

Revista Cubana de Plantas Medicinales, Vol. 22,  
No. 4 (2017)

ARTÍCULO ORIGINAL

## Optimización del proceso de lixiviación de los compuestos bioactivos de las semillas de *Bixa orellana* L. (annato)

## Optimization of the leaching of bioactive compounds contained in seeds of *Bixa orellana* L. (achiote)

Ana María Naranjo Durán,<sup>I</sup> Julián Quintero Quiroz,<sup>I</sup> Gelmy  
Ciro Gómez<sup>II</sup>

<sup>I</sup> Grupo de Investigación Programa de Ofidismo/Escurpionismo, Sede de Investigación Universitaria (SIU). Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

<sup>II</sup> Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

---

### RESUMEN

**Introducción:** *Bixa orellana* L. (annato) es un arbusto originario de Suramérica que se cultiva por el pigmento rojo-naranja proveniente de sus semillas utilizado en la industria alimentaria como colorante natural y al que se le ha atribuido propiedades funcionales como antioxidante y antimicrobiano.

**Objetivo:** Optimizar el proceso de lixiviación de los compuestos bioactivos de las semillas de annato para evaluar sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes, y el efecto del pH sobre las propiedades antioxidantes.

**Métodos:** Para optimizar el proceso de lixiviación de los compuestos bioactivos de las semillas de annato se utilizó el método de superficies de respuesta y se aplicó un diseño factorial central compuesto en el cual se consideró el efecto de los factores: pH (3-10), relación semilla/solvente ( $R_{SS}$ ) (1:2-1:6) y la concentración de etanol ( $C_{OH}$ ) (50%-96 %) sobre las variables

respuestas: fenoles totales ( $F_t$ ) y carotenos totales ( $C_t$ ). Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante el método colorimétrico de microdilución en caldo y la actividad antioxidante, mediante los métodos de la actividad reductora de hierro (FRAP) y ABTS.

**Resultados:** Los valores de los factores que maximizaron el proceso de lixiviación fueron pH: 4,0;  $R_{SS}$ : 1:5 y  $C_{OH}$ : 80,0 %. Se obtuvieron valores preestablecidos de 2,12 ( $g_{AG}/5g$  semilla) para  $F_t$  y (313,68  $mg_{Ct}/g$  extracto) para  $C_t$ , con sesgos relativos de -16,88 % y -4,64 %, respectivamente. La cinética de liberación máxima de los compuestos bioactivos en condiciones óptimas de extracción se alcanzó entre los 240 y 270 min. Las concentraciones mínimas inhibitorias del extracto optimizado fueron 2 048  $\mu g/mg$  contra *Listeria monocytogenes*, 1 024  $\mu g/mg$  contra *Escherichia coli*, 64  $\mu g/mg$  contra *Staphylococcus aureus* y 8  $\mu g/mg$  contra *Bacillus cereus*. Se observó que el pH tiene efecto estadísticamente significativo sobre la actividad antioxidante del extracto optimizado.

**Conclusiones:** Se optimizó el proceso de lixiviación con los siguientes valores: pH: 4.0,  $R_{SS}$ : 1:5 y  $C_{OH}$ : 80,0 %, se comprobó la actividad antimicrobiana *in vitro* y el efecto estadísticamente significativo del pH sobre la actividad antioxidante del extracto.

**Palabras clave:** *B. orellana*; lixiviación; compuestos bioactivos; actividad antimicrobiana; actividad antioxidante.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** *Bixa orellana* L (achiote) is a shrub native to South America. It is grown for the orange-red pigment extracted from its seeds (annatto), very much used in the food industry as a natural colorant. Annatto has been attributed effective antioxidant and antimicrobial properties.

**Objectives:** Optimize the process of leaching of the bioactive compounds contained in achiote seeds to evaluate its antimicrobial and antioxidant properties, and the effect of pH on antioxidant properties.

**Methods:** Leaching of the bioactive compounds contained in achiote seeds was optimized by response surface methodology. A central composite factorial design was applied that bore in mind the effect of pH (3-10), seed / solvent ratio ( $R_{ss}$ ) (1:2-1:6), and ethanol concentration (COH) (50 %-96 %) on response variables total phenols ( $F_t$ ) and total carotenenes ( $C_t$ ). Antimicrobial activity was evaluated by colorimetric broth microdilution assay and antioxidant activity by FRPA (ferric reducing ability of plasma) and ABTS (cationic radical 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) testing).

**Results:** The values for factors maximizing the leaching process were pH: 4.0,  $R_{ss}$ : 1:5 and COH: 80.0 %. Preset values of 2.12 ( $g_{AG}/5g$  seed) were obtained for  $F_t$  and 313.68 ( $mg_{Ct}/g$  extract) for  $C_t$  with relative biases of -16.88 % and -4.64 %, respectively. Maximum release kinetics of bioactive compounds in optimal extraction conditions was reached between 240 and 270 min. The

minimum inhibitory concentrations for the optimized extract were 2 048 µg/mg against *Listeria monocytogenes*, 1 024 µg/mg against *Escherichia coli*, 64 µg/mg against *Staphylococcus aureus* and 8 µg/mg against *Bacillus cereus*. The pH was found to have a statistically significant relationship to the antioxidant activity of the optimized extract.

**Conclusions:** The leaching process was optimized with the following values: pH: 4.0, Rss: 1:5 and C<sub>OH</sub>: 80.0 %. It was found that the extract displays antimicrobial activity *in vitro*, and that the pH has a statistically significant effect on antioxidant activity.

**Key words:** *B. orellana*, leaching, bioactive compounds, antimicrobial activity, antioxidant activity.

---

## INTRODUCCIÓN

*Bixa orellana* L. (annato), perteneciente a la familia Bixacea,<sup>1</sup> es un arbusto originario de las Antillas y de América del Sur, que se cultiva ampliamente por la pulpa rojo naranja que cubre sus semillas y se utiliza mucho en América Latina y el Caribe para colorear arroces, aceites y otros alimentos<sup>2</sup>. El extracto obtenido de sus semillas se utiliza en la industria alimentaria principalmente como colorante natural en alimentos como mantequillas, quesos, refrescos y en la confitería,<sup>3</sup> pero se desaprovechan sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes.

El pigmento que se obtiene de las semillas es una sustancia resinosa y aceitosa. Más del 80 % de los pigmentos totales presentes es la bixina, un carotenoide formado por nueve dobles enlaces conjugados y dos grupos carboxílicos cuya fórmula molecular es C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub> (éster monometílico del ácido 6,6'-diapoψ,ψ-carotenodioico).<sup>4</sup> Esta estructura es responsable de su color rojo intenso, su baja solubilidad en agua y su baja estabilidad durante el procesamiento y en condiciones normales de almacenamiento, así como en altas temperaturas y en presencia de luz y oxígeno.<sup>5,6</sup>

Algunos autores han demostrado las propiedades antioxidantes del extracto de *B. orellana*. Viuda y otros demostraron<sup>7</sup> las propiedades antibacteriana y antioxidante, ésta última mediante cinco métodos diferentes. En un estudio realizado por Martín-Sánchez y otros,<sup>8</sup> el extracto de *B. orellana* se incorporó en diferentes concentraciones en la formulación de un paté de hígado, y se demostró que las formulaciones que contenían el extracto de *B. orellana* presentaron mayor índice de actividad antioxidante que los controles. El extracto también ha sido incorporado a otras matrices alimentarias como salchichas<sup>9,10</sup> y uchuvas.<sup>11,12</sup>

En la mayoría de las frutas y de los vegetales la propiedad antioxidante es atribuida en gran parte a su contenido de polifenoles. Los resultados reportados por *Tzulker* y otros<sup>13</sup> demuestran una fuerte relación entre las propiedades antioxidantes y la concentración de los compuestos fenólicos del jugo obtenido del fruto de la granada. También se han realizado estudios donde se evalúa el efecto del pH sobre las propiedades antioxidantes de los extractos vegetales, tal es el caso del trabajo de *Rubio-Senent* y otros<sup>14</sup> quienes reportaron que el pH afecta la extracción de los compuestos fenólicos presentes en el alpeorujó (subproducto de la extracción del aceite de oliva).

Los resultados de algunos trabajos también demostraron buena acción antimicrobiana *in vitro* del extracto de *B. orellana* contra microorganismos de interés para la industria alimentaria como: *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Byssochlamys fulva*, entre otros.<sup>7,9,10,15,16</sup>

Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha para maximizar la extracción de los compuestos bioactivos presentes en las semillas de *B. orellana* son escasos, por tal motivo el objetivo de este trabajo fue optimizar el proceso de lixiviación de los compuestos fenólicos y los carotenoides de las semillas de *B. orellana* para evaluar sus propiedades activas, así como su actividad antimicrobiana y antioxidante.

## MÉTODOS

### Material vegetal

Las semillas de *B. orellana* se compraron frescas en la plaza minorista de Medellín (Colombia). Se secaron a una temperatura de  $37 \pm 0,2$  °C durante 24 h para someterlas posteriormente a extracción por lixiviación con solvente.

### Optimización del proceso de lixiviación de los compuestos bioactivos presentes en las semillas de *B. orellana*

Se utilizó el método de superficies de respuesta con ayuda del software Design-Expert® 8.0.5. Se aplicó un diseño factorial central compuesto con el cual se evaluó el efecto de los factores: pH (3-10), relación semilla/solvente ( $R_{SS}$ ) (1:2-1:6) y concentración de etanol ( $C_{OH}$ ) (50 % - 96 % v/v) sobre las variables respuestas: fenoles totales ( $F_t$ ) y carotenos totales ( $C_t$ ).

### Cuantificación de los carotenos totales ( $C_t$ )

Los carotenos totales se cuantificaron siguiendo el método descrito por *Jaeger de Carvalho* y otros<sup>17</sup> con algunas modificaciones y se determinaron usando un espectrofotómetro (UV-1700, Shimadzu Europe®). Se leyeron las muestras por triplicado a 450 nm y el contenido de carotenos totales se calculó mediante la **ecuación 1**:

$$Ct \left( \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{A \times V \times 10^4}{A_1 \% 1\text{cm} \times P}$$

donde:

A= absorbancia

V= volumen total del extracto (mL)

P= peso de la muestra (g)

A<sub>1</sub>%1cm= 2592 (coeficiente de extinción para β-caroteno)

### **Cuantificación de los fenoles totales (F<sub>t</sub>)**

Los fenoles totales se cuantificaron usando el reactivo de Folin-Ciocalte. <sup>14</sup> Se tomaron 20 µL de muestra a la cual se le adicionaron 1 580 µL de agua destilada, 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck®, Alemania) y 300 µL de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 %. Esta mezcla se dejó reposar en la oscuridad durante 2 h y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (UV-1700, Shimadzu Europe®) a 725 nm. El resultado se expresó en gramos equivalentes de ácido gálico por 5g de semilla (g<sub>AG</sub>/5 g semilla).

### **Cinética de la liberación de los compuestos fenólicos presentes en las semillas de *B. orellana* en condiciones óptimas de lixiviación**

Se sometió una muestra de semillas de *B. orellana* a las condiciones óptimas de extracción. Se cuantificaron los F<sub>t</sub> a intervalos de 15 min hasta alcanzar una concentración constante de compuestos fenólicos en la muestra. Este montaje se realizó por triplicado y se reportó como miligramos equivalentes de ácido gálico por 1g de extracto (mg<sub>AG</sub>/g extracto).

### **Determinación de la actividad antioxidante del extracto optimizado de *B. orellana* ABTS-TEAC**

La capacidad antioxidante por ABTS-TEAC se cuantificó siguiendo el método descrito por *Contreras-Calderón* y otros.<sup>18</sup> A 100 µL del extracto optimizado se le adicionaron 900 µL del radical ABTS<sup>+</sup> (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), se dejó reaccionar durante 30 min en la oscuridad y a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se leyó la absorbancia en un

espectrofotómetro (UV-1700, Shimadzu Europe®) a 730 nm. Se midieron el control positivo (Trolox) y la muestra por triplicado.

### Actividad reductora de hierro (FRAP)

La actividad reductora de hierro FRAP se cuantificó según el método descrito por *Contreras-Calderón y otros*<sup>18</sup>. Se mezclaron 30 µL del extracto optimizado con 90 µL de agua destilada y 900 µL de solución de FRAP. La mezcla se dejó reaccionar durante 30 min en la oscuridad a  $37 \pm 0,2$  °C. Transcurrido este tiempo, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (UV-1700, Shimadzu Europe®) a 595nm. Las mediciones del control positivo (Trolox) y de la muestra se realizaron por triplicado.

### Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto optimizado de semillas de *B. orellana*

Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto se usó el método colorimétrico de microdilución en caldo propuesto por *Abate y otros*<sup>19</sup> con algunas modificaciones. La CIM se realizó en microplatos de 96 pozos de fondo plano marca Falcon. Se realizaron diluciones seriadas del extracto y se sembraron en los pozos de una fila a los cuales se les adicionó el medio de cultivo (caldo Mueller Hinton), finalmente se inoculó el microorganismo ( $10^8$  UFC/mL) y se incubó a  $37 \pm 0,2$  °C durante 4h. Cada muestra se evaluó por triplicado. Pasadas 4 h se adicionaron 25 µL de una solución de MTT (0,8 mg/mL) a cada pozo y se incubó nuevamente por 1h. La actividad antimicrobiana del extracto optimizado se evaluó contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Bacillus cereus* ATCC 11778.

## RESULTADOS

### Optimización del proceso de lixiviación

La [tabla 1](#) muestra los resultados del diseño experimental aplicado para optimizar la lixiviación de los compuestos bioactivos presentes en las semillas de *B. orellana*. Los  $F_t$  de las unidades experimentales variaron entre 0.95 y 2.39 g<sub>AG</sub>/5g semilla, se halló que los niveles de los factores con los cuales se obtiene el valor máximo de  $F_t$  fueron: pH de 4.0,  $R_{SS}$  de 1:5 y  $C_{OH}$  de 80%. Se descubrió que la variación del contenido de  $C_t$  en las unidades experimentales fue 43,38 y 320,46 mg/g extracto, y para este caso los valores de los factores que favorecieron la máxima extracción de los  $C_t$  presentes en las semillas de *B. orellana* fueron pH de 7,0,  $R_{SS}$  de 1:4 y  $C_{OH}$  de 96 %.

La **tabla 2** muestra los resultados del análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental y los ajustes de los modelos para  $F_t$  y  $C_t$ . El ANOVA de los modelos señala que estos son significativos ( $p < 0,05$ ) y explican el 0,8723 y el 0,8621 de la variabilidad en las variables respuestas para  $F_t$  y para  $C_t$ , respectivamente.

**Tabla 2.** Análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental aplicado a la lixiviación de compuestos bioactivos de las semillas de *B. orellana*

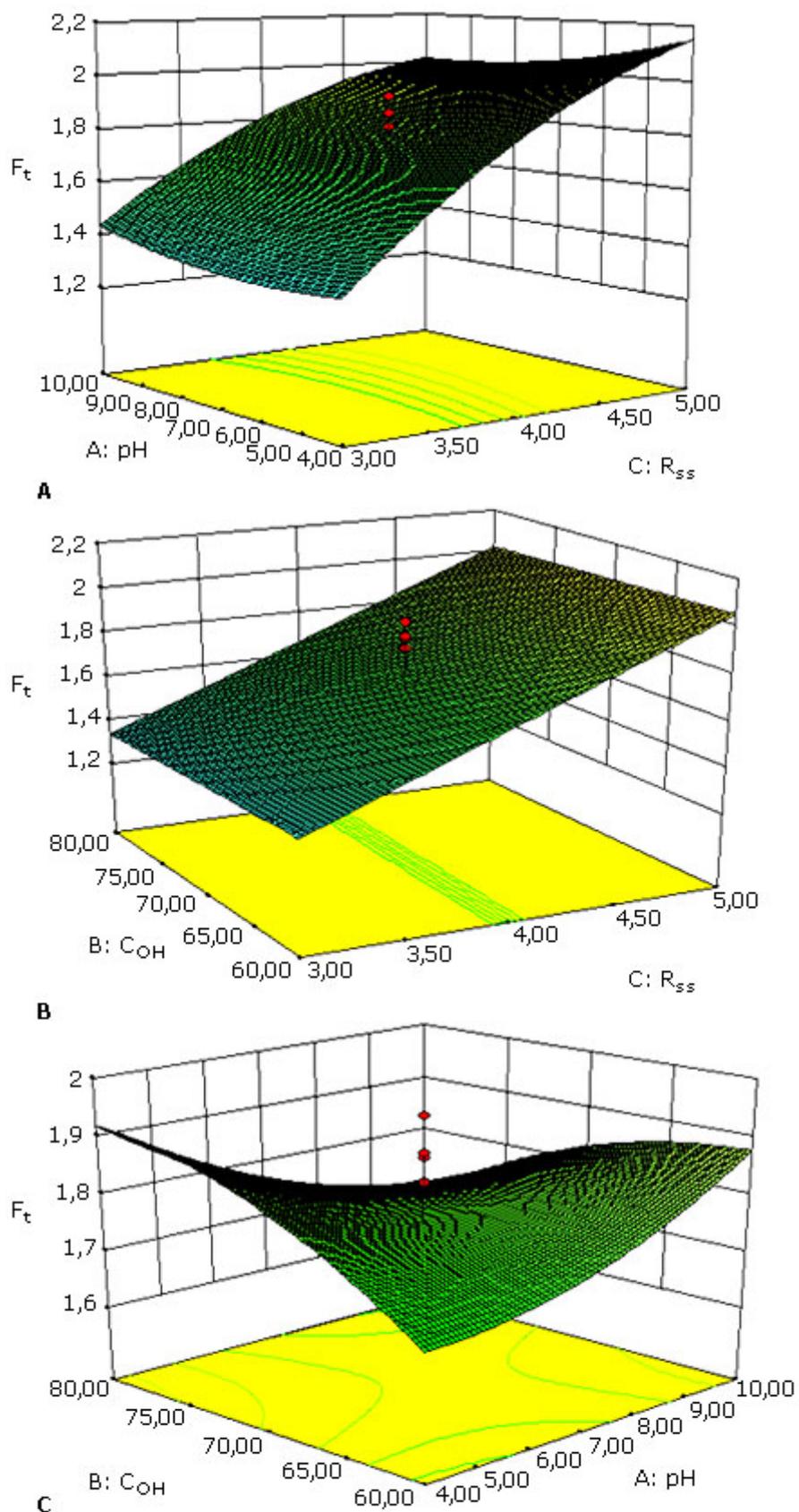
Factores	Valor $p$	
	$F_t$	$C_t$
Modelo	<0,0001	<0,0001
pH	0,7773	0,4860
COH	0,8500	<0,0001
R <sub>ss</sub>	<0,0001	<0,0001
pH <sup>2</sup>	-	0,0010
COH <sup>2</sup>	0,0455	-
R <sub>ss</sub> <sup>2</sup>	0,0034	-
pH-COH	0,0670	0,0220
Carencia de ajuste	0,3658	0,0812
R-cuadrado	0,8723	0,8621
R-cuadrado ajustado	0,8084	0,8091

Las **ecuaciones 2 y 3** corresponden a los polinomios de las variables respuesta en función de los factores evaluados en este estudio.

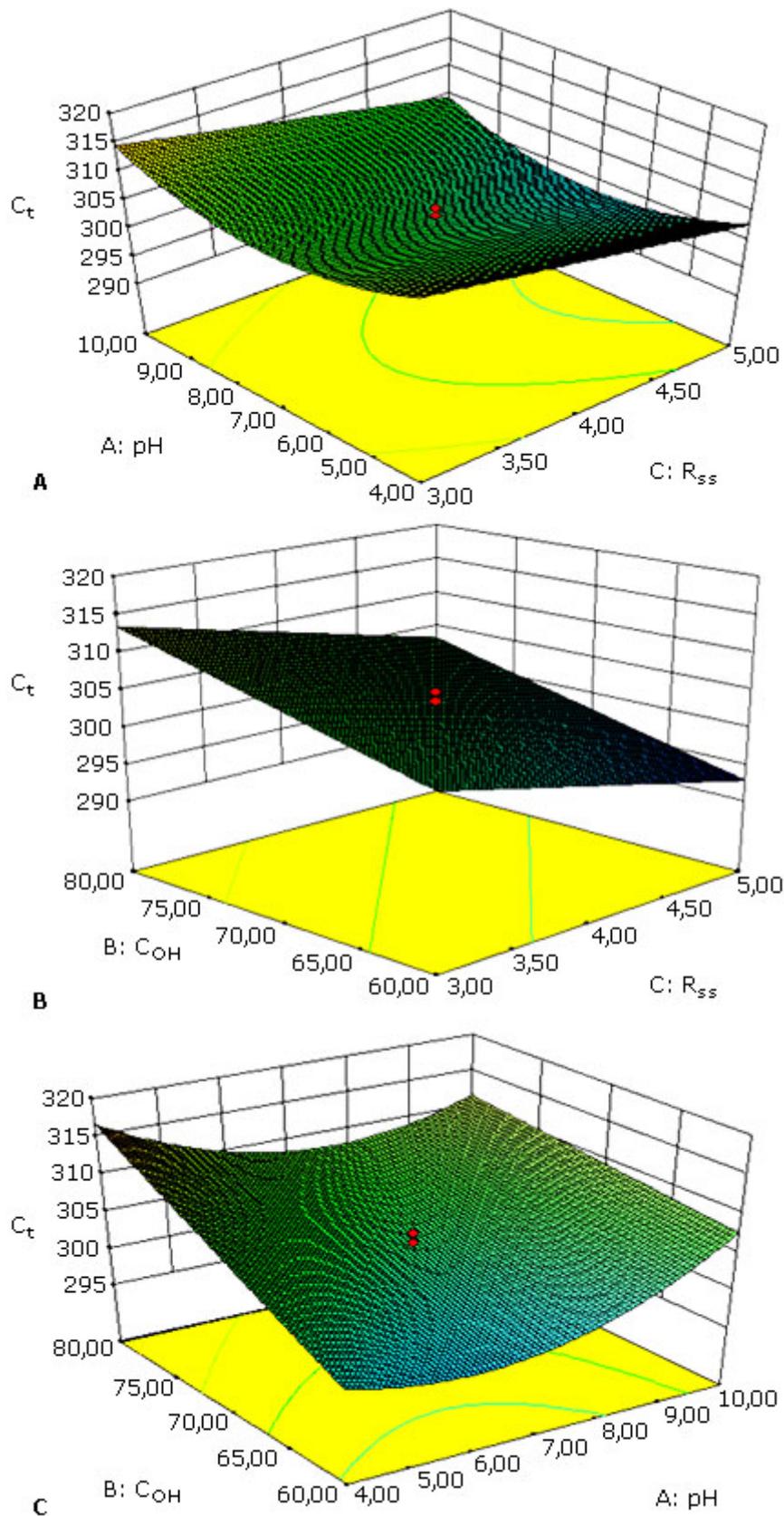
$$\frac{\text{gFt}}{\text{5g semilla}} = 108,07 - 0,13 \times \text{pH} + 0,06 \times \text{COH} + 4,27 \times \text{Rss} - 1,05 \times (\text{pH} \times \text{COH}) - 0,49 \times (\text{COH})^2 - 1,41 \times (\text{F}$$

$$\frac{\text{mg CT}}{\text{g extracto}} = 303,22 + 0,80 \times \text{pH} + 5,29 \times \text{COH} - 4,99 \times \text{C} - 3,28 \times (\text{pH} \times \text{COH}) + 5,62 \times \text{pH}^2$$

En las **figuras 1 y 2** se muestran gráficamente las interacciones entre los factores que más influyen en el proceso de lixiviación.



**Fig. 1.** Gráficos de superficies de repuesta de las interacciones entre los factores. **a.** pH y  $R_{ss}$  con  $C_{OH}$  constante de 70 %. **b.**  $C_{OH}$  y  $R_{ss}$  con pH constante de 4. **c.**  $C_{OH}$  y pH con  $R_{ss}$  constante de 4 sobre la variable respuesta  $F_t$



**Fig. 2.** Gráficos de superficies de repuesta de las interacciones entre los factores. **a.** pH y  $R_{ss}$  con  $C_{OH}$  constante de 70 %. **b.**  $C_{OH}$  y  $R_{ss}$  con pH constante de 4. **c.**  $C_{OH}$  y pH con  $R_{ss}$  constante de 4 sobre la variable respuesta  $C_t$

Una vez que se ajustaron los modelos para cada variable respuesta, se procedió a realizar la optimización en función de las variables y los límites involucrados en el diseño experimental. Los

niveles de los factores que maximizaron las variables respuestas fueron  $F_t$  (2,13 mg<sub>A.G</sub>/g) y  $C_t$  (313,68 mg <sub>C<sub>t</sub></sub>/g), pH 4,0,  $R_{SS}$  de 1:5 y  $C_{OH}$  de 80,0 %.

Los parámetros optimizados fueron validados experimentalmente mediante el método de lixiviación en las condiciones óptimas preestablecidas por el programa estadístico, y se observó que el extracto obtenido en estas condiciones contenía  $1,77 \pm 0,04$  (g <sub>AG</sub>/5g semilla) de  $F_t$ , con -16,88 % de sesgo relativo, lo que significa que hay un 16,88 % de diferencia entre el resultado preestablecido por el modelo estadístico y el resultado experimental. El extracto obtenido en el experimento tiene  $299,12 \pm 2,44$  (mg/g extracto) de  $C_t$  con un sesgo relativo de -4,64 %.

Se realizó la cinética de liberación de estos compuestos en las condiciones optimizadas del proceso de extracción de los compuestos fenólicos presentes en las semillas de *B. orellana* lo cual permitió establecer que entre 240 y 270 min de lixiviación se obtiene una concentración de compuestos fenólicos en el extracto aproximadamente constante, y se define que el tiempo óptimo para este proceso es de 4,5 h.

### Propiedades antimicrobianas del extracto optimizado de las semillas de *B. orellana*

El extracto optimizado de las semillas de *B. orellana* inhibió el crecimiento de los microorganismos de interés para la industria alimentaria: *L. monocytogenes* (2048 µg/mL), *E. coli* (1024 µg/mL), *S. aureus* (64 µg/mL) y *B. cereus* (8 µg/mL).

### Propiedades antioxidantes del extracto optimizado de las semillas de *B. orellana*

La [tabla 3](#) muestra la concentración de los compuestos fenólicos del extracto con tres pH diferentes, y permite observar que existen diferencias estadísticamente significativas en los fenoles totales a pH de 4, 7 y 11 ( $p < 0,05$ ). Se detectó que el extracto optimizado tiene mayor capacidad de inhibir al radical libre ABTS cuando se trabaja con pH 7 y 11, sin diferencias significativas ( $p = 0,2415$ ) en sus concentraciones. Mientras que se encontró que el extracto optimizado posee capacidad reductora de hierro similar a los tres pH evaluados ( $p = 0,5054$ ).

**Tabla 3.** Fenoles totales y actividad antioxidante del extracto optimizado de semillas de *B. orellana*

pH	$F_t$ (mg <sub>AG</sub> /L)	ABTS (µM <sub>Trolox</sub> /L)	FRAP (µM <sub>Trolox</sub> /L)
4	$7,55 \pm 0,13^a$	$1,34 \pm 0,07^a$	$111,84 \pm 5,68^a$
7	$12,34 \pm 0,12^b$	$1,80 \pm 0,08^b$	$110,98 \pm 3,87^a$
11	$14,96 \pm 0,14^c$	$1,90 \pm 0,09^b$	$107,77 \pm 2,59^a$

Los valores con letras iguales en la misma columna no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) con el mismo método de acuerdo con el procedimiento LSD de Fisher.

## DISCUSIÓN

El ANOVA del diseño experimental muestra los factores que tienen efecto estadísticamente significativo sobre la extracción de los compuestos fenólicos totales ( $F_t$ ) de las semillas de *B. orellana*; la  $R_{SS}$  en su término lineal ( $p < 0,0001$ ) y cuadrático ( $p = 0,0034$ ) y la  $C_{OH}$  en su término cuadrático ( $p = 0,0455$ ). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Sepúlveda y otros,<sup>1</sup> quienes reportaron que la relación materia vegetal/solvente tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la cantidad de fenoles totales en el extracto de las hojas de *B. orellana*.

El efecto de las interacciones de los factores sobre los fenoles totales ( $F_t$ ) se muestra en las figura 1a y 1b, y se observa que los  $F_t$  aumentan al aumentar la  $R_{SS}$ , hasta alcanzar un valor máximo de 1:5, lo cual indica que es un factor muy influyente.

En la figura 1c se observa cómo mediante la interacción del pH con  $C_{OH}$  se alcanza un valor máximo de  $F_t$  con valor de pH 4 y  $C_{OH}$  de 80 %; lo que coincide con los resultados reportados en el trabajo realizado por Soto-García y otros<sup>20</sup> quienes observaron que la concentración de etanol tiene efecto estadísticamente significativo sobre la extracción de los compuestos fenólicos. La máxima concentración de los fenoles totales de los extractos de la corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla* se obtuvo con etanol al 80 %, y Tian y otros<sup>21</sup> mencionan que las extracciones de los compuestos fenólicos de diferentes bayas son eficientes con etanol al 70 % en pH ácidos.

También se observó que las variables que tienen efecto estadísticamente significativo sobre la variable respuesta  $C_t$  son:  $C_{OH}$  y  $R_{SS}$  en su término lineal ( $p < 0,0001$ ), el pH en su término cuadrático ( $p = 0,0010$ ) y la interacción del pH con  $C_{OH}$  ( $p = 0,0220$ ) (tabla 2).

En la figura 2a se observa cómo al disminuir  $R_{SS}$  aumenta la extracción de  $C_t$  en las muestras, mientras que la interacción de  $R_{SS}$  con el pH no presenta diferencias significativas sobre  $C_t$ . Además, cuando se realiza la extracción con  $C_{OH}$  al 80 % se observa un aumento continuo en la concentración de  $C_t$  cuando hay disminución del factor  $R_{SS}$  (figura 2b).

En la figura 2c se observa que los  $C_t$  en el extracto presentan su valor máximo de 80 % y pH 4 cuando se trabaja con  $C_{OH}$ , resultados que son similares a los reportados por Henry García y otros,<sup>22</sup> quienes concluyeron que la concentración de etanol y la

relación materia vegetal/solvente presentan efecto estadísticamente significativo sobre la extracción de los flavonoides de las hojas de guanábana, y reportaron que la concentración de etanol influye de manera positiva, mientras que la relación materia vegetal/solvente influye de manera negativa.

### **Propiedades antimicrobianas del extracto optimizado de las semillas de *B. orellana***

Las CIM obtenidas del extracto optimizado de las semillas de *B. orellana* fueron 2 048 µg/mL para *L. monocytogenes*, 1 024 µg/mL para *E. coli*, 64 µg/mL para *S. aureus* y 8 µg/mL para *B. cereus*, resultados que coinciden con los reportados por otros autores, quienes demostraron que el extracto obtenido de las semillas de *B. orellana* tienen actividad antimicrobiana contra los microorganismos de interés para la industria alimentaria<sup>11,7</sup>.

*Viuda* y otros<sup>7</sup> publicaron que el extracto de semillas de *B. orellana* es activo contra *B. cereus* en una CIM de 1 024 µg/mL, y comparada con la CIM demostrada en este estudio es 128 veces más activo que el extracto optimizado de *B. orellana*, *Ciro* y otros<sup>23</sup> concluyeron que el extracto de semillas de *B. orellana* tiene actividad contra *L. monocytogenes* (256 µg/mL), *E. coli* (256 µg/mL), *S. aureus* (32 µg/mL) y *B. cereus* (16 µg/mL) y *Galindo-Cuspinera* y otros<sup>24</sup> reportaron en su trabajo que los extractos de *B. orellana* tienen actividad antimicrobiana contra *B. cereus* (CIM= 0,08 %) y *S. aureus* (CIM= 0,16 %).

Algunos autores han incorporado el extracto de *B. orellana* en matrices alimentarias, tal es el caso del estudio de *Yolmeh* y otros,<sup>15</sup> quienes estudiaron el efecto de diferentes concentraciones del extracto de *B. orellana* contra *E. coli* en una mayonesa, y concluyeron que a medida que aumenta la concentración del extracto de *B. orellana* disminuye la concentración de la bacteria en el producto. *Martín-Sánchez* y otros<sup>8</sup> concluyeron que la incorporación del extracto de *B. orellana* en el paté de hígado disminuye notablemente los recuentos microbianos con respecto a las muestras control.

### **Propiedades antioxidantes del extracto optimizado de las semillas de *B. orellana***

La actividad antioxidante se debe esencialmente a la presencia de compuestos fenólicos, carotenoides y flavonoides, aunque su mecanismo de acción no está completamente validado mediante experimentos<sup>7</sup>.

En la tabla 3 se muestra que la concentración de los compuestos fenólicos está fuertemente influenciada por la variación del pH del extracto optimizado de las semillas de *B. orellana*, y estadísticamente es diferente cuando se cuantifican los  $F_t$  en el

extracto con pH 4,7 y 11. Además, la concentración en los compuestos fenólicos del extracto está directamente relacionado con las propiedades antioxidantes del extracto, como se reporta en la [tabla 3](#), en la cual se puede observar que la capacidad del extracto para atrapar el radical ABTS también está influenciado por el pH con diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos con pH 4 y 7, pero no se encontraron diferencias con los pH 7 y 11.

Con el método FRAP se obtuvieron resultados distintos y no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres pH de trabajo con disminución de la capacidad de reducción del hierro férrico cuando aumenta el pH. Estas diferencias de los resultados pueden explicarse por las condiciones óptimas de trabajo con cada una de los métodos, ya que con el ABTS se trabaja con pH neutros mientras que con el FRAP se trabaja con pH 3,6, y disminuye el potencial de ionización involucrado en la transferencia de electrones y aumenta el potencial de redox, y finalmente cambia el mecanismo de reacción dominante.<sup>25</sup>

*Rubio-Senent*<sup>14</sup> estudió la influencia del pH en la extracción de compuestos fenólicos, su composición y su actividad antioxidante cuando se tienen en cuenta dos valores de pH diferentes, un pH 4,5 no modificado y un pH 2,5 acidificado, y concluyó que el extracto fenólico obtenido con pH 4,5 presenta actividad antioxidante y captura los radicales libres mejor que el extracto obtenido con pH 2,5 lo que coincide también con el trabajo realizado por *Ismaiel* y otros,<sup>26</sup> quienes estudiaron el efecto del pH sobre la producción y la actividad de varios tipos de antioxidantes producidos por *Spirulia platensis* y llegaron a la conclusión de que la actividad antioxidante de la *S. platensis* es mayor con valores de pH de 7,5 a 11.

Los compuestos de tipo carotenoides y fenólicos pertenecen a un grupo de compuestos bioactivos a los cuales se les ha atribuido actividad antioxidante. La bixina es el carotenoide con mayor presencia en el extracto de *B. orellana*.<sup>27</sup> Además, la cantidad notable de enlaces dobles en su estructura, característico de los compuestos fenólicos en general, le permite una alta densidad electrónica con la cual puede estabilizar los diferentes tipos de radicales. Un posible mecanismo de acción es la transferencia de electrones o la extracción de hidrógeno de la molécula del carotenoide, que funciona así como antioxidante de cadena. Asimismo, la presencia del grupo ácido en la estructura de la bixina o de los polifenoles ácidos aportan iones H<sup>+</sup> los cuales pueden reaccionar con compuestos oxidantes y conferirles carga neutra.<sup>28</sup>

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Antioquia y a la Fundación para la promoción de las investigaciones y de las tecnologías del Banco de la

República de Colombia.

### Conflicto de intereses

Los autores plantean que no tienen conflicto de intereses.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sepúlveda Rincón CT, Ciro Gómez GL, Edgar J, Zapata Montoya JE. Extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de hojas de *Bixa orellana* L. (achiote). Rev Cubana Plant Med. 2016 [cited 2017 Mar 14];21(2):133-44. Available from: <http://scielo.sld.cu>
2. Oboh G, Akomolafe TL, Adefegha SA, Adetuyi AO. Inhibition of cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat brain by polar and non-polar extracts of *B. orellana* (*Bixa orellana*) seeds. Exp Toxicol Pathol. 2011;63(3):257-62.
3. Giuliano G, Rosati C, Bramley PM. To dye or not to dye: biochemistry of *B. orellana* unveiled. Trends Biotechnol. 2003;21(12):513-6.
4. Zaldívar Cruz JM y Hernández Godoy G. El licopeno es el sustrato para la biosíntesis de bixina. Red. 2003;22(3):146-54.
5. Tamil Selvi A. Studies on the application of natural dye extract from *Bixa orellana* seeds for dyeing and finishing of leather. Ind Crop Prod. 2013;43:84-6.
6. De Sousa Lobato KB, Paese K, Forgearini JC, Guterres SS, Jablonski A, De Oliveira Rios A. Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. Food Chem. 2013;141(4):3906-12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.135>
7. Viuda-Martos M, Ciro-Gómez GL, Ruiz-Navajas Y, Zapata-Montoya JE, Sendra E, Pérez-Álvarez JA, et al. *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of extracts from *B. orellana* (*Bixa orellana* L.) leaves and seeds. J Food Saf. 2012;32(4):399-406.
8. Martín Sánchez AM, Ciro Gómez GL, Zapata Montoya JE, Vilella Esplá J, Pérez Álvarez JA, Barberá ES. Effect of Date Palm Coproducts and *B. orellana* Extract on Lipid Oxidation and Microbial Quality in a Pork Liver Pâté. J Food Sci. 2014;79(11):M2301-7.
9. Quintero Quiroz J, Ciro Gomez GL, Zapata Montoya JE. Evaluación de los parámetros de color del efecto de achiote (*Bixa orellana* L.) como sustituto parcial de nitritos y rojo punzó en un producto cárnico. Fac Nac Agron Medellín. 2014;67(2):146-9.
10. Quiroz JQ, Gomez GC, Zapata Montoya JE. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de semilla de *Bixa*

orellana L. en una matriz cárnica. In: XII Conferencia internacional sobre ciencias y tecnología de alimentos. 2013. p. 127.

11. Castaño HI, Ciro G, Zapata JE, Jiménez SL. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. Rev La Fac Química Farm. 2010;17:149-54. Available from:

<https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/viewFile/6334/583>

12. Ciro GL. Conservación de uchuva (*Physalis peruviana* L.) basada en la impregnación a vacío de extractos de plantas con actividad antimicrobiana y antioxidante. Ingeniería. 2012; Universidad (Medellín).

13. Tzulker R, Glazer I, Bar-Ilan I, Holland D, Aviram M, Amir R. Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. J Agric Food Chem. 2007;55(23):9559-70.

14. Rubio-Senent F, Fernández-Bolaños J, García-Borrego A, Lama-Muñoz A, Rodríguez-Gutiérrez G. Influence of pH on the antioxidant phenols solubilised from hydrothermally treated olive oil by-product (alperujo). Food Chem. 2017;219:339-45.

15. Yolmeh M, Najafi H, Farhoosh R, Salehi F. Modeling of antibacterial activity of *B. orellana* dye on Escherichia coli in mayonnaise. Food Biosci. 2014;8:8-13.

16. Tamil Selvi A, Dinesh MG, Satyan RS, Chandrasekaran B, Rose C. Leaf and Seed extracts of *Bixa orellana* L. exert anti-microbial activity against bacterial pathogens. J Appl Pharm Sci. 2011;1(9):116-20.

17. de Carvalho LMJ, Gomes PB, Godoy RL, Pacheco S, do Monte PHF, de Carvalho JLV, et al. Total carotenoid content,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. Food Res Int [Internet]. 2012;47(2):337-40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.040>

18. Contreras-Calderón J, Calderón-Jaimes L, Guerra-Hernández E. BG-V. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. Food Res Int. 2011;44:2047-53.

19. Abate G, Mshana RN, Miörner H. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis. 1998;2(12):1011-6.

20. Soto-García M, Rosales-Castro M. Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de

*Pinus durangensis* y *Quercus sideroxyla*. Maderas Cienc y Tecnol. 2016 [cited 2017 Mar 13]. Available from:

[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-221X2016005000061&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-221X2016005000061&lng=en&nrm=iso&tlng=en)

21. Tian Y, Liimatainen J, Alanne A-L, Lindstedt A, Liu P, Sinkkonen J, et al. Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. Food Chem. 2017;220:266-81.

22. García YH, Izquierdo SS, Esquijarro AJ, Romero Díaz RA. Optimización de las variables de extracción de flavonoides a partir de hojas de *Annona muricata* L. Rev Cubana Plant Med. 2016;21(3).

23. Gómez GC, Castillo JCQ, Pérez JCA, Zapata Montoya JE. Ethanol extract from leaves of *Bixa orellana* L.: A potential natural food preservative. Interciencia. 2012;37(7):547-51.

24. Galindo-Cuspinera V, Westhoff DC, Rankin SA. Antimicrobial properties of commercial *B. orellana* extracts against selected pathogenic, lactic acid, and spoilage microorganisms. J Food Prot. 2003 Jun [cited 2017 Mar 11];66(6):1074-8. Available from: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-66.6.1074>

25. Prior R, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem. 2005;53(10):4290-302.

26. Ismaiel MMS, El-Ayouty YM, Piercey-Normore M. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. Brazilian J Microbiol. 2016;47(2):298-304.

27. Kiokias S, Gordon MH. Antioxidant properties of *B. orellana* carotenoids. Food Chem. 2003;83(4):523-9.

28. Yeum KJ, Aldini G, Russell RM, Krinsky NI. Antioxidant/pro-oxidant actions of carotenoids. In: Carotenoids Nutrition and Health, 2009;5:235-268.

Recibido: 6 de abril de 2017.

Aprobado: 30 de enero de 2018.

Ana María Naranjo Durán. Sede de Investigación Universitaria (SIU). Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.  
Correo electrónico: [amaria.naranjo@udea.edu.co](mailto:amaria.naranjo@udea.edu.co)