioxide extraction of annatto seeds and quantification of trans-bixin by high pressure liquid chromatography. *Phytochem Anal*, 8, 247-9.

- Arguedas, P., Mora J., y Sanabria J. (2015). Comparación del contenido de carotenoides en productos nutraceuticos elaborados a partir de dos variedades de camote y yuca. *Tecnología en Marcha*, 28(4), 42-53.
- Arias, F. (2012). *El proyecto de la investigación. Introducción a la metodología científica* (6ta edición). Caracas, Venezuela: Editorial Episteme.
- Ávalos, A., y Pérez E. (2009) Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2(3), 119-145.
- Barros, D., y Domínguez, L. (2013). Identificación preliminar de los fitoconstituyentes y cuantificación de flavonoides totales en las hojas de *Bixa orellana* (achiote). Tesis, Universidad Central de Trujillo-Perú
- Bello, J. (2005). *Calidad de vida, alimentos y salud humana: Fundamentos científicos*. Madrid, España: Ediciones Díaz Santos.
- Borges, M., Sousa, A., y Barbosa, D. (2011). Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev. Brasileira de Parasitologia Veterinária* 20(2), 89–96.
- Borges, M., Ferri, H., Silva, J., Silva, C., Silva, G., (2003). *In vitro* efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. *Med Vet Entomol*, 17, 228-231.
- Burga, P., (2016). *Identificación de especies de plantas medicinales usadas en la fitoterapia de animales domésticos, en la ciudad de Jenaro herrera, bajo Ucayali, Loreto*. (Tesis de Pregrado). Iquitos, Perú: Universidad Nacional De La Amazonia Peruana Facultad De Agronomía Escuela Profesional De Agronomía.
- Busvine, J. (1971). *Techniques for Testing Insecticides*. 2nd Ed. C.A.B: England.

- Cabrera, J., Jaramillo, C., Dután, F., Cun, J., García, P., y Rojas, L. (2017). Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam. En función de su edad y altura. *Bioagro*, 29(1), 53-60.
- Cantú, A., y García, Z. (2013). Estrategias para el control integrado de garrapata (*Boophilus* spp.) en la producción de bovinos de carnes en pastoreos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*.
- Capuron, R. (1963). Contributions à l'étude de la flore de Madagascar. *Ecueil Périodique D'observations Botanique*,3(386), 370-400.
- Carrión, J., y García, C. (2010). *Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica* (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Ecuador.
- Castañeda, B., Llica, E., y Vásquez, L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas peruanas. *Horizonte Médico*, 8(1).
- Catillo, G. (2009). Una especie en peligro de extinción. *Investigación Iutagista*, 2(2), 11-16.
- Contreras, M., Diaz, L., Celis, M., Rojas, J., Mendez, L., Rosenzweig, P., y Ontiveros, J. (2017). Actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de *Pimenta racemosa* var., *racemosa* (Mill.) J.W. Moore (Myrtaceae) de Táchira – Venezuela. *Rev Ciencia e Ingeniería*, 38(3), 1-14
- Cordero de Campillo, M., Rojo F., Martínez A., Sánchez A., Hernández R., Navarrete L., Diez B., Quiroz R., y Carvalho V., (1999). *Parasitología Veterinaria*. 1a ed. en español. Madrid, España: McGraw-Hill. Recuperada en: dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=489596.

- Costa, M., y col. (2008). “Genetic improvement through *in vitro* propagation in annatto (*Bixa orellana* L.)”. In: Thangadurai, D., Tripathi, L., Vasanthaiah, H., Cantu', D.J. (Eds.), *Crop Improvement and Biotechnology. Bioscience Publications*, 39-57.
- Crozier, A., Jaganath, I., y Clifford, M. (2006). “Phenols, polyphenols and tannins: an overview”. In: Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (Eds.), *Plant Secondary Metabolites Occurrence Structure and Role in the Human Diet*. Chennai, India: Blackwell Publishing.
- Cruz, A., da Costa, M., Otoni, W., (2008). “Aspectos gerais da cultura e beneficiamento do urucum”. In: Stringheta, P., Silva, P., (Eds.), *Pigmentos de urucum: extração, reações químicas, usos e aplicações*: Gráfica e Editora Suprema, Viçosa, (pp. 11-23).
- Cruz, J., Domínguez J., Domínguez H., y Parajó, J. (2001). Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lygnocellulosic materials. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(5), 2459-2464.
- De Oliveira Júnior RG, Bonnet. A., Braconnier, E., Groult, H., Prunier, G., y Beaugeard, L. (2019). Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 125, 549–561.
- Díaz-Ungría C. (1971). *Parasitología de los Animales Domésticos en Venezuela*, Ed. LUZ, Maracaibo, Venezuela, 806.
- Domingo, D., y López, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4), 385-393.

- Drummond, R., Graham, O., Ernest, S., (1967). Evaluation of insecticides for the control of *B. annulatus* (Say) and *B. microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae) on cattle. *International Congress on Acarology*. 493-498.
- Duke, J., Bogenschutz, M., duCellier, J., Duke P. (2003). *Handbook of Medicinal Spices*. Boca Raton, USA: CRC Press.
- FAO, (2004). Resistance management and integrated parasite control in ruminants-guidelines, module I-Ticks: acaricide resistance-diagnosis, management and prevention. Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division, Rome, pp. 25-77.
- FAO, (2003). Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Dirección de Producción y Sanidad Animal de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. Recuperado de: www.fao.org/docrep/006/y4813s/y4813s03.htm.
- Fernández, A., Mendiola, J., Acuña, D., Scull, R., y Gutiérrez, Y. (2011). Actividad antimalárica de un extracto hidroalcohólico de *Bixa orellana* L. *Rev. Cubana Med Trop.* 63(2).
- Flores, V., Castañeda, O., Montiel, T., y Hernández, G. (2014). Análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de hojas de *Hemiphylacus novogalicianus*, una especie endémica de México. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 63, 18-23.
- Forti, S., da Silva, N., Neves, E., Alves, L., Peixoto D., y Dos Santos, J. (2010). Ação de extrato e óleo de nim no contro de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) Acari: Ixodidae em laboratório. *Rev Brasileira Parasi Vet*, 19(1), 44-8.

- Fragoso, S., Ortiz, E., Labra, V., Ortiz, N., Rodríguez, M., Redondo, M., Fuente, J., y Hernández, P. (1999). Evaluación de la vacuna contra la garrapata Bm86 (Gavac) para el control de *Boophilus microplus*. *Memorias de IV Seminario Internacional de Parasitología Animal*. Puerto Vallarta, Jalisco, México, 47-50.
- Frega, N., Mozzon, M., y Bocci, F. (1998). Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gas chromatography-mass spectrometry. *J Am Oil Chem Soc*, 75, 1723-7.
- Frontera W., Herring, S., Micheli, L., y Silver, J. (2008). *Medicina deportiva clínica. Tratamiento médico y rehabilitación*. Madrid, España: Editorial Elsevier.
- Galindo, V., Lubran, M., y Rankin, S. (2002;2010). Comparison of the volatile compounds in water- and oil-soluble annatto (*Bixa orellana* L.) extracts. *J Agric Food Chem*, 50(5). www.bdigital.ula.ve
- García, C., Martínez A., Ortega, L., y Castro F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química viva*, 9(2).
- García, E., Fernández, I., y Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. *ETSIAMN*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Gershenzon, J. (1984). Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. *Recent Advances in Phytochemistry*, 18, 273-320.
- Giacomo, N. (1960). *Enciclopedia Botanica Motta*. Milan, Italia: Federico Motta
- Giuliano, G., Rosati, C., y Bramley, P. (2003). To dye or not dye: biochemistry of annatto unveiled. *TRENDS in Biotechnology*. 21(12), 513-6.

- Grougnet, R., Guedes, J., Alves, C., y Picot, L. (2019). Bixin an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L. sensitizes human melanoma cells to dacarbazina- induced apoptosis trough ros-mediated citotoxicity. *Food and chemical toxicology*, 125, 549-561.
- González, A. (2004). *Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas*. Universidad Nacional de Manizales, Colombia.
- Govaerts, R., (2019). Lista mundial de Arecaceae. *Royal Botanic Gardens*. Recuperado de: Internet; <http://wcsp.science.kew.org/>.
- Guija, E., Inocente, M., Ponce, J., y Zarzosa, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico*, 15(1), 57-60.
- Guimet, R., (2012). *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 Amazonía Peruana Facultad De Farmacia Y Bioquímica, Iquitos-Perú.
- Gunther, K. (1986). *Amoreuxia wrighti* A. Gray (Cochlospermaceae) Neuful Cuba. *Feddes Repert*, Berlín, Alemania 97(1-2), 73-78.
- Gutiérrez, A., Ledesma, L., Gracia, I., Grajales, O. (2007). Capacidad Antioxidante Total en Alimentos Convencionales y Regionales de Chiapas, México. *Revista Cubana de Salud Pública*, 1-8.
- Haminiuk, C., Maciel G., Oviedo M., y Peralta, R. (2012). Phenolic compounds in fruits - an overview, *Int. J. Food Sci. Technol*, 47(10), 2023-2044.

- Hamzah, J., Skinner, A, TS., y Davis, T. (2003) *In vitro* antimalarial activity of retinoids and the influence of selective retinoic acid receptor antagonists. *Acta Trop*, 87(3), 345-53.
- Harborne, J. (1975). Flavonoid bisulphates and their co-occurrences with ellagic acid in the Bixaceae, Frankeniaceae and related families. *Phytochemistry*, 14, 1331-7.
- Heimerdinger, A., Olivo, J., Molento, B., Agnolin, A., Ziech, F., Scaravelli, F., Charão, S., (2006). Extrato alcohólico de Capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) no controle do *Boophilus microplus* em bovinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 15(1), 37-39.
- Heng, L., Vincken, J., Hoppe, K., van Koningsveld, G., Decroos, K., Gruppen, H., an Boekel, M., y Voragen, A. (2006). Stability of pea DDMP saponin and the mechanism of its decomposition, *Food Chemistry*, 99(326).
- Hernández, F., (1986). Garrapatas (Acarina: Ixodoidea). Del ganado bovino y controles utilizados en el Distrito Perijá Estado Zulia, Venezuela. Univ. Del Zulia.
- Hernández, F. (1978). Garrapatas (Acarina: Ixodoidea) del ganado bovino y algunos aspectos de su control en el distrito Urdaneta, Estado Zulia, (Trabajo de ascenso). Venezuela. Univ del Zulia.
- Hernández, R., Fernández, C., y Batista, P. (2010). Metodología de la investigación (5ta edición). D.F, México: Editorial McGrawHil.
- Herrerías, J., Díaz, A., y Jiménez, M. (1996). *Tratado de Hepatología*. Sevilla, España: Universidad de Sevilla, Secretariado de publicaciones.
- Heywood, V. (1985). Las Plantas con Flores. Ed. Reverté S.A. Barcelona. *Rev. De la Facultad de Ciencias Básicas*, 5(1), 27-34.

- Holdsworth A., Kemp, D., Green, P. (2006). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants. *Veterinary Parasitology*, 136, 29–43.
- Hurtado, J., (2010). *El Proyecto de Investigación*. Caracas, Venezuela: Quirón Ediciones.
- Isea, G., Rodríguez, I. y Hernández, A., (2013). Actividad garrapaticida de *Azadirachta indica* A. Juss. (Nim). *Revista Cubana de plantas medicinales*, 18(2).
- Jahangir, M., Abdel, I., Kim, H., Choi Y., Verpoorte R. (2009). Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. *Environ Exp Bot*, 67(1), 23-33.
- James, M., Coronado, A., López, W., Melendez, R., y Ristic, M. (1985). Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. *Tropical Animal Health and Production*, 17, 9-18.
- Jondiko, I., y Pattenden, G. (1989). Terpenoids and an apocarotenoid from seeds of *Bixa orellana*. *Phytochemistry*, 28, 3159-3162.
- Krinsky, N., Beecher, G., Burk, R., Chan, A. (2000). Dietary Reference Intakes (DRIs) for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Bibliografía 42 Caratenoids. Washington, USA: National Academy Press.
- Kuklinski, C., (2003). Nutrición y bromatología. Barcelona. *Omega*, 84, 282-1330.
- Lawrence, B., y Hogg J. (1973). Ishwarane in *Bixa orellana* leaf oil. *Phytochemistry*, 12, (2995).
- Leal, F., y Clavijo, C., (2010). Acerca de la historia, taxonomía como botánica y uso de *Bixa orellana* L. *Rev. Unell Cienc Tec*, 28, 78-76.
- López, M, 1999. El neem y sus bioinsecticidas, una alternativa agroecologica.

- López, A., Villar, D., Chaparro R., Miller, J., y Perez A. (2015). Reduced efficacy of comercial acaricides against populations of resistant cattle tick *Rhipicephalusmicroplus* from two municipalities of Antioquia, Colombia. *Environmental Health Insights Suppl*, 2, 71–80. Recuperado de: (doi:10.4137/EHI.S16006).
- Lourido, H., y Martínez, G., (2010). La *Bixa orellana* L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. *Rev. Cuba. de Farm.*, 44(2), 231-244.
- Makkar, P., y Singh, B. (1995). Determination of condensed tannins in complexes with fiber and proteins. *Journal of the science of food and agriculture*, 69(1), 129-132.
- Marcano, D., y Hasegawa, M., (2002). *Fitoquímica Orgánica*, Caracas- Venezuela: Universidad Central de Venezuela.
- Martínez, A., Valencia, G., Jiménez, N. y Galeano, M., (2008). *Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Martínez, S., González J., Culebras J. y Tuñón M., (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), 271-278.
- Mazzani, E., Marin, C., y Segovia V., (2000). Estudio de la variabilidad existente en la colección de onoto (*Bixa orellana* L.) del CENIAP FONAIAP Venezuela. *Rev Fac. Agron*, 17(6), 492-504.
- Meñaca, E., Restrepo J., y Colmenares A. (2018). Actividad antioxidante del complejo de inclusión del extracto de semilla de *Bixa orellana* L. en β -ciclodextrina obtenido por Co₂ supercrítico. *Revista De La Facultad De Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, 25(2), 83-91.

- Mercadante, A., steck, A., pfander. H., (1999). Three minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L) seeds. *Phytochem*, 52, 135-9.
- Mercadante, A., Steck, A. y Pfander, H., (1997). Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. *J Agric Food Chem*, 45, 1050-4.
- Mercadante, A., Steck, A., Pfander, H., (1997). Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. *Phytochem*, 46, 1379-83.
- Mercadante, A., Steck, A., Rodriguez D., Pfander, H., y Britton, G. (1996). Isolation of Methyl (90Z)-apo-60-lycopenoate from *Bixa orellana*. *Phytochem*, 41, 1201-3.
- Mestra, P. (2004). Curso de Parasitología Veterinaria. Clasificación taxonómica *Boophilus microplus*. Módulo de Parasitología. Universidad de Córdoba. Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia. Montería. 274.
- Metcalf R., (1989). Insect resistance to insecticides. *PesticideSci* 26, 333-358.
- Molau, U. 1983. 127. Bixaceae En: Flora of Ecuador, Ed. G. Harlin y B. Spare, 20: 1-7. University of Goteborg, Suecia.
- Munin, A. y Levy F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; *a review*, 3(4).
- Muñoz, L., (2015). Estudio farmaconóstico y cuantificación de flavonoides totales de la hojas de *Bixa orellana* (achiote). (Tesis de pregrado). Proveniente del Distrito de Usquil Provincia Otuzco región la Libertad. Universidad Nacional de Trujillo-Perú.
- Nari A, y Hansen, H., (1999). Resistencia de los ecto yendoparásitos: soluciones actuales y futuras. 67ª sesión general. Organización Internacional de Epizootias. París, Francia.
- Núñez, J., Muños, M., y Moltedo, H. (1982). *Boophilus micrplus*, la garrapata común del ganado vacuno. Buenos aires, argentina: Edit. Hemisferio Sur S.A. 1ed.

- Olivares, T., Dekker, M., Verkerk, R., y Boekel, M. (2016). Health-promoting compounds in cape goosberry (*Physalis peruviana*). *Trends in Food Science and Technology*, 83-92.
- Oliveira, M., Velázquez, D., y Bermúdez, A., (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales. *Revista de ciencia y tecnología de América*, 30(8), 453-459.
- Oncina, R., Botía, J. y Ortuño, A., (2000). Bioproduction of diosgenin in callus cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. *Food Chemistry*, 70(4), 489-492.
- Packer, L., (1994). Vitamin E is nature's master antioxidant. *Scientific American Science and Medicine*, 1, 54-63.
- Padro, L., López, T., y Nuviola, D., (2017). Caracterización preliminar de tinturas al 10 % de *Bixa orellana* L. *Rev Cubana de Química* 29(1), 103-114.
- Parra, J. (2003). Guía de muestreo/Javier Parra Olivares. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela: Pie de imprenta.
- Pascual, D., Pérez, Y., Morales, I., Castellanos, I., y González, E. (2014). Algunas consideraciones sobre el surgimineto y la evolución de la medicina natural y tradicional. *MEDISAN*, 18(10).
- Peñarrieta, M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. y Bravo, J., (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos *Rev Boliviana de Química*, 31(2) 68-81.
- Pérez, H., y Martínez, G., (2010). La *Bixa orellana* L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. *Revista Cubana de Farmacia*, 44(2).
- Petrovska, B., (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*, 6(11), 1

- Pino, J., y Correa, M. (2011). Chemical composition of the essential oil from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. *J Essent Oil Res*, 15, 66–7.
- Pío, J., León L., y Ortega, A., (2014). Nuevo registro de *Amoreuxia gonzalezii* (Bixaceae) para la península de Baja California, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85(4), 1269-1272.
- Poppendieck, H., (1980). A monograph of the Cochlospermaceae. *Botanische Jahrbuecher fuer Systematik Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 101(2), 191-265.
- Poppendieck, H., (1981). Cochlospermaceae. *Flora Neotropical Monograph* 27 1-34.
- Power, L., y Silestri, R. (1985). Incidencia de *B. microplus* y *A. cajennense* en explotaciones bovinas de los Estados Barina, Falcón, Lara y Yaracuy. *Rev. Fac. Cs. Vet. Univ. Central de Venezuela*, 32, 1-4.
- Procházková, D., Boušová, I. y Wilhelmová, N., (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.
- Puerta J., Chaparro, J., López, A., Arias, A., Villar D. (2015). Loss of *in vitro* efficacy of topical commercial acaricides on *Rhipicephalus microplus* from Antioquian farms, Colombia. *J. Med. Entomol*, 1-6.
- Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A., (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular, *Nutr. Hosp.*, 27(1), 76-89.
- Quiñones, S. (2017). “*Caracterización y determinación del contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del fruto de Sanke (Corryocactus brevistylus)*”. Universidad Nacional de Huancavelica.

- Raga, D., Espiritu, R., Chien, S., y Ragasa C. (2011). Abioactive sesquiterpene from *Bixa orellana* L. *J Nat Med*, 65, 206-11.
- Rajakumar G., Rahuman, A. (2012). Acaricidal activity of aqueous extract and synthesized silver nanoparticles from *Manilkara zapota* against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Res Vet Sci* 93(1), 303-309.
- Ramakrishna, A., y Aswathanarayana, G. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plants Signaling & Behavior*, 6(11), 1720-1731.
- Ramvalho, R., Pinheiro, A., Diniz, G., (1987). Informac,ões básicas sobre a cultura e utilizac,ão do urucum (*Bixa orellana* L.). *Informe Técnico, Viçosa*, 59(8), 1-22.
- Reck, J., Klafke, G., Webster, A., Dall’Agnol, B., Scheffer, R., Souza, U., Corassini, V., Vargas, R., Silveira, J., Martins, J., (2014). First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet Parasitol* 201, 128–136.
- Redondo, M., Fragoso, H., Ortiz, M., Montero, C., Lona, J., Medellín, A., Frías, R., V Hernández, V., Franco, R., Machado, H., Rodríguez, M., y Fuente J. (1999). Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac, and amidine treatments. *Exp Applied Acarol*, 23, 841-849.
- Rivera, D., y Flores, E., (1988). Morfología floral del achiote, *Bixa orellana* L. (Bixaceae). *Rev Biol. Trop*, 36(2B), 499-509.
- Rodríguez, R., Díaz, M., Rodríguez, F., Fragoso, H., Santamaría, V., Cruz R., (2005). 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.*

Rodríguez, O., Torrez, E., Valenzuela, R., (2005). *Plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades en los animales domésticos, Reserva Natural El Tisey, Estelí.* (Tesis de Pregrado). Universidad Católica Agropecuaria del Trópico Seco Pbro. Francisco Luis Espinoza Pineda. Estelí, Nicaragua.

Roque, E. (2015). *Fundamentos de parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos.* La Habana, Cuba: Editorial Educación.

Sakihama, Y., Cohen F., Grace C., Yamasaki H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177, 67-80.

Schneidere, W., Aron, E., y Hinman, J. (1965). Occurrence of Tomentosic acid in extracts of *Bixa orellana*. *J Org Chem*, 30, 2856-7.

Schwalbach, L., Greyling J., y David, M. (2003). The efficacy of a 10 % aqueous Neem (*Azadirachta indica*) seed exfor tick control in Small East African and Toggenburg female goat kids in Tanzania. *South African J Animal Scie*, 33(2), 83-8.

Scotter, M., Wilson, L., Appleton, G., y Castle, L. (1998). Analysis of annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. 1. Determination of coloring components and colored thermaldegradation products by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J Agric Food Chem*, 46, 1031-8.

Sepúlveda, C., Gómez, G. y Zapata, J., (2016). Extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de hojas de *Bixa orellana* L. (achiote). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2).

- Shahid-ul-Islam, Rather, L., Mohammad F., (2016). Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications. A review. *Journal of Advanced Research*, 7, 499-514.
- Shahid-ul-Islam, Rather, L., Shahid, M., Khan, M., y Mohammad, F. (2014). Study the effect of ammonia post-treatment on color characteristics of annatto-dyed textile substrate using reflectance spectrophotometry. *Ind. Crops Prod*, 59, 337-342.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* Vol. I. Colombia: CYTED.
- Shaw RD (1966) Culture of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. *Bull Entomol Res* 56(3), 389–405.
- Silva, C., Martins, D., Cesio, V., Azevedo, L., Heinzen, H., Barros, M., (2011). Acaricidal activity of *Palicourea marcgravii*, a species from the Amazon forest, on cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol*, 179(1-3), 189-194.
- Smith, N., Williams, J., Plucknet, D., y Talbot, J. (1992). “Tropical forests and their crops”. In: Smith, N., Williams, J., Plucknet, D., Talbot, J., (Eds.), *Spices and Natural Food Colorants*. Comstock Pub. Assoc, Ithaca, 364-370.
- Soler, J., (2006). *Cítricos, Variedades y técnicas de cultivo*. Barcelona, España: Mundi-prensa. p. 10
- Solórzano, K. (2008). *Elaboración Y Evaluación Comparativa De Dos Compuestos Inmunológicos Para El Control De Garrapatas Boophilus Microplus*. Escuela Politécnica Del Ejército Facultad De Ciencias Agropecuarias, Ecuador.
- Soltis, D., Soltis, P., Endress, P., y Chase, M. (2005). *Phylogeny and Evolution of Angiosperms*. Sunderland, Mass, USA: Sinauer, 370.

- Sousa C, Pereira D., Pereira J., Bento, A., Rodrigues, M., Dopico, S., Valentao, P., Lopes, G., Ferreres, F., Seabra, R., Andrade, P., (2008). Multivariate analysis of Trochuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) phenolics: influence of fertilizers. *J Agr Food Chem* 56(6), 2231-2239.
- Stohs, S., (2014). Safety and efficacy of *Bixa orellana* (achiote, annatto) leaf extracts. *Phytother Res*, 28(7), 956-60.
- Stone, B., Haydock, K., (1962). A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). *Bull Entomol Res*, 53, 563-578
- Stringheta, P., y Silva, P. (2008). *Pigmentos de urucum: extração, reações químicas, usos e aplicações*: Gráfica e Editora Suprema, 110-119.
- Stringheta, P., Silva P., y Costa, A., (2018). Annatto/Urucum *Bixa orellana*. Federal University of Vic,osa, Vic,osa, Minas Gerais, Brazil, Federal University of Espi´rito Santo, Alegre, Espi´rito Santo, Brazil.
- Tamayo, M. (2004). *Proceso de la Investigación Científica*. México: Limusa.
- Tingo, M., (2011). *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 Facultad De Zootecnia Departamento Académico De Ciencias Pecuarias. Perú.
- Tirimanna, A., (1981). Study of the carotenoid pigments of *Bixa orellana* L. Seeds by thin layer chromatography. *Mikrochim*, 11-16.
- Toro, M. (1990). Seroepidemiología de las hemoparasitosis en Venezuela. *Veterinaria tropical*, 4, 1-13.

- Tsuzuki, J., Svidzinski, T., Shinobu, C., Silva, L., Rodríguez, E., Cortez, D. y Ferreira, L. (2007). Actividad antifúngica de los extractos y de saponinas *Sapindus saponaria*. *Academia brasileña de ciencia* 79(4), 577-583.
- Valares, C. (2011). *Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente*. (Tesis de doctorado). Universidad de Extremadura, Badajoz, España.
- Varón, L., y Granados, J. (2012). *Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* y algunas propiedades físicoquímicas del suelo*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD).
- Vera, R., Pastrana, F., Fernández, K., y Voña, A. (2007). Actividad antimicrobiana *in vitro* de volátiles y no volátiles de *Lippia alba* y extractos orgánicos y acuoso de *Justicia pectoralis* cultivada en diferentes pisos térmicos del departamento del tolim. *Scientia et Técnica*, 13(33), 345-348.
- Villar D., Puerta J., López A., Chaparro J. (2016). Ivermectin resistance of three *Rhipicephalus microplus* populations using the larval immersion test. *Rev Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 29(1), 51-57.
- Villar, M., y Villavicencio, O. (2001). *Manual de fitoterapia*. Perú: EsSalud-OPS.
- Voigt R. (1982). *Tratado de tecnología Farmacéutica*. España: Acribia.
- Waterman, P., y Mole, S. (1994). *Method in ecology. Analysis of phenolic plant metabolites*. Boston, United State: Blackwell Sci.
- Webster, A., · Araújo, U., · Martins, J., · Klafke, G., Reck, J., y Schrank, A. (2018). Comparative study between Larval Packet Test and Larval Immersion Test to assess

the effect of *Metarhizium anisopliae* on *Rhipicephalus microplus* tick larvae. *Exp Appl Acarol*. Recuperado de:<https://doi.org/10.1007/s10493-018-0235-1>.

Woodham C., González, O., López, L., Guereña, M. (1983). Progresos en la erradicación de las garrapatas *Boophilus* en México 1960-1980. *Rev Mund Zoot* 48, 18-24.

Yaguana, K. (2016). *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.

Yong, Y., Zakaria, Z., Kadir, A., Somchit, M., Lian, G., yAhmad, Z. (2013). Chemical constituents and antihistamine activity of *Bixa orellana* leaf extract. *BMC Complement Altern Med*, 13(32)

Zaman, A., Iqbal, Z., Abbas, Z., Khan, N., Muhammad, G., Younus, M., Ahmed, S. (2012). *In vitro* and *in vivo* acaricidal activity of a herbal extracts. *Vet Parasitol* 186(3-4), 431-436.