

Caracterización preliminar de tinturas al 10 % de *Bixa orellana* L.

Preliminary Characterization of the Tinctures 10 % Bixa orellana L.

MSc. Lourdes Padró-Rodríguez, MSc. Tania López-González, Lic. Danelis
Nuviola-Frómata

lpadro@uo.edu.cu

Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

Recibido: 3 de marzo 2016

Aprobado: 22 de agosto 2016

Resumen

Fueron caracterizadas desde el punto de vista físico, físico-químico y químico cualitativo las tinturas al 10 % de *Bixa orellana* L. Las tinturas fueron obtenidas empleando como solvente etanol al 70 %, por los métodos de extracción maceración y percolación. El valor de pH observado, en todos los casos, fue de 6, denotando un carácter ácido débil. Los valores de índice de refracción, densidad relativa y sólidos totales resultaron ser superiores en las tinturas obtenidas por percolación. 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 carmelita. La determinación de la composición química cualitativa para ambas tinturas mostró un comportamiento muy parecido, evidenciándose la presencia de alcaloides, coumarinas, saponinas, flavonoides, azúcares reductores, triterpenos y esteroides, aminas y aminoácidos, fenoles y taninos, no identificándose quinonas, resinas, glucósidos cardíacos, y mucílagos.

Palabras clave: *Bixa orellana* L., estudios de caracterización, plantas medicinales, control de calidad.

Abstract

This present paper aims to make the physical, physicochemical and qualitative chemical characterization of dyes 10 % obtained from the seeds of a *Bixa orellana* L. using the solvent 70 % ethanol and how method of extraction maceration and percolation. The pH was 6 showing a weak acid behaviour in all cases; the results of the refractive index, specific density and total solids of parameters were superior to the dyes obtained by percolation. The qualitative chemical composition using physicochemical screening technique showed the presence of alkaloids, coumarins, saponins, triterpenes and steroids, reducing sugars, flavonoids, amino acids and amines, phenols and tannins, no identified quinones, mucilage, resins, and cardiac glycoside. The capillary analysis display image poignantly colours, noted the orange colour fringe, one sub fringe of yellow colour and one band of fawn colour.

Keywords: *Bixa orellana* L., characterization of studies, medicinal plants, quality control.

Introducción

Las investigaciones científicas en plantas medicinales contribuyen, decisivamente, al desarrollo de nuevos medicamentos, los cuales pasan a formar parte del arsenal terapéutico para el tratamiento de diversas enfermedades. Muchas de estas investigaciones tienen su origen a partir del uso popular que le confiere la población, los cuales resultan muy diversos y variables [1, 2].

La *Bixa orellana* L. es una especie vegetal de la cual se han reportado diversos estudios fitoquímicos realizados a la especie y a extractos oleosos de la misma [3, 4], no existiendo reporte alguno sobre extractos hidroalcohólicos preparados al 10 %.

De ahí que exista la necesidad de obtener una tintura caracterizada a partir de las semillas de la especie para ser utilizada como principio activo o forma farmacéutica, aprovechando las disímiles propiedades terapéuticas reportadas para la misma, de ahí que el objetivo de este trabajo es caracterizar, preliminarmente, desde el punto de vista físico, físico-químico y químico cualitativo, tinturas al 10%, obtenidas a partir de las semillas de *Bixa orellana* L., empleando diferentes métodos de extracción: maceración y percolación.

Fundamentación teórica

Motivados con la utilización de esta especie por la población cubana en diversas patologías, el incremento de afecciones dermatológicas que existe en la población producidas por picaduras de insectos, fundamentalmente, y teniendo en cuenta que en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos [5], se reportan solamente dos formulaciones obtenidas a partir de esta especie, correspondiéndose una al extracto oleoso y otra al ungüento (este último obtenido a partir del primero), se propone en esta trabajo caracterizar tinturas al 10 % obtenidas a partir de las semillas de dicha especie empleando diferentes métodos de extracción, las cuales podrán ser utilizadas bien como forma farmacéutica o como principio activo.

Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio de caracterización de tinturas preparadas al 10 %, obtenidas a partir de las semillas de la especie *Bixa orellana* L., empleando diferentes métodos de extracción y como solvente solución hidroalcohólica al 70 %. El mismo se efectuó en el período comprendido entre los meses de mayo a junio de 2015, en el laboratorio experimental de la carrera de Ciencias Farmacéuticas en la Universidad de Oriente.

Recolección y procesamiento del material vegetal

Las semillas, contenidas en los frutos de la especie fueron recolectadas en el Municipio de San Luis, en la provincia Santiago de Cuba, luego de ser identificadas taxonómicamente en el Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO) en el Museo “Tomás Romay” de la misma provincia. Este material vegetal es dividido en dos porciones: una primera es utilizada para realizar el correspondiente control de calidad con vistas a garantizar su uso en la investigación, evaluándose los parámetros correspondientes a la determinación de sustancias solubles y composición química cualitativa, siguiendo el procedimiento descrito en la Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) # 309 [6] y la técnica de tamizaje fitoquímico descrita en la literatura especializada [7], respectivamente.

Determinación de sustancias solubles

Se basa en la extracción de las sustancias en agua, alcohol o una mezcla hidroalcohólica, mediante maceración y evaporación hasta sequedad de una alícuota del extracto. Se realizó teniendo en cuenta el procedimiento establecido en la NRSP # 309 [6] empleando como solventes soluciones hidroalcohólicas preparadas al 30 %, 50 % y 70 %.

Determinación de la composición química

La composición química cualitativa a la droga fresca se determina a través de la técnica de tamizaje fitoquímico, siguiendo el procedimiento descrito en el Folleto para las actividades prácticas de las asignaturas Farmacognosia y Química de los Productos Naturales [7], empleando como solvente de extracción etanol 96 %, desarrollándose los ensayos cualitativos descritos para la identificación de alcaloides, triterpenos y esteroides, quinonas, coumarinas, saponinas, azúcares reductores, aminoácidos libres y aminas en general, carbohidratos, mucílagos, flavonoides, resinas, aceites esenciales, glicósidos cardíacos, fenoles y taninos (tabla 1).

**TABLA 1. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS
A LA DROGA FRESCA**

Metabolitos	Ensayos
Alcaloides	Dragendorff
	Mayer
	Wagner
Triterpenos y esteroides	Solkowski
	Lieberman-Burchard
	Rosemheim
Quinonas	Borntrager
Cumarinas	Baljet
Saponinas	Espuma
Resinas	Resinas
Mucílagos	Mucílagos
Aceites esenciales y sustancias grasas	Sudán III
Azúcares Reductores.	Fehling
	Benedict
Fenoles y taninos	Cloruro férrico
Aminoácidos libres y aminos en general	Ninhidrina.
Glicósidos cardíacos	Kedde
Flavonoides	Ácido sulfúrico concentrado
	Shinoda
	Rosemheim

La segunda porción del material vegetal es sometida a un proceso de secado empleando el método al sol, con el objetivo de eliminar la humedad del material vegetal, evitando así una posible contaminación microbiana y garantizar su utilización en la investigación.

Una vez seca, se procede a la determinación del porcentaje de humedad residual presente en el material vegetal, empleándose el método gravimétrico, establecido en la NRSP # 309 [6]. Posteriormente es triturada con el objetivo de disminuir el tamaño de partícula y así favorecer los posteriores métodos de extracción a aplicar.

Procedimiento para la obtención de las tinturas

Para la obtención de las tinturas se procedió según lo descrito en la NRSP # 311 [8], empleando los métodos de extracción, maceración y percolación y como solvente una solución hidroalcohólica al 70 %. Se prepararán a una concentración del 10 % que es la concentración más baja a la cual se pueden preparar tinturas a partir de material vegetal, independientemente de que en la bibliografía se reporta esta concentración para drogas potentes o muy activas. Este criterio fue tomado teniendo en cuenta de que no existen extractos hidroalcohólicos elaborados para la especie, y que se desconoce la toxicidad

de los mismos, aunque se reporta en literatura que la planta no es tóxica [9], evitando la posible aparición de efectos no deseados en el momento de su uso.

Caracterización de las tinturas obtenidas

Para la caracterización de las tinturas se procede a la determinación de los parámetros de calidad establecidos en la Norma Ramal de Salud Pública # 312 [10] determinándose los parámetros:

1. Características organolépticas: color, olor, homogeneidad, y transparencia de la solución.
2. pH.
3. Índice de refracción.
4. Densidad relativa.
5. Sólidos totales.
6. Análisis capilar.
7. Determinación de la composición química cualitativa, según técnica de Tamizaje fotoquímico [7].

Para la determinación de la composición química cualitativa se aplica la técnica de Tamizaje Fitoquímico, establecida en Folleto para las actividades prácticas de las asignaturas Farmacognosia y Química de los Productos Naturales [7], realizándose los ensayos cualitativos descritos, para la identificación de alcaloides, triterpenos y esteroides, quinonas, coumarinas, saponinas, azúcares reductores, aminoácidos libres y aminas en general, carbohidratos, mucílago, flavonoides, resinas, glicósidos cardíacos, aceites esenciales, fenoles y taninos.

Procesamiento estadístico de la información

Para la determinación del mejor método de extracción se realizó un Análisis de varianza ANOVA y el test de Tukey para máximas diferencias significativas (HSD), para un nivel de confianza del 95 %, empleando para ello el software Statgraphics plus Versión 5.1, para Windows en su edición profesional. Para determinar las desviaciones estándares se utilizó el Microsoft Office Excel.

Equipos y reactivos utilizados

Balanza técnica (Nagema), pH-metro (HANNA PH 211), Balanza analítica (SARTORIUS), Zaranda (JP Selecta 3000974) y Refractómetro Abbe.

Resultados y discusión

Procesamiento del material vegetal

El secado total de las semillas empleando el método de secado al sol se realizó durante 7 días. La selección del método de secado estuvo condicionada a la aparición, en la superficie de las semillas, de una pequeña capa de color blanco que pudiera ser signo de contaminación, como resultado del proceso de secado por el método a la sombra. De ahí la selección del método de secado al sol, pues no existen reportes de estudios relacionados con métodos de secado para la especie, motivo por el cual se descartó este método de secado en la investigación.

Este proceso de secado no modificó la coloración roja de la semilla, aunque sí la friabilidad de las mismas lo que facilitó la posterior disminución del tamaño de partículas favoreciendo así el proceso extractivo. Al no existir reportes de estudios de métodos de secado no se pueden comparar los resultados obtenidos.

Determinación de sustancias solubles a la droga fresca

Los resultados obtenidos en la determinación de sustancias solubles a la droga fresca se muestran en la tabla 2. Como puede notarse, el solvente que logra extraer mayor cantidad de sustancias solubles es el etanol al 70 %, lográndose un (30,9 %), seguido del etanol al 50 % (26,36 %) y luego el etanol al 30 % (19,65 %).

TABLA 2. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS SOLUBLES A LA DROGA FRESCA

Parámetro de calidad	Etanol (30%)	Etanol (50%)	Etanol (70%)
Sustancias solubles (% ± DS)	19,65 ± 1,53	26,36 ± 0,30	30,09 ± 0,30

Estos resultados son indicativos del poder de extracción de los solventes empleados, dado por las características estructurales de las sustancias extraídas en cada uno de ellos. Al compararlos con lo reportado en la bibliografía puede observarse que están en correspondencia, pues se plantea que el porcentaje de extracción debe ser menor de 31 % [5], siendo el solvente de primera elección el etanol al 70 % para la preparación de futuras tinturas y el empleado para elaborar las tinturas que serán objeto de caracterización en este estudio.

Determinación de la composición química a la droga fresca

En la tabla 3 se plasman los resultados obtenidos en la identificación de metabolitos a la droga fresca, arrojando la presencia de alcaloides, triterpenos y esteroides, saponinas, aceites esenciales, azúcares reductores, aminos y aminoácidos, flavonoides (posible flavona según evidencias del ensayo con Shinoda), fenoles y taninos; estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura especializada [11,12].

TABLA 3. RESULTADOS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA A LA DROGA FRESCA

Metabolitos	Ensayos	Evidencias	Observaciones
Alcaloides	Dragendorff	++	Precipitado de color rojo ladrillo
	Mayer	+	Se observó un color amarillo opaco
	Wagner	++	Se observó un color amarillo opaco
Triterpenos y esteroides	Solkowski	-	Color negro
	Lieberman-Burchard	++	Color verde intenso visible
	Rosemheim	-	Separación de fases de color amarillo en la primera
Quinonas	Borotrager	-	Color naranja sin precipitado
Coumarinas	Baljet	-	Color naranja sin precipitado
Saponinas	Espuma	++	Espuma
Resinas	Resinas	-	Color amarillo claro
Mucílagos	Mucílagos	-	
Aceites esenciales y sustancias grasas	Sudán III	+	Gotas oleosas de color roja
Azúcares Reductores.	Fehling	++	Precipitado de color rojo ladrillo
	Benedict	+	Precipitado de color rojo ladrillo
Fenoles y taninos	Cloruro férrico	+	Ligero color rojizo
Aminoácidos libres y aminos en general	Ninhydrina.	++	Color azul violáceo
Glicósidos cardíacos	Kedde	-	Color naranja rojizo
Flavonoides	Ácido sulfúrico concentrado	++	Color marrón oscuro
	Shinoda	++	Separación de fases color naranja en la primera
	Rosemheim	-	Cambio de color de rojo a marrón

Legenda: (+) indica ensayo positivo, (-) indica ensayo negativo, (++) evidencia positiva marcada

Determinación de humedad residual a la droga seca

El resultado de la humedad residual obtenido fue de un 8 %, valor que se encuentra por encima del valor límite establecido para la droga (no mayor de un 7 %) [5]. Este resultado puede estar relacionado con la absorción de la humedad relativa medio ambiental, y la producida en el interior de la bolsa de nylon, material de envase donde se encontraba almacenada la muestra. Como la diferencia entre el valor obtenido y el reportado, no es significativa, se considera que el método de secado empleado se desarrolló de forma óptima. No obstante, se sugiere realizar posteriores estudios sobre métodos de secado y así estandarizar el mismo para la especie.

Caracterización de las tinturas obtenidas

Cada una de las tinturas obtenidas fue caracterizada según resultados de los parámetros de calidad evaluados para este tipo de formulación.

Las tinturas obtenidas a partir de las semillas de la *Bixa orellana* L, por ambos métodos de extracción, mostraron el mismo color y olor, propios de la especie, correspondiéndose a una coloración roja intensa y olor característico. Estos resultados denotan la presencia de metabolitos presentes resultado del proceso extractivo. Así mismo se observó transparencia a la luz, homogeneidad, no observándose partículas en suspensión. Al no existir estudios precedentes no se puede realizar una comparación, por lo que se podría tomar como punto de referencia para futuros estudios.

Los valores de pH determinados a las tinturas, coinciden para los diferentes métodos de extracción, obteniéndose un valor de 6, lo que denota un carácter ácido débil, justificado por la presencia de compuestos resultantes de la extracción que aportan estas características, o bien debido a la combinación de las características ácidas y básicas aportadas por los diferentes grupos de familias químicas presentes en el medio, todas identificadas en el tamizaje fitoquímico. Entre los compuestos identificados que aportan características ácidas se encuentran los triterpenos y esteroides, flavonoides, fenoles y taninos, y con características básicas los alcaloides, aminas, aminoácidos.

Este parámetro no está condicionado al cambio de método de extracción. Se puede considerar como un pH óptimo para el futuro uso que se prevé tenga esta formulación, pues se encuentra en el rango de pH reportado para la piel (5-6), sitio de acción previsto [13].

En la tabla 4 se muestran los resultados de los parámetros índice de refracción, densidad relativa y sólidos totales.

TABLA 4. RESULTADOS DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN DE LAS TINTURAS

Parámetro de calidad	Percolación	Maceración	Etanol 70%
Índice de refracción	1,361	1,360	1,354
Densidad relativa (g/mL)	0,999 6	0,991 8	0,931 6
Sólidos totales (%)	5,404	4,146	---

Como puede observarse el valor del índice de refracción obtenido para cada tintura, es superior al índice de refracción del solvente empleado para su preparación, hecho este atribuible a la presencia en el medio de sustancias capaces de refractar la luz, como resultado del proceso extractivo. De igual modo, los valores obtenidos son similares, no arrojando diferencias estadísticas, lo que permite inferir que puede emplearse indistintamente cualquiera de los métodos de extracción empleados.

Analizando los valores de densidad relativa de las tinturas, puede notarse que son superiores a la del solvente, esto se justifica por la explicación dada al discutir el parámetro índice de refracción. El comportamiento de este parámetro sigue la misma tendencia, o sea, es en la percolación donde se obtienen valores numéricos mayores, no existiendo diferencias estadísticas.

La variable sólidos totales resulta de gran importancia a monitorear cuando de una planta se pretende extraer la mayor cantidad de metabolitos presentes en la misma. En este estudio se mostró la variabilidad que genera en el contenido de sólidos totales el cambio de método de extracción. El comportamiento observado resulta similar al de los parámetros anteriormente discutidos, pues se observa claramente que la percolación ofrece mejores resultados. Estos resultados pudieran justificarse por la capacidad extractiva del solvente empleado y del propio método en sí, lo que indica el resultado de la extracción basado en la relación estructura solubilidad de los metabolitos presentes en el material vegetal.

El parámetro análisis capilar constituye uno de los aspectos a evaluar cuando de calidad de formas farmacéuticas obtenidas a partir de plantas medicinales se trata. El resultado de este arrojó una imagen con las características que a continuación se describen, para ambos métodos: imagen vivamente coloreada de 13,3 cm de altura, observándose una franja de color naranja de 5 cm, casi lineal, una subfranja de color amarillo, de 3,5 cm, y una banda de color carmelita claro de 3 cm. Ante la luz ultravioleta no se produce fluorescencia, acentuándose el color de la imagen definitiva.

Los resultados obtenidos en las determinaciones antes explicadas, no pueden ser comparados pues no existen reportes de estudios de este tipo, reportados para la especie, de ahí que estos resultados constituyan la base científica para el fundamento de investigaciones futuras sobre el tema y la especie.

El tamizaje fitoquímico constituye una de las etapas que permite determinar cualitativamente los principales grupos constituyentes químicos presentes en una planta. Los resultados obtenidos para cada método de extracción son mostrados en la tabla 5.

TABLA 5. RESULTADOS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA CUALITATIVA

Metabolitos	Ensayo cualitativo	Evidencia Percolación	Evidencia Maceración
Alcaloides	Dragendorff	+	-
	Mayer	++	+
	Wagner	++	+
Triterpenos y esteroides	Solkowski	-	-
	Lieberman Burchard	- +	+
	Rosemheim	-	-
Quinonas	Borntrager	-	-
Coumarinas	Baljet	++	+
Saponinas	Espumas	++	+
Resina	Resina	-	-
Aceites esenciales	Sudán III	+	+
Azúcar reductoras	Fehling	+	+
	Benedict	+	+
Fenoles y taninos	Cloruro férrico	++	+
Aminoácidos libres y aminas en general	Ninhidrina	+	-
Glicósidos Cardíacos	Kedde	-	-
Flavonoides	Ácido sulfúrico concentrado	++	+
	Shinoda	++	+
	Rosemheim	++	+
Mucílagos	Mucílagos	-	-

Leyenda: ++ (abundante), + (moderado), + (escaso), - (negativo).

Como puede apreciarse los metabolitos identificados en las tinturas preparadas por el método de percolación responden a alcaloides, triterpenos y esteroides, coumarinas, saponinas, aceites esenciales, azúcares reductores, aminas y aminoácidos, flavonoides, fenoles y taninos, no identificándose quinonas, resinas, glucósidos cardíacos, y mucílagos. Al ser comparados con los obtenidos en las tinturas elaboradas por maceración, puede notarse que la diferencia radica en la ausencia de aminoácidos libres

y aminas en estas últimas, como también se puede apreciar que las evidencias obtenidas en cada ensayo son menos acentuadas.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en la droga fresca, la diferencia radica en la ausencia de coumarinas y quinonas en la droga fresca. Por lo que, de forma general, se puede plantear que la composición química del material vegetal se mantiene luego del proceso de secado de la droga, lo que resulta factible para la preparación de futuras preparaciones farmacéuticas. Estando dichos resultados en correspondencia con lo reportado en bibliografía [14].

En sentido general, estos ensayos cualitativos permiten corroborar el criterio mantenido acerca de la utilización del método de extracción percolación como el de elección para la preparación de las tinturas de la especie, aún existiendo diferencias mínimas entre ambos métodos.

Conclusiones

Se realizó la caracterización preliminar física, física-química y química cualitativa de las tinturas de Bixa orellana L, al 10 % obtenidas por diferentes métodos de extracción.

Referencias bibliográficas

- 1.-SHILPI, J.A.; TAUFUQR, R.M.; UDDIN, S.J.; ALAM, M.S.; SADHU, S.K.; SEIDEL, V. "Preliminary. Pharmacological Screening of Bixa orellanaL. Leaves". *J Ethnopharmacol*, 2011, **10**(2), 264-71.
- 2.- BRAGA, F. G., *et al.* "Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil". *J Ethnopharmacol*, 2011, **11**(1), 396-402.
3. CASTELLO, M.C.; PHATAK, A.; CHANDRA, N.; SHARON, M. "Antimicrobial Activity of Crude Extracts from Plant Parts and Corresponding Calli of Bixa orellana L". *Indian J Exp Biol.*, 2012, **40**(12), 1378-81.
4. KOSSMAN, I.; VICENTE, C. **Salud y plantas medicinales**. Buenos Aires: Editorial Planeta Tierra, 1992, 20-25.
5. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. *Formulario Nacional de Apifármacos y Fitofármacos*. Encimed. La Habana, Cuba. Editorial Ciencias Médicas, 2014, Primera edición.
6. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. *Droga cruda métodos de ensayos. Norma Ramal de Salud Pública*. (NRSP 309/91). La Habana, 1991.

7. OCHOA, A.P.; LÓPEZ, T. G.; COLOMBAT, M. R. *Farmacognosia y Química de los Productos Naturales*. Monografía. Editado en CD-ROM ISBN 959-207-012- 1; 15-30.2002
8. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. *Medicamento de origen vegetal. Extractos fluidos y tinturas. Proceso tecnológico Norma Ramal de Salud Pública*. (NRSP 311/91). La Habana, 1991.
9. KAUR, K. *et al.*, “Antimalarials from nature”. *Bioorg Med Chem.*, 2012, **17**, 3229-56.
10. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. *Medicamento de origen vegetal. Extractos fluidos y tinturas. Métodos de ensayo. Norma Ramal de Salud Pública*. (NRSP 312/91). La Habana, 1991.
11. RAMÍREZ, T. “Evaluación de la Actividad Extracto Acuoso de las Hojas de *Bixa Orellana* ‘Achiote’”. Ayacucho (Perú): Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2001. 23-26, 29-31.
12. HUAMÁN, O., *et al.* “Efecto antiulceroso del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Bixa orellana* (achiote), en ratas”. *An fac med.*, 2009, **70**(2), 97-102.
13. LACHMAN, L.; HERBERT, A.; KAING J. L. *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*. La Habana. Editorial Félix Varela. 2008, tomo 1, 215-217.
14. JAMES, A.; DUKE, MARY, J.O.; BOGENSCHUTZ-GODWIN; JUDI CELLIER, PEGGY-ANN DUKE CRC. *Handbook of Medicinal Spices*. Boca Raton: CRC Press, 2012, 96-104.