

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Determinación de Actividades Biológicas y Tamiz
Fitoquímico de *Bixa orellana* L. de la Península de
Yucatán



TESIS

Que para obtener el Título de

Químico Biólogo Clínico

Presenta:

Dolores Isela Aguilar González

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de **Dolores Isela Aguilar Martínez** hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado **Determinación de Actividades Biológicas y Tamiz Fitoquímico de *Bixa orellana* L. de la Península de Yucatán** y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Químico Biólogo Clínico.

Atentamente

Dra. Dora Edith Valencia Rivera
Presidente

Dr. Jesús Ortega García
Secretario

Dr. Mario Alberto Leyva Peralta
Vocal

Dra. Addy Leticia Zarza García
Suplente

DEDICATORIA

Dedico mi proyecto de tesis a mi madre que nunca ha dejado de creer en mí, que ha sido mi apoyo incondicional en todo momento, gracias a ella que siempre ha velado por mi bienestar y educación, y además deposita su entera confianza en cada reto que me planteo, agradezco que sea la persona que me enseñó a ponerle dedicación, pasión y esfuerzo a cada una de las cosas que hago. Te amo madre eres mi ejemplo a seguir.

A mis hermanos y a mi familia por todo el amor y muestras de cariño que me dan, así como su apoyo incondicional.

A Héctor Manuel Angulo Murrieta gracias por el apoyo incondicional que siempre me has brindado, por ser una persona especial en mi vida, por los días y noches de compañía y apoyo en el laboratorio, por los desvelos, por creer en mi incondicionalmente, estaré eternamente agradecida.

A mis amigos que me acompañaron a lo largo de toda la carrera y agradezco por los buenos momentos que me brindaron, por el apoyo y la compañía a lo largo de estos maravillosos años Herman Eduardo Chávez Salas, Carlos Antonio Vásquez Carrasco y José Aurelio Gaspar García.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la fortaleza de salir adelante, por iluminarme para ponerle amor y dedicación a las cosas que hago.

Dra. Dora Edith Valencia Rivera le doy las gracias por todo su apoyo que me ha brindado, por los conocimientos, por la buena energía que transmite, pero sobre todo gracias por confiar en mí y nunca dejarme de la mano, agradezco su amistad y su cariño que son perfectamente correspondidos.

Dr. Jesús Ortega García por los conocimientos transmitidos, por su buena energía y su manera única de ver las cosas, agradezco todo el apoyo y la confianza depositada en mí.

Dr. Mario Alberto Leyva Peralta agradezco su dedicación y pasión por ayudarme, agradezco todo el apoyo brindado a lo largo de los últimos meses.

Dra. Addy Leticia Zarza García agradezco por proporcionar las muestras para poder llevar a cabo esta investigación y por el apoyo.

Dra. Jael Quintero Vargas por su ayuda y apoyo para poder realizar este trabajo.

A la universidad de Sonora por abrirme las puertas, por los conocimientos que fueron adquiridos dentro y fuera de sus aulas, a los profesores que me ayudaron en mi formación a lo largo de estos años, agradezco todos los conocimientos.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABLAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	11
OBJETIVOS	12
General	12
Específicos	12
JUSTIFICACIÓN	13
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	14
Plantas con Propiedades Medicinales	14
Metabolitos Secundarios de las Plantas	15
Tamiz Fitoquímico	16
<i>Bixa orellana</i> L.	17
Infecciones Bacterianas	19
Bacterias de Importancia Médica	20
Métodos de Evaluación de Actividad Antibacteriana	23
Cáncer	24
Métodos para Determinar Actividad Antiproliferativa	25
Estrés Oxidativo y su Importancia Biológica	27
Métodos para Evaluar Actividad Antioxidante	28
METODOLOGÍA	30
Muestra	30
Tamiz Fitoquímico	30
Determinación Cualitativa de Terpenos	31
Determinación Cualitativa de Flavonoides	31
Determinación Cualitativa de Saponinas	31
Determinación Cualitativa de Taninos	31
Determinación Cualitativa de Quinonas	31
Determinación Cualitativa de Cumarinas	32

Determinación Cualitativa de Alcaloides	32
Determinación Cualitativa de Glucósidos Cardiotónicos	32
Determinación de la Actividad Antioxidante	32
Cuantificación del Contenido de Fenoles Totales	33
Cuantificación de Flavonoides Totales	33
Evaluación de la Actividad Antibacteriana	34
Evaluación de la Actividad Antiproliferativa en Líneas Celulares Cancerígenas	34
Análisis de los Datos	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
Tamiz Fitoquímico	36
Determinación de la Actividad Antioxidante	37
Cuantificación del Contenido de Fenoles Totales y Flavonoides Totales	40
Evaluación de la Actividad Antibacteriana	41
Evaluación de la Actividad Antiproliferativa en Líneas Celulares Cancerígenas	46
CONCLUSIONES	50
RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	<i>Bixa orellana</i> L. Fuente: Dra. Addy Leticia Zarza García. Universidad Autónoma de Ciudad del Carmen, Campeche.	17
2.	Cápsula y semillas de <i>Bixa orellana</i> . Fuente: Dra. Addy Leticia Zarza García. Universidad Autónoma de Ciudad del Carmen, Campeche.	18
3.	Actividad antioxidante del extracto metanólico de la hoja de la accesión 9 de <i>Bixa orellana</i> . Diferentes concentraciones de H9 fueron utilizadas (0-400 µg/mL). Vitamina C (70 µM,12.6 µg/mL) fue utilizada como antioxidante estándar.	38
4.	Actividad antioxidante del extracto metanólico de la hoja de la accesión 11 de <i>Bixa orellana</i> . Diferentes concentraciones de H11 fueron utilizadas (0-400 µg/mL). Vitamina C (70 µM,12.6 µg/mL) fue utilizada como antioxidante estándar.	38
5.	Actividad antioxidante del extracto metanólico de la semilla de la accesión 9 de <i>Bixa orellana</i> . Diferentes concentraciones de S9 fueron utilizadas (0-400 µg/mL). Vitamina C (70 µM,12.6 µg/mL) fue utilizada como antioxidante estándar	39
6.	Actividad antioxidante del extracto metanólico de la semilla de la accesión 11 de <i>Bixa orellana</i> . Diferentes concentraciones de S11 fueron utilizadas (0-400 µg/mL). Vitamina C (70 µM,12.6 µg/mL) fue utilizada como antioxidante estándar.	39
7.	Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de H9 (A), H11 (B), S9 (C) y S11 (D) contra <i>E. coli</i> . Gentamicina a 12 µg/mL se utilizó como control positivo de la inhibición del crecimiento bacteriano y DMSO fue utilizado como control de disolvente.	43
8.	Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de H9 (A), H11 (B), S9 (C) y S11 (D) contra <i>Salmonella typhimurium</i> . Gentamicina a 12 µg/mL	44

se utilizó como control positivo de la inhibición del crecimiento bacteriano y DMSO fue utilizado como control de disolvente.

9. Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de H9 (A), H11 (B), S9 (C) y S11 (D) contra *Staphylococcus aureus* Gentamicina a 12 µg/mL se utilizó como control positivo de la inhibición del crecimiento bacteriano y DMSO fue utilizado como control de disolvente. 45
10. Actividad antiproliferativa de los extractos de *Bixa orellana* (A) H9, (B) S9, (C) H11, (D) S11 sobre la línea celular cancerígena HeLa. Los extractos fueron evaluados en rango de concentraciones de (0 -200 µg/mL). DMSO fue utilizado como control de solvente. 47
11. Actividad antiproliferativa de los extractos de *Bixa orellana* (A) H9, (B) S9, (C) H11, (D) S11 sobre la línea celular RAW 267.4. Los extractos fueron evaluados en rango de concentraciones de (0 -200 µg/mL). DMSO fue utilizado como control de solvente. 48

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Geolocalización de las accesiones pertenecientes a un banco de germoplasma de la península de Yucatán.	30
2	Determinación de metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de hojas y semillas de <i>Bixa orellana</i>	36
3	Concentración inhibitoria media del radical DPPH• (EC ₅₀) de los extractos metanólicos de <i>Bixa orellana</i>	40
4	Contenido de fenoles totales y flavonoides en los extractos de <i>Bixa orellana</i> (mg/g)	41
5	Concentración mínima inhibitoria (MIC ₅₀), en µg/mL, de extractos metanólicos de <i>Bixa orellana</i> , en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, 36.5 °C y 24 horas de tratamiento.	42
6	Actividad antiproliferativa (IC ₅₀) de los extractos metanólicos de <i>Bixa orellana</i>	46

RESUMEN

En los últimos años ha aumentado el uso de plantas medicinales en México, en respuesta a una creciente demanda de una parte de la población que exige cada vez más productos de origen natural y alternativas a algunos medicamentos. Las plantas representan el recurso natural más utilizado para la búsqueda de compuestos bioactivos y se encuentran en estudio una gran variedad de familias. El achiote pertenece a la familia Bixaceae; es una planta originaria de América del Sur, se cultiva extensamente en todas las regiones tropicales del mundo. Existen reportes en literatura que han puesto de manifiesto que las semillas, hojas y otras partes de la planta posee metabolitos secundarios de interés biológico con una amplia gama de actividades biológicas, principalmente, antioxidante; en la medicina tradicional se ha utilizado como diurético, antidiabético, antiinflamatorio, laxante, cicatrizante, entre otros usos. El objetivo principal de esta investigación fue determinar las actividades biológicas (actividad antioxidante, antimicrobiana y antiproliferativa sobre líneas celulares cancerígenas) y perfil fitoquímico de *Bixa orellana* L. El perfil fitoquímico de los extractos metanólicos de las hojas (H9 y H11) y semillas (S9 y S11) de dos accesiones de *Bixa orellana* L, se llevó a cabo mediante reacciones cualitativas, encontrándose la presencia de saponinas, terpenos, quinonas y cumarinas. La actividad antioxidante, antibacteriana y antiproliferativa sobre líneas celulares cancerígenas fueron evaluadas por el método de DPPH, microdilución en caldo y ensayo de reducción de MTT, respectivamente. En la determinación de actividad antioxidante las concentraciones evaluadas para los extractos metanólicos fueron de 3.125 – 400 µg/ mL y para la vitamina C de 0 – 12.6 µg/ mL; los resultados muestran que los valores de EC₅₀ menores se obtuvieron para los extractos metanólicos de las hojas H9 (45.07 ± 3.70 µg/ mL) y H11 (44.23 ± 1.42 µg/ mL), lo cual indica su mayor potencial antioxidante en comparación con los extractos S9 (185.44 ± 4.41 µg/ mL) y S11 (100.59 ± 3.18 µg/ mL). Para determinar la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de las accesiones 9 y 11 de achiote fue evaluado el efecto antiproliferativo de estos sobre las bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC14028) y Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), de acuerdo a los resultados obtenidos, ambos extractos (hojas y semillas) de las dos accesiones 9 y 11 poseen mayor efecto sobre *E. coli* y menor actividad en todos los casos sobre *S. aureus*. La actividad antiproliferativa de los extractos metanólicos de las hojas y semillas de achiote de las accesiones en estudio se realizaron a tra vez de ensayos *in vitro* utilizando las líneas celulares cancerígenas HeLa y RAW 267.4. Las concentraciones evaluadas fueron de 200, 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL. De manera

general, el orden de actividad antiproliferativa de los extractos de *Bixa orellana* en la línea celular HeLa fue S11 > H11 > S9 > H9, con valores de IC₅₀ de 37.29 ± 1.15, 64.95 ± 2.65, > 200, > 200 µg/mL, respectivamente; mientras que el orden de actividad en células RAW fue S9 > S11 > H11 > H9 con valores de IC₅₀ de 66.04 ± 0.73 µg/mL para el extracto S9, 80.79 ± 1.12 y 130.83 ± 3.19 µg/mL para S11 y H11, respectivamente; mientras que para H9 fue > 200 µg/mL. Los resultados obtenidos demuestran que *Bixa orellana* L. podría ser un recurso natural con un gran potencial para la búsqueda de nuevos agentes bioactivos.

INTRODUCCIÓN

El uso de medicinas alternativas como los son las plantas medicinales y los suplementos dietarios ha sido una práctica tradicional que no ha caído en desuso (Barthelson, 2016). Se estima que 80% de la población mundial utiliza remedios herbolarios tradicionales y, que al menos 35,000 especies vegetales presentan potencial para uso medicinal y muchas de ellas aún no han sido estudiadas (Annan y Houghton, 2007). La gran diversidad vegetal y la amplia riqueza cultural de México han favorecido el aprovechamiento de las plantas con fines medicinales desde épocas prehispánicas (Martínez, 2016), este patrimonio cultural se ha transmitido de generación en generación, de manera que algunas costumbres en la actualidad subsisten y son ejercidas de manera cotidiana, tanto en áreas rurales como urbanas (Bye y Linares, 2003). Estas prácticas médicas permanecen vigentes debido a que, entre otras cosas, los tratamientos con plantas medicinales tienen menores efectos secundarios que los fármacos sintéticos, además, que son más accesibles en relación a su costo.

Como bien se sabe en la medicina tradicional, *Bixa orellana* L. (achiote) posee una diversidad de usos tradicionales en diferentes regiones de América; los tejidos de la planta utilizados son las semillas, hojas, raíces y las flores; las hojas y las raíces que se usan para tratar patologías del hígado, de la piel, dolores de cabeza, inflamación de anginas, antigonorréicas; las semillas se utilizan como expectorantes, en padecimientos como gastritis y diabetes; el aceite que se extrae de las semillas contra el sarampión, la viruela, afrodisiaco, entre otros (De Araújovilar y col., 2014).

Aun cuando el achiote posee numerosas propiedades benéficas para la salud, este no atrae al consumidor como planta medicinal, sino como un condimento de exquisito gusto, agradable aroma y textura tierna. Debido a esto las investigaciones realizadas en México con respecto al achiote hasta el momento se han enfocado a mejorar la producción y la calidad de este cultivo. Sin embargo, debido a su riqueza en nutrientes, "fitoquímicos", el achiote es un recurso natural interesante que puede ser estudiado como fuente potencial de compuestos bioactivos con posibles aplicaciones como nuevos tratamientos contra padecimientos como cáncer, diabetes, obesidad, estrés, entre otros. Considerado los reportes en la literatura acerca de la amplia gama de actividades biológicas del achiote y siendo este uno de los principales cultivos en el sureste de México, es interesante y de gran utilidad realizar estudios sobre su composición química y actividades biológicas.

OBJETIVOS

General

Determinar la actividad antioxidante, antibacteriana, antiproliferativa, y perfil fitoquímico del extracto metanólico de hojas y semillas de *Bixa orellana* L. (achiote).

Específicos

1. Determinar el perfil fitoquímico de dos accesiones de achiote (*Bixa orellana* L.)
2. Determinar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hojas y semillas de *Bixa orellana* L., el contenido de fenoles totales y flavonoides totales por métodos espectrofotométricos.
3. Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de *Bixa orellana* L. sobre *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC14028.
4. Evaluar el efecto antiproliferativo de los extractos metanólicos de achiote sobre las líneas celulares RAW 264.7 y HeLa.

JUSTIFICACIÓN

En México, los Estados que se dedican al cultivo del achiote (*Bixa orellana* L) son principalmente los que comprenden la Península de Yucatán (Campeche, Quintana Roo y Yucatán), además, Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Guerrero y Veracruz. La importancia económica del achiote radica en su uso como colorante en la industria de los alimentos, cosméticos y farmacia, debido a que el aceite de sus semillas posee un alto contenido de carotenoides, que provee propiedades antioxidantes a dichos productos. Por este motivo los estudios sistemáticos de *Bixa orellana* L. Se enfocan en la mejora de los cultivos, propagación, caracterización y mejora genética de este. Sin embargo, esta reportado de manera limitada en la literatura que posee una amplia gama de actividades biológicas, por lo cual es necesario que se incremente el conocimiento sobre la caracterización química de los metabolitos secundarios en semillas y hojas; así como evaluar actividades biológicas relacionadas con su potencial antioxidante para conferir un valor agregado a este producto natural y promover el mejor aprovechamiento de la planta, no sólo las semillas, sino también hojas y cápsula.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Plantas con Propiedades Medicinales

Los servicios de la medicina tradicional presentan una demanda creciente, ya que es utilizada como una alternativa para mantener la salud, prevenir y tratar enfermedades, especialmente en las zonas rurales. México es un país rico en biodiversidad vegetal que ofrece una fuente inagotable de plantas con propiedades curativas, muchas especies de plantas con flores tienen atributos medicinales, más o menos una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. Este patrimonio cultural se ha transmitido de generación en generación, de manera que algunas costumbres subsisten y son ejercidas de manera cotidiana, tanto en áreas rurales como urbanas, estas prácticas médicas permanecen vigentes debido a que, entre otras cosas, los tratamientos tradicionales están basados en la enfermedad como es concebida dentro de su cultura, por lo que es pertinente percibir el tratamiento tradicional como un aspecto integrado en ella (Ryesky, 2006). Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo sólo en 5% de estas especies. Los antiguos pobladores de nuestro territorio desarrollaron una de las herbolarias más complejas del mundo, debido a la riqueza cultural y étnica que alcanzaron; así pues, desde tiempos prehispánicos diferentes grupos étnicos han usado plantas con fines medicinales (Ocegueda y col., 2005).

Algo importante que cabe destacar es que la medicina tradicional es asociada fuertemente a las plantas medicinales, su recurso más abundante, accesible y conocido, sin embargo, la medicina tradicional es mucho más que botánica medicinal, ya que podemos encontrar una amplia gama de “especialistas” considerados terapeutas tradicionales, entre los cuales se encuentran los curanderos, yerberos, sobadores, rezadores, hechiceros, parteras etc., todos ellos además de utilizar la herbolaria realizan ceremonias o rituales con un alto contenido de simbolismos curativos, así mismo la utilización de recursos animales como huevos, leche o miel, productos que se emplean para lograr la curación del enfermo y aliviar sus malestares.

En México ha existido una gran tradición en el estudio químico de las plantas, sin embargo, éste ha estado enfocado desde un punto de vista fitoquímico. En la última década este enfoque ha cambiado consideradamente, tanto en nuestro país como a nivel mundial, de tal manera que ahora se busca extraer los compuestos bioactivos y evaluar sus diversas actividades biológicas. En nuestro país existe una extensa variedad de tratamientos fitoterapéuticos que forman parte de la herbolaria tradicional mexicana. Soportada por aproximadamente 4,500 especies, ésta

ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas (Martínez, 2016; Barragán, 2016). Tanto en los países desarrollados como en los que están en vías de desarrollo, el uso y la comercialización de fitofármacos y productos naturales con fines medicinales muestran un crecimiento acelerado en los últimos años (Hernández y Roldán, 1994), lo que se evidencia con el aumento significativo en la demanda mundial por estos productos. También se ha comprobado que algunas plantas que se utilizan con fines medicinales tienen principios activos que se emplean para la elaboración de fármacos comerciales.

Metabolitos Secundarios de las Plantas

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Para defenderse del daño ocasionado por heridas y el ataque por insectos o microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano. La composición y la estructura de la pared celular vegetal también cambian, formando una barrera más rígida y menos digerible para insectos. Estas respuestas de defensa a su vez, se combinan con el desarrollo de estructuras contra sus depredadores, tales como las espinas, las espigas, los tricomas y los pelos glandulares. Así mismo y como parte de la protección química, otra estrategia utilizada por las plantas es la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros, o con actividad antioxidante (Gabriela Sepúlveda-Jiménez, D, 2003). Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también, una síntesis activa de estos se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), el ataque por microorganismos como virus, bacterias y hongos; la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y, la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Ringuelet y Viña., 2013).

Los metabolitos secundarios son compuestos derivados del metabolismo primario, pero de limitada distribución en el reino de las plantas, restringidos a un grupo taxonómico particular (Shilpa y col., 2010). Antiguamente se aceptó que las sustancias secundarias se producían con funciones relativas inespecíficas, después se encontró que muchas de estas poseen altos rendimientos y que tienen múltiples funciones en las plantas (Wink, 2007). Este tipo de

metabolitos constituyen una fuente importante de principios activos de medicamentos e importantes compuestos químicos (Goossens y col., 2003). Aunque gran parte de los medicamentos se obtienen por síntesis química, la mayoría de las estructuras principales están basadas en productos naturales. Mundialmente existe un 44% de nuevos medicamentos basados en productos naturales y en países desarrollados el 25% de los medicamentos son derivados de plantas (Haq, 2004).

Los compuestos secundarios de plantas de interés comercial, han sido incluidos en tres principales categorías según sus rutas biosintéticas: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados. Los terpenos se forman por la polimerización de unidades de isoprenos y esteroides y se dividen en seis grupos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y esteroides, dentro de los cuales se encuentran carotenos, glicósidos cardiotónicos, taxol, entre otros. Entre los compuestos fenólicos se incluyen los ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos. Las aplicaciones farmacéuticas de estos compuestos son considerables, se refieren sus efectos como analgésicos, antibacterianos, antihepatotóxicos, antioxidantes, antitumorales, inmunoestimulantes, entre otras. Los compuestos nitrogenados son principalmente los alcaloides y glucósidos cianogénicos; estos son fisiológicamente activos en humanos (cocaína, nicotina, morfina) y de gran interés en la industria farmacológica. Por otra parte, los glucósidos cianogénicos, se consideran posiblemente, los metabolitos secundarios con mayor relación en las funciones de defensa (Perez-Alonso, 2011).

Tamiz Fitoquímico

La fitoquímica comprende el estudio de metabolitos secundarios presentes en especies vegetales, los cuales pueden ser fenoles y polifenoles, quinonas, flavonas y flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides y aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos, glucósidos y saponinas (Prashant y col., 2011), así como esteroides y xantonas. Para conocer el tipo de compuestos presentes en las plantas pueden usarse diferentes técnicas, tales como el tradicional tamizaje fitoquímico, cromatografía de gases, cromatografía de capa delgada, cromatografía de líquidos de alta resolución, espectrofotometría de masas, espectrofotometría infrarroja, entre otras (Lock, 1988).

Aunque en la actualidad existen técnicas avanzadas para determinar la naturaleza química de los metabolitos de las plantas, los ensayos fitoquímicos tradicionales aún constituyen una forma confiable de realizar un análisis cualitativo de los extractos, ya que arrojan información

preliminar acerca de su composición. Cuando se investigan muchos extractos de plantas, esto constituye una ventaja ya que permite descartar todas aquellas especies que no tienen potencial para ser utilizadas para algún beneficio farmacológico, quedando solamente las que sí lo tienen. El tamiz fitoquímico consiste en la obtención de extractos de plantas con solventes apropiados, tales como agua, acetona, alcohol, cloroformo y éter, etc., (Prashant y col., 2011). Posterior a la extracción, se llevan a cabo reacciones de coloración, las cuales son reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Algunas de las reacciones evalúan grupos de sustancias y otros la presencia de otros compuestos como ácidos grasos, azúcares reductores, polisacáridos y mucílagos (Sharapin, 2000).

***Bixa orellana* L.**

Bixa orellana L, comúnmente conocida como annatto o achiote, pertenece a la Familia Bixaceae. Es un arbusto de 3–6 m de altura, originario de América Central y Sur América, es uno de los pigmentos naturales más antiguos que se conocen (Shahid-ul-Islam, 2016) (Figura 1).



Figura 1. *Bixa orellana* L. Fuente: Dra. Addy Leticia Zarza García. Universidad Autónoma de Ciudad del Carmen, Campeche

Las hojas son simples, grandes, verdosas claras, de márgenes lisos. Las flores se disponen en ramilletes, blanquecinas a rosadas según las variedades. El fruto es una cápsula

roja de 2 a 6 cm de largo, con pelos gruesos espinosos, puede ser verdoso oscuro a morado (según las variedades), que al madurar pasa a pardo rojizo oscuro. En cada cápsula hay semillas en número variable (10-50, en relación con el tamaño capsular) (Figura 2). La semilla es comprimida, de aproximadamente 5 mm de largo, con tegumento recubierto de una sustancia viscosa de color rojizo intenso. El pigmento está localizado en la superficie de la semilla, como una cubierta resinosa y aceitosa, está formado fundamentalmente por bixina, con trazas de norbixina, éster de dimetil bixina y otros apocarotenoides (Giuliano, 2003).



Figura 2. Cápsula y semillas de *Bixa orellana*. Fuente: Dra. Addy Leticia Zarza García. Universidad Autónoma de Ciudad del Carmen, Campeche.

El achiote se encuentra distribuido por toda la región neotropical, desde México hasta Perú y Brasil, y se ha extendido a África y Asia. En México, los Estados que se dedican a su cultivo comprenden la Península de Yucatán (Campeche, Quintana Roo y Yucatán), Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Veracruz y en el noroeste, parte de Nayarit y Sinaloa.

El análisis fitoquímico de *Bixa orellana* ha llevado al aislamiento e identificación de una serie de compuestos estructuralmente diversos. El achiote es rico en carotenoides, especialmente apocarotenos como la bixina, isobixina y norbixina; también se describen el β -caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina, orellina, entre otros. Además, las semillas contienen lípidos como el ácido linoleico, y en menor cantidad el α -linolénico y oleico; aminoácidos como el glutamato, aspartato y leucina; algunos sesquiterpenos, flavonoides y contiene altas

concentraciones de fósforo, trazas de calcio y gran cantidad de hierro y zinc, así como vitaminas (A, D y C) (Rodríguez, 2007).

Debido a la abundante evidencia etnomédica que apoya el potencial terapéutico del achiote, se han realizado múltiples investigaciones para determinar su actividad biológica. En un estudio basado en los usos populares de esta especie en Guatemala, se demostró que el extracto alcohólico al 50% de la corteza de *B. orellana* tiene actividad contra *Neisseria gonorrhoea* (Cáceres A. y col., 2005). Por otro lado, el extracto metanólico de las hojas mostró actividad antibacteriana contra agentes causantes de la diarrea y disentería, incluyendo *Shigella dysenteriae* (Shilpi J. y col., 2016). En un estudio realizado por Júnior A. y cols. en el 2005 se demostró que la norbixina induce efectos sobre la lesión de las células de *Escherichia coli* DNA-inducido por radiación ultravioleta, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y aniones superóxidos, concluyendo que la norbixina protege a las células contra estos agentes, incrementando su sobrevivencia en por lo menos 10 veces. También se ha reportado que tiene propiedades antimutagénicas con un máximo de inhibición de la actividad mutagénica (Júnior A. y col., 2005).

Infecciones bacterianas

La patogenia de las infecciones bacterianas engloba el comienzo del proceso infeccioso y los mecanismos que provocan la aparición de los signos y síntomas de la enfermedad. Las características de las bacterias de importancia médica son el potencial de ser transmisibles, su adherencia a las células del hospedador, la invasión de las células y tejidos del hospedador, su toxigenicidad y su capacidad para evadir el sistema inmunitario. Muchas infecciones producidas por bacterias que suelen considerarse patógenas permanecen ocultas o son asintomáticas. La enfermedad ocurre cuando la bacteria o las reacciones inmunitarias que se desencadenan por su presencia dañan lo suficiente a la persona (Jawetz, 2016).

Durante el proceso infeccioso se presenta una interacción entre hospedero-microorganismo, la cual cada día se comprende mejor, gracias a los avances en el estudio sobre patogénesis molecular, al desarrollar técnicas como la PCR y la secuenciación del ADN entre muchas otras. Dentro de los pasos que se presentan en el proceso infeccioso se pueden mencionar: adhesión, invasión, replicación, resistencia a los mecanismos de defensa y daño al hospedero. La bacteria experimenta severos cambios ambientales cuando entra al hospedero por

vía oral como, por ejemplo: pH ácido, aumento de temperatura, baja tensión de oxígeno y alta osmolaridad y las bacterias responden a estos cambios modulando la expresión de sus genes (Figuroa, 2015). Una vez dentro del cuerpo, las bacterias se deben unir o adherir a las células hospedadoras, casi siempre a las células epiteliales, cuando las bacterias han establecido un sitio primario de infección, se multiplican y dispersan directamente a través de los tejidos o por el sistema linfático hasta el torrente sanguíneo (Coserton, 2009).

La supervivencia de un microorganismo en un ambiente determinado depende de su habilidad para adherirse, las adhesinas de la bacteria tienen una estructura que les permite reconocer moléculas presentes en las células del hospedero llamadas receptores, con una estereoquímica específica. Esta unión determina los hospederos y el organotropismo de las bacterias; además, las adhesinas tienen la capacidad de activar a los linfocitos B y neutrófilos, lo que resulta en una variedad de respuestas biológicas incluyendo proliferación celular y secreción de citosinas (Edwards y Puente, 2018).

Los efectos patógenos provocados por las bacterias en los tejidos pueden agruparse en las cuatro clases siguientes: 1) efectos provocados por la acción directa local de la bacteria sobre los tejidos, 2) efectos mecánicos, 3) efectos de respuesta del organismo ante ciertas infecciones bacterianas en los tejidos y 4) efectos provocados por toxinas producidas por las bacterias, sustancias químicas que resultan tóxicas en algunos tejidos. Las toxinas son, en general, específicas de cada especie (Carmona y Beltran, 2007).

Bacterias de Importancia Médica

La familia Enterobacteriaceae constituye un grupo muy numeroso y heterogéneo de bacilos gram negativos. Se encuentran en el suelo, el agua o la vegetación; algunos forman parte de la flora intestinal de la mayoría de los animales y del hombre. Algunos miembros de esta familia se consideran patógenos primarios, ya que siempre se asocian a enfermedad cuando se aíslan en muestras clínicas, otros, sin embargo, forman parte de la flora comensal normal y pueden causar infecciones oportunistas. Se caracterizan por su capacidad de adaptación de forma extraordinaria a la acción de los antimicrobianos, lo que hace que el tratamiento de estos microorganismos se esté convirtiendo en un reto actual (Gutiérrez y col., 2014).

La familia Enterobacteriaceae consta de varios géneros: *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*.

El género *Salmonella* está constituido por bacterias Gram-negativas, intracelulares facultativas, que se han agrupado en las especies *S. entérica* y *S. bongori*. Sin embargo, el potencial patogénico está representado por *S. entérica* y por sus más de 2,600 serotipos descritos hasta la fecha. Aquellos serotipos causantes de enfermedad en animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie entérica y comparten más de 90% de su ADN. Sin embargo, tienen diferencias importantes tales como el rango de hospederos a los cuales infectan y los síntomas clínicos de la enfermedad que producen (Andinoy Hanning., 2015). Es así como *S. enteritidis* y *S. typhimurium* poseen un amplio rango de hospederos y la mayoría de las veces generan una enfermedad gastrointestinal en el ser humano, infección sistémica en el ratón y un cuadro crónico asintomático en aves. Otros serotipos en cambio, tienen una alta especificidad de hospedero y generalmente causan la enfermedad en una única especie animal, como es el caso de *S. typhi*, que afecta sólo al ser humano generando una enfermedad sistémica denominada fiebre tifoidea (Uzzau y col., 2000).

Salmonella se transmite por la vía fecal-oral, ya sea directamente, o bien indirectamente, a través de los alimentos. Es capaz de sobrevivir la acidez del estómago y la alta osmolaridad del intestino delgado, induce su internalización por las células epiteliales intestinales del íleon y resiste la fagocitosis mediada por las células dendríticas y macrófagos, logrando colonizar el tejido linfoide subyacente y los ganglios linfáticos mesentéricos (Cossart y col., 2004). Los macrófagos se consideran las células blanco de la infección, ya que la bacteria se establece en un compartimiento ácido conocido como la vacuola que contiene a *Salmonella*, donde es capaz de evadir la actividad lítica de los componentes lisosomales, multiplicarse y propagarse en el tejido intestinal o en el resto del organismo de su hospedero cuando se establece una infección local o sistémica, respectivamente (Dandekar y col., 2014).

En México no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por *Salmonella*. Con frecuencia, el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero. La falta de un sistema de vigilancia con comunicación entre epidemiólogos, clínicos y el sector veterinario, así como la falta de infraestructura necesaria, impide que países como el nuestro pueda identificar las principales serovariedades de *Salmonella* en las diferentes clases de

alimentos, así como el riesgo que cada una de estas entrañas para la salud de los seres humanos (Muzaret y col., 2006).

Escherichia coli es una bacteria Gram-negativa en forma de bacilo, flagelada, móvil, anaerobia facultativa, oxidasa negativa, indol positivo. A pesar de que es considerada como un microorganismo comensal de la microbiota intestinal del ser humano, existen cepas patógenas que pueden causar daño al huésped. Estas cepas patógenas se clasifican en base a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico (principalmente diarrea) en seis grupos: *E. coli* enterotoxigénica, enterohemorrágica, enteroinvasiva, enteropatógena, enteroagregativa y *E. coli* de adherencia difusa (Rodríguez, 2007). Las manifestaciones clínicas de las infecciones por *E. coli* y las otras bacterias entéricas dependen del lugar de la infección y no se pueden distinguir por los síntomas o los signos de procesos causados por otras bacterias.

Las enfermedades diarreicas son la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco años, y ocasionan la muerte de 760 000 millones de niños cada año (OMS, 2013). Dentro de la vigilancia epidemiológica que llevan a cabo las autoridades de salud de México, se ha reportado que el EPEC (*Escherichia coli* enteropatógena por sus siglas en inglés) se presenta de manera endémica hasta en 6% de la población, cifra muy parecida a la que presentan países industrializados como Alemania y Australia. En estos países se ha encontrado que 5.9% y 7.6%, respectivamente, de niños sanos son portadores normales de cepas de EPEC.

La Familia *Micrococcaceae* comprende cocos Gram-positivos, no exigentes, catalasa positivos, con agrupación en racimos, aerobios o anaerobios facultativos. De los tres géneros que la integran, *Micrococcus*, *Planococcus* y *Staphylococcus*, este último es el único de importancia médica. Se caracteriza por ser aerobio anaerobio facultativo, capaz de fermentar la glucosa en anaerobiosis; poseer ácidos teicoicos en su pared, y ser sensible a la enzima lisostafina. Dentro del género *Staphylococcus* se conocen más de 20 especies, de las cuales *S. aureus* es la más importante. Otras especies como *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* son actualmente reconocidas como capaces de actuar como patógenos bajo determinadas circunstancias. *Staphylococcus* es Gram-positivo, tiene forma de coco y puede aparecer en parejas, en cadenas o en racimos. Su tamaño oscila entre 0.8 a 1.5 micras de diámetro, es inmóvil y algunas cepas producen una cápsula externa mucoide que aumenta su capacidad para producir infección. En relación con su metabolismo, es anaerobio facultativo, coagulasa positivo, catalasa positivo y oxidasa negativo (Jawetz, 2016).

Dicho género tiene una gran capacidad de adaptación, por lo cual afectan a todas las especies conocidas de mamíferos, incluyendo a los roedores comunes de laboratorio. Es por ello que, gracias a su fácil propagación, pueden transmitirse de una especie a otra, siendo frecuentes los casos humano-animales y viceversa. De aquí surge la importancia de conocer más acerca de este patógeno, ya que, además de los animales, los mecanismos de invasión abarcan también fómites y el contacto de persona a persona. (Zendejas-Manzo y col., 2014).

Métodos de Evaluación de Actividad Antibacteriana

Tanto los mecanismos de acción como los métodos para determinar la actividad antimicrobiana que tienen los extractos y aceites esenciales se encuentran definidos, en consecuencia, existen diferentes métodos que incluyen las determinaciones de las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC), la eficacia antimicrobiana y la evaluación de espectro antimicrobiano, entre otros. La mayoría de los métodos *in vitro* consisten en añadir un volumen conocido del extracto diluido principalmente en etanol o metanol, directamente en un tubo o caja petri que contenga el medio adecuado para el microorganismo en prueba, o bien tener el medio estéril y después inocular el microorganismo de interés (López y col., 2005).

Los métodos de evaluación de los extractos o aceites esenciales mediante el contacto directo han sido uno de los más utilizados en los diversos estudios, ya que se busca remplazar a los conservadores sintéticos; los cuales son añadidos durante la formulación de un alimento, de tal manera que los aceites esenciales se evalúan al añadirlos directamente en forma líquida, ya sea en un producto alimenticio o un medio sintético.

El método de dilución en agar es utilizado generalmente para determinar si el extracto es letal contra un microorganismo, además se usa con microorganismos aeróbicos o microaerofílicos con una velocidad variable de crecimiento. Para esta técnica, se preparan diferentes diluciones de los extractos; posteriormente, las diluciones se añaden a los agares y estos son puestos en cajas petri para su solidificación. Finalmente, los microorganismos en prueba previamente diluidos son inoculados en los agares e incubados a su temperatura y tiempo óptimos (López-Malo y col., 2015).

El método de dilución y microdilución seriada se lleva a cabo en tubos o pozos con medios líquidos (caldos), los cuales contienen concentraciones crecientes (serie de dilución doble) de

extracto diluido en el caldo, en el cual se inocula un número definido de células bacterianas. El volumen final de la prueba define si el método se denomina de dilución cuando se utilizan tubos con un volumen total de 1-10 mL, o de microdilución si se realiza en placas de pozos usando un máximo de 500 µL por pozo. Posterior a la incubación (16-24 h dependiendo del microorganismo), la presencia de turbidez o sedimentación indica crecimiento del microorganismo. Finalmente, para rectificar la inhibición, se toman alícuotas de los tubos o pozos sin turbidez y se hace un sembrado en agar (López-Malo y col., 2015).

Cáncer

En la actualidad, el cáncer representa un gran reto social, toda vez que su incidencia aumenta con el desarrollo económico e industrial de los países, así como con el perfeccionamiento de los sistemas de salud, puesto que a mayor esperanza de vida corresponde una mayor población en los grupos de edades en los que las neoplasias aparecen con más frecuencia (Fernández y col., 2013). Este padecimiento que se caracteriza por ser una alteración del equilibrio entre la proliferación y los mecanismos normales de muerte celular en un determinado tejido siendo el resultado de múltiples alteraciones genéticas sucesivas que confieren a las células transformadas particularidades como: la capacidad de crecimiento autónomo, evasión de apoptosis, insensibilidad a señales antiproliferativas y capacidad de invasión tisular, entre otras que las distinguen de las células normales del organismo (Anand y col., 2008).

El cáncer puede iniciar prácticamente en cualquier célula del cuerpo debido a daños o defectos en los genes encargados de la división y muerte celular. Las mutaciones van incrementando con el tiempo, lo que explica por qué suele desarrollarse el cáncer en etapas avanzadas de la vida. Aun no se conoce exactamente cuál es la causa que provoca estos cambios en la célula, pero la alimentación, el estilo de vida, las infecciones virales, la exposición a radiaciones o productos químicos dañinos, así como genes hereditarios son algunos de los factores que pueden aumentar el riesgo de padecer cáncer (Martínez, 2013). La importancia del problema del cáncer se define con dos parámetros: 1) las cifras de incidencia del cáncer o nuevos casos que aparecen cada año y 2) las cifras de mortalidad anual por cáncer. Factores genéticos y medioambientales contribuyen al incremento en la morbilidad y mortalidad de distintos tipos de cáncer (Cavia y col., 2007).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que una de las principales causas de muerte en las mujeres es el cáncer, principalmente de tipo ginecológico. Sin embargo, los hombres no se encuentran exentos de esta enfermedad, de tal manera que dentro del grupo de tumores malignos que se ha encontrado que afectan a ambos sexos, el cáncer de pulmón, tráquea y bronquios tiene mayor incidencia en los varones (WHO, 2013). Asimismo, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) señala al cáncer cérvico-uterino como un importante problema de salud pública entre las mujeres del mundo en desarrollo, especialmente en América Latina y el Caribe. Igualmente reporta que, aun cuando esta enfermedad puede evitarse en gran medida, los esfuerzos colectivos para prevenirla no han logrado disminuir su efecto en la región de las Américas (PAHO, 2012). En México, al igual que en el plano internacional, existe un incremento en los casos de cáncer (INEGI, 2010). Durante 2009 las principales causas de morbilidad hospitalaria en la población mexicana fueron por tumores malignos en los órganos hematopoyéticos (leucemias en su mayoría) con 17.9%; órganos digestivos con 14.8%; y mama con 12.5% de los casos; en contraste, los tumores del labio, de la cavidad bucal y de la faringe (1.6%); ojo y sus anexos (0.5%) y los tumores malignos (primarios) de sitios múltiples independientes (0.1%), presentan los porcentajes más bajos (INEGI, 2012).

Entre los hombres, las principales causas de morbilidad hospitalaria se presentaron en órganos hematopoyéticos (22.8%); órganos digestivos (17.5%); y del tejido linfático y afines que incluye sarcoma de Kaposi y linfoma de células T, periférico y cutáneo (9.8%). Mientras los que reportaron menos casos fueron en tumores de ojo y sus anexos (0.6%); mama (0.4%); y los tumores malignos (primarios) de sitios múltiples independientes (0.1%) (INEGI, 2012).

En las mujeres, el cáncer de mama constituye la principal causa de morbilidad hospitalaria (22.0%); seguida de los tumores de los órganos hematopoyéticos (14.1%) y de los órganos genitales femeninos (13.5%). En contraste, las tasas más bajas se observan para el cáncer de labio, de la cavidad bucal y de la faringe (1.2%), ojo y sus anexos (0.5%) y los tumores malignos (primarios) de sitios múltiples independientes (0.1%) (INEGI, 2012).

Métodos para Determinar Actividad Antiproliferativa

Comúnmente, en los estudios de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares, se emplean diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de manera indirecta el número de

células viables presentes después de un tratamiento. La mayoría de éstos son de punto final, al usarse de forma destructiva, lo cual imposibilita seguir el comportamiento de las células después de ser sometidas a un tratamiento. Una prueba *in vitro* ideal para evaluar la proliferación celular y la citotoxicidad debe tener como características principales: ser simple, rápida, eficiente, económica, reproducible, sensible, segura, efectiva en la medida de la población celular viable y, que no muestre interferencia con el compuesto a evaluar.

Tal es el caso de la sulforodamina B (SRB) es un colorante de aminoxantano, rosado brillante, posee dos grupos sulfónicos $-SO_3^-$ cargados negativamente, capaces de unirse electrostáticamente a cationes. En condiciones ácidas, la SRB aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, y se fija selectivamente a éstos, proporcionando un índice del contenido de proteína celular si las células son previamente fijadas con ácido tricloroacético (TCA), y después de eliminar el colorante no fijado, el colorante unido a las células viables se extrae con medio alcalino y se lee la absorbancia a 564 nm (Monks y col., 2011).

Por otro lado, el método de reducción de la resazurina fue introducido como un indicador de viabilidad celular no tóxico que puede ser utilizado para monitorear la proliferación celular y la citotoxicidad. El método es descrito como un indicador de óxido-reducción que tiene propiedades de fluorescencia y responde a la actividad metabólica tanto de células humanas como de bacterias (Rasmussen, 2018; Benavides y col., 2014). El ensayo de reducción con resazurina ha sido usado por más de cincuenta años para monitorear contaminación de leche por bacterias y levaduras incluso en estudios de valoración de la calidad de semen; sin embargo, hace relativamente poco tiempo esta técnica empezó a ser usada en la valoración de la proliferación celular y citotoxicidad en diferentes tipos de células como fibroblastos, linfocitos humanos y de ratones, cultivos primarios de células neuronales y líneas tumorales (O'Brien y col., 2013). La resazurina es poco tóxica para las células ya que el producto de la oxidación, denominado resorufina, se difunde al medio e inicialmente al no concentrarse al interior de la célula no induce muerte, como sí ocurre en otras técnicas. Además, este método lo describen como sensible y altamente reproducible. Esto permite la continuidad de estudios en las mismas células, economizando tiempo y dinero, especialmente en cultivos primarios donde las células son muy escasas y apreciadas (Hamid y col., 2004). La resazurina (azul no fluorescente) es reducida a resorufina (rojo altamente fluorescente) por óxido-reductasas que se encuentran principalmente en la mitocondria de células vivas. Así, la medida de fluorescencia obtenida de la resazurina es un indicador de la función mitocondrial.

Una de las técnicas más utilizadas y método estándar para medir la proliferación celular es la reducción metabólica del MTT, dicho método fue desarrollado por Mosmann en 1983 para determinar la supervivencia y capacidad de proliferación de células mamíferas. El método se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio, realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul denominado formazan. El cambio de color se produce únicamente en las células vivas y metabólicamente activas. La principal ventaja de ese ensayo es la velocidad con la que las muestras son procesadas, los pasos finales del ensayo (adicción del MTT, lectura de la placa y obtención de resultados) toman considerablemente menos tiempo que los iniciales (cultivo de células y adición de factores de crecimiento o diluciones), así como que los resultados que se obtienen son claramente visibles, lo que representan una ventaja si se necesitan datos cualitativos de forma rápida (Mosmann, 1983). El método fue modificado por Francois Denizot y Rita Lang en 1985 al encontrar ciertas limitaciones, como la alteración de las propiedades espectrales del formazan, lo que evitaron al utilizar propanol puro o etanol para solubilizar rápidamente el formazan, el uso de mayores concentraciones de MTT, bandejas de microtitulación más grandes para aumentar la zona de lectura, así como utilizar un espectrofotómetro de longitud onda dual (Denizot y Lang., 1986).

Estrés Oxidativo y su Importancia Biológica

Desde un punto de vista bioquímico, la oxidación se refiere a todo proceso en el que ocurra: por un lado, pérdida de electrones, captación de electrones o cesión de hidrógeno y por otra reducción en aquel que se captan dichos electrones o se pierdan oxígenos. Esta oxidación es fundamental para la vida ya que participa en los procesos de obtención de la energía celular. Sin embargo, cuando existe un exceso de oxidación aparece el estrés oxidativo que es una realidad compleja en todos los niveles biológicos que no se puede medir ni definir con un solo parámetro. Hay una multitud de enfermedades que se han relacionado con el estrés oxidativo y la generación de radicales libres. Por esto, terapias antioxidantes y dietas ricas o enriquecidas con antioxidantes parecen prevenir o al menos disminuir el deterioro funcional orgánico originado por un exceso de estrés oxidativo (Elejalde, 2001).

Aunque el oxígeno es un recurso esencial para la vida, paradójicamente puede ser también fuente de enfermedad, a través de una producción incontrolada de radicales libres de

oxígeno (RLO) mismas que alteran procesos celulares como funcionabilidad de la membrana celular y producción de enzimas, dañan las macromoléculas (hidratos de carbono, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos). Al haber un exceso de radicales libres estos rompen el equilibrio de las reacciones óxido-reducción, produciéndose de esta manera el estrés oxidativo. Las células constantemente generan especies reactivas de oxígeno (ROS), dichas especies juegan un papel protector y funcional en el sistema inmunológico. Las células son armadas con un poderoso sistema antioxidante que tiene como fin el combatir esta excesiva producción de las distintas especies reactivas como los radicales libres (Eruslanov y Kusmartsev., 2010). Dichos radicales libres se producen durante la transformación de los alimentos en energía por parte de las células, durante el ejercicio pesado o hiperoxia o por exposición a factores externos como la radiación ionizante, luz ultravioleta, humo del tabaco, etc. Por un lado, de la balanza se encuentran los RLO inorgánicos y los orgánicos, del otro lado se encuentran sustancias que tienen la capacidad de oponerse a la reacción del oxígeno y ciertas especies oxidantes, independientemente de su mecanismo, denominadas antioxidantes (Elejalde, 2001).

Métodos para Evaluar la Actividad Antioxidante

En la actualidad, existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las evaluaciones *in vitro* de la capacidad antioxidante de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración (Kuskoski y col., 2005).

Se han desarrollado varios métodos químicos para determinar el potencial antioxidante. En general, existen dos tipos de métodos que dependen del mecanismo de acción de los antioxidantes. La primera, involucra la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y la segunda, la transferencia de electrones individuales (SET) (Dudonne y col., 2009). Las pruebas tipo HAT son más relevantes para evaluar la capacidad de los antioxidantes para romper la reacción de oxidación en cadena de los lípidos. Las reacciones HAT dependen del solvente y del pH y generalmente son rápidas, completándose típicamente en segundos o minutos. La mayoría de las pruebas de tipo HAT monitorean la cinética de una reacción competitiva. La cuantificación se deriva de curvas cinéticas. Éste tipo de métodos usualmente están compuestas por un generador de radicales libres sintético, una molécula oxidable y un antioxidante (Karadag y col., 2009). En los métodos SET, la reactividad relativa se basa en el potencial de desprotonación e ionización

del grupo funcional reactivo. Este tipo de ensayos básicamente constan de un antioxidante y una molécula oxidante. El oxidante extrae un electrón del antioxidante, causando un cambio de color que es proporcional a la concentración de antioxidante. La reacción llega a su fin cuando se detiene el cambio de color (Karadag y col., 2009). Algunas pruebas tipo SET son el método por el radical ABTS•+ y el método por el radical DPPH•.

Los métodos para la determinación de la actividad antioxidante que comúnmente se utilizan son ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), 2, 4,6-tripiridil-s-triazina (FRAP), capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Cada uno de estos métodos presenta ventajas y desventajas. En el ensayo FRAP se mide la capacidad de una muestra para reducir metales mientras que en los métodos ABTS, DPPH y ORAC se mide la capacidad de los compuestos antioxidantes para capturar radicales libres. Dentro de estos métodos de análisis existen diferentes mecanismos de reacción. En los métodos FRAP, ABTS y DPPH ocurre una reacción con transferencia electrónica denominada transferencia de electrones individuales (SET), mientras que en el método ORAC ocurre una reacción denominada transferencia de átomos de hidrogeno (HAT) (Sánchez-Moreno y col., 1998; Huang, 2005; Samaniego-Sánchez y col., 2007).

El método del DPPH fue desarrollado por Brand-Williams y col., (1995). Es una técnica sencilla, de fácil preparación; sin embargo, el radical DPPH solo es soluble en medios orgánicos por lo que no es útil para medir la actividad en compuestos de naturaleza hidrofílica. Este método se basa en la capacidad del radical libre estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo para reaccionar con donadores de hidrógeno. El radical DPPH tiene un máximo de absorbancia a 517 nm y genera un producto incoloro cuando captura un antioxidante. De esta forma, se mide la disminución de la absorbancia de una disolución estable del radical DPPH en presencia de sustancias antioxidantes con grupos -OH activos donadores de hidrógeno capaces de capturar los radicales libres. Al inicio del ensayo, el radical DPPH posee un electrón desapareado mostrando un color azul-violeta, en presencia de una sustancia antioxidante el radical DPPH se reduce por lo que se decolora a amarillo pálido. Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH.

METODOLOGÍA

Muestra

Los extractos metanólicos de *Bixa orellana* L. utilizados en este estudio fueron proporcionados por el Dr. Luis Pinzón López, del Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, a través de la Dra. Addy Leticia Zarza García de la Universidad Autónoma del Carmen, Campeche. Brevemente, se describe el proceso de obtención de los extractos, a partir de cada una de las accesiones (muestra única, relacionado a una colecta específica) se colocaron 10 g de semillas u hojas de *Bixa orellana* (accesión 9 y 11) en papel de filtro con un tamaño de poro de 25 µm (Whatman, Alemania), se prepararon cartuchos de extracción y se colocaron en la cámara del equipo Soxhlet. Con el fin de eliminar el material oleoso y graso de las muestras, se realizó la extracción con metanol durante 3 h para cada extracción. Cada uno de los extractos de metanol se recogieron y se llevaron a sequedad usando un rotavapor (Buchi switzerland, modelo R-215) a presión reducida, 130 rpm y a temperatura constante la cual fue aproximadamente de 40 °C. Todos los extractos se almacenaron en frascos ámbar a -70 °C hasta su evaluación. En la Tabla 1 se muestran la geolocalización de la recolección de las muestras.

Tabla 1. Geolocalización de las accesiones pertenecientes a un banco de germoplasma de la península de Yucatán.

Accesión	Geolocalización
9	Yucatán región Norte. Latitud 21° 04.615 N. Yucatán región Oeste. Longitud 89°30.121´O
11	Yucatán región Norte. Latitud 21° 04.6151´ N. Yucatán región Oeste. Longitud 89°30.116´O

Tamiz Fitoquímico

Se realizó el perfil fitoquímico de cada uno de los extractos metanólicos de hojas y semillas de *Bixa orellana* L.; en el cual se determinó la presencia de distintos metabolitos secundarios utilizando reacciones químicas de identificación basadas en cambios de color o formación de

precipitados. Los resultados de las reacciones fueron reportados como (+) o (-) para el metabolito en cuestión.

Determinación Cualitativa de Terpenos

La determinación cualitativa de terpenos se llevó a cabo utilizando la reacción de Lieberman – Buchard, para la cual se tomó una porción del extracto y se le adicionó un mL de cloroformo, a continuación, se adicionó un mL de anhídrido acético y se mezclan; posteriormente, por la pared del tubo se deja resbalar de dos a tres gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. La reacción se considera positivo si la coloración va de rosado a azul (Miranda, 2002).

Determinación Cualitativa de Flavonoides

La presencia de flavonoides se llevó a cabo mediante la reacción de Shinoda. Brevemente, al extracto se agregaron dos mL de etanol, después se agregaron 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, y por último se le agregó una traza de magnesio; una coloración roja indica la presencia de flavonoides (Miranda, 2002).

Determinación Cualitativa de Saponinas

Para determinar la presencia de saponinas se desarrolló la reacción de Rosenthaler, para lo cual, a una porción del extracto metanólico, se le adicionó dos gotas del reactivo de Rosenthaler y dos gotas de ácido sulfúrico concentrado. La formación de una coloración violeta, se considera positiva para las saponinas triterpénicas (Miranda, 2002).

Determinación Cualitativa de Taninos

Esta determinación se realizó con la reacción de cloruro férrico, a una porción del extracto se le agrega 1 mL de agua destilada, después se le añadieron tres gotas de cloruro de sodio al 2%, se calentó a ebullición por un minuto, se dejó enfriar y se filtró; al filtrado se le añadió una gota de cloruro férrico al 1%, la aparición de una coloración verde se interpreta como una reacción positiva e indica la presencia de derivados de catecol, y una coloración oscura, indica la presencia de ácido gálico (Miranda, 2002).

Determinación Cualitativa de Quinonas

Para la determinación cualitativa de quinonas se agregó una gota de ácido sulfúrico concentrado a una porción del extracto. La formación de una coloración roja indica la presencia de antraquinonas (Miranda, 2002).

Determinación Cualitativa de Cumarinas

La presencia de cumarinas se llevó a cabo utilizando hidróxido de potasio al 0.5 M, para lo cual, se disolvió una porción del extracto en agua hirviendo, se llenó un tubo capilar, posteriormente, se colocó una gota en un papel filtro y una gota de hidróxido de potasio al 0.5 M sobre la gota anterior, y se observa en una lámpara UV a 365 nm, la presencia de fluorescencia indica un resultado positivo para este metabolito.

Determinación Cualitativa de Alcaloides

Se tomó una porción del extracto y se adicionaron entre 5 mL a 10 mL de ácido clorhídrico al 10%, se calentó a ebullición por cinco minutos, se enfrió y se filtró utilizando un embudo con papel filtro Whatman 4, posteriormente, el filtrado se dividió en 2 tubos de ensaye para realizar las siguientes reacciones:

- 1) Reacción de Wagner. Se agregaron dos gotas del reactivo de Wagner (anexo 1). Se considera positivo la formación de un precipitado color marrón (Miranda, 2002).
- 2) Reacción de Mayer. Se agregaron de dos a tres gotas del reactivo de Mayer (anexo 1), la reacción se considera positiva si sucede la formación de precipitado blanco (Miranda, 2002).

Determinación Cualitativa de Glucósidos Cardiotónicos

Se utilizó la reacción Keller-Kilians para la determinación cualitativa de glucósidos cardiotónicos, para realizar esta reacción se tomó una porción del extracto y se colocó en un tubo de ensaye, se disolvió en 1 mL de ácido acético glacial y se le añadieron 2 gotas de cloruro de hierro, posteriormente, se adicionaron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado por la pared del tubo, sin agitar. La presencia de un anillo color rojo en el menisco del líquido se considera una reacción positiva indicativa de la presencia de estos metabolitos (Miranda, 2002).

Determinación de la Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por Usia y colaboradores, con ligeras modificaciones (Usia *et al.*, 2002). Los extractos metanólicos de *Bixa orellana* L., correspondientes a la hoja de la accesión 9 (H9), hoja de la accesión 11 (H11), semilla de la accesión 9 (S9) y semilla de la accesión 11 (S11) se disolvieron en etanol absoluto (5 mg/mL). Se evaluaron concentraciones en el rango de 400 a 0 µg/mL, los extractos (100 µL) se homogenizaron con 100 µL de solución de DPPH• (300 µM) La mezcla de reacción se incubo por

30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida a 515 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas (Thermo Scientific Multiskan Go). Como control de referencia se utilizó vitamina C (70 µM, 12.6 µg/mL). Los resultados fueron expresados como EC₅₀ y en porcentaje de actividad antioxidante en base a la proporción de degradación de DPPH• comparada con el control estándar (mezcla 1:1, etanol: DPPH•) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times 100 = \% \text{ inhibición}$$

$$100\% - \% \text{ inhibición} = \% \text{ de actividad antioxidante}$$

El EC₅₀ se determinó a partir de la gráfica del porcentaje de inhibición y corresponde a la concentración en la que se neutraliza el 50% de los radicales libres.

Cuantificación del Contenido de Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales presente se determinó utilizando el método descrito por Gillespie y col. con ligeras modificaciones (Singleton y Rossi, 1965; Ainsworth y Gillespie 2007). Se depositaron 10 µL (2.5 mg/mL) del extracto en una microplaca de 96 pozos. Posteriormente, fueron añadidos 40 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu 0.25N, 60 µL de Carbonato de Sodio (Na₂CO₃ al 7%), y 90 µL de agua para obtenerse un volumen final de 200 µL por pozo. La placa fue incubada en oscuridad y a temperatura ambiente (25°C) durante 1 hora. La absorbancia fue medida a 750 nm en un lector de microplacas (Thermo scientific Multiskan Go). Los resultados fueron calculados utilizando una curva estándar de ácido gálico y fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco (mg EAG/g).

Cuantificación de Flavonoides Totales

El contenido de flavonoides totales fue reportado en términos de flavonas y flavonoles, el cual fue estimado por el método colorimétrico basado en la formación de un complejo entre el ión aluminio y los grupos carbonilo e hidroxilo de los flavonoides descrito por Popova y colaboradores. A diez microlitros de una solución del extracto metanólico (5 mg/mL) se le adicionaron 130 µL de metanol, posteriormente se adicionaron 10 µL de AlCl₃ 5 % (p/v, peso/volumen). La mezcla de

reacción se dejó en oscuridad por 30 minutos y se leyó la absorbancia a 412 nm en un lector de microplacas (Thermo scientific Multiskan Go.) Los resultados fueron expresados como mg equivalentes del flavonol quercitina/g de extracto seco (mg EQ/g).

Evaluación de la Actividad Antibacteriana

Para la determinación de la actividad antibacteriana se utilizaron las cepas bacterianas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC14028, las cuales fueron proporcionadas por el cepario del laboratorio de microbiología de la Universidad de Sonora, Campus Caborca. Se prepararon colonias frescas de las bacterias (14 a 16 horas) en agar Müeller Hilton y posteriormente, se mezclaron las colonias con solución salina estéril, hasta lograr una densidad óptica de 0.95 ± 0.05 , igual a la lectura de MacFarland a 630nm (Navarro, 2007).

Se toman por triplicado 200µL de cada una de las concentraciones de extracto metanólico de *Bixa orellana* y se colocaron en microplacas de ELISA de 96 pozos de fondo plano. A un primer conjunto de pozos se le adicionan inóculo bacteriano y otro conjunto se preparó sin bacterias y fueron utilizados como control de extracto. Adicionalmente, a tres pozos se les colocó 200 µL de caldo de cultivo que contenía al antibiótico gentamicina (12 µg/mL), tres pozos con 200 µL de caldo de cultivo con la máxima concentración de disolvente dimetilsulfóxido (DMSO, control de disolvente) al que las bacterias estuvieron expuestas en el ensayo, y tres más con caldo cultivo como control de esterilidad.

Los pozos de prueba y los controles se inocularon con 15 µL de la suspensión bacteriana previamente estandarizada (densidad óptica de 0.95 ± 0.05). Después de la inoculación, la placa se incubó a 36 °C y se leyó la densidad óptica a 630 nm de las microplacas a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas, con las lecturas obtenidas se realizaron curvas de desarrollo bacteriano, graficando tiempo contra densidad óptica (Navarro, 2007).

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa en Líneas Celulares Cancerígenas

Para la evaluación de la inhibición de la proliferación se utilizaron las líneas celulares cancerígenas RAW 264.7 (macrófago de murino transformado por el virus de la leucemia de Abelson), las cuales fueron gentilmente donadas por la Dra. Jael Quintero Vargas de la Universidad de Sonora, Campus Cajeme (Departamento de Ciencias de la Salud) y la línea

celular HeLa (carcinoma de cérvix humano), proporcionadas generosamente por el Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras de la Universidad de Sonora, Campus Centro (Departamento de Ciencias Químico Biológicas). Los cultivos se mantuvieron en el medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado al 5 % con suero fetal bovino a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂ y una humedad relativa de 80-90 % en una incubadora Isotherm (Fisher Scientific, USA).

Para evaluar el efecto antiproliferativo de los extractos de *Bixa orellana* sobre las líneas celulares, se utilizó el método estándar de las sales de tetrazolio (MTT) (Mosmann, 1983) con ligeras modificaciones (Hernandez y col., 2007). Los ensayos se realizaron utilizando cultivos celulares en fase de crecimiento logarítmico. Se obtuvieron suspensiones celulares de 200,000 células/mL, las cuales fueron incubadas en placas de 96 pozos de fondo plano (10,000 células por pozo, 50 µL) en presencia de diferentes concentraciones de los extractos a evaluar (los extractos se evaluaron en un rango de concentraciones de 200 a 0 µg/mL). Los cultivos se incubaron a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂ y una humedad relativa de 80- 90 %. En las últimas 4 horas de incubación se adicionaron 10 µL de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, 5 mg/mL) para determinar la proliferación celular.

El ensayo de MTT es un método colorimétrico que mide la proliferación y viabilidad de un cultivo celular. Se basa en la habilidad de las enzimas mitocondriales deshidrogenasas (reductasas), presente solo en células viables, de unirse a los anillos de la sal de tetrazolio (MTT) de coloración amarilla para reducirlo a cristales de formazán de color azul-púrpura; dichos cristales son impermeables a la membrana celular, dando como resultado una acumulación de éstos dentro de las células sanas. La reducción de esta sal sólo se realiza en células vivas y la cantidad de formazán es proporcional al número de células vivas. Los cristales de formazán resultantes se solubilizaron con isopropanol ácido y la absorbancia de la solución colorida se obtuvo a 570 nm – 655 nm en un lector de ELISA.

Análisis de Datos

Los resultados fueron capturados y guardados en Microsoft Excel. Se utilizó el programa GraphPad Prisma (versión 5.01) para graficar los datos obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tamiz Fitoquímico

Con el objetivo de determinar cuáles son los metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de las hojas y semillas del *Bixa orellana* L. Se llevaron a cabo diferentes reacciones específicas para cada metabolito. Los resultados de los fitoquímicos presentes en los extractos evaluados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Determinación de metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de hojas y semillas de *Bixa orellana* L.

Metabolitos secundario	Hoja 9	Hoja 11	Semilla 9	Semilla 11
<u>Terpenos</u>				
Rx Lieberman- Buchard	(+)	(+)	(-)	(-)
<u>Flavonoides</u>				
Rx de Shinoda	(-)	(-)	(-)	(-)
<u>Saponinas</u>				
Rx de Rosenthaler	(+)	(+)	(-)	(-)
<u>Taninos</u>				
Rx de cloruro férrico	(+)	(+)	(-)	(-)
<u>Quinonas</u>				
Rx de H ₂ SO ₄	(-)	(-)	(-)	(-)
<u>Cumarinas</u>				
Rx de KOH	(+)	(+)	(-)	(-)
<u>Alcaloides</u>				
Rx de Wagner	(-)	(-)	(-)	(-)
Rx de Mayer	(-)	(-)	(-)	(-)
<u>Glucósidos cardiacos</u>				
Rx de Keller- Killiani	(-)	(-)	(-)	(-)

(-) Ausente, (+) Presente

Los resultados del análisis fitoquímico evidenció la presencia de compuestos fenólicos como los taninos y cumarinas, así como como terpenos y saponinas en los extractos metanólicos de las hojas, mientras que en los extractos correspondientes a las semillas se obtuvieron resultados negativos para los grupos de metabolitos evaluados. En un estudio del perfil fitoquímico del extracto hidroalcohólico de hojas de *Bixa orellana* L. De origen peruano se encontró la presencia de compuestos tales como flavonoides y taninos, terpenos y alcaloides (Huamán y col 2009), lo cual indica similitud en la composición y las diferencias podrían ser debidas a los distintos microambientes entre las regiones. Por otra parte, Shahid-ul-Islam y col. en el 2015 reportaron la presencia de carotenoides, apocarotenoides, esteroles, monoterpenos, sesquiterpenos y triterpenoides en las semillas de achiote; lo cual difiere de los resultados obtenidos, ya que el perfil de compuestos fitoquímicos indica ausencia de todos los metabolitos evaluados.

Determinación de la Actividad Antioxidante

Los antioxidantes naturales se encuentran presentes en numerosas fuentes del reino vegetal, siendo las plantas una fuente importante de estos. Con la finalidad de evaluar la capacidad de los extractos metanólicos de *Bixa orellana* L. De neutralizar radicales libres, se determinó la capacidad antioxidante de cada uno de los extractos utilizando el método colorimétrico de estabilización del radical DPPH•. Las concentraciones evaluadas estuvieron entre (400 y 3.125 µg/mL) y se utilizó vitamina C (70 µM, 12.6 µg/mL) como control positivo. La actividad antioxidante de los extractos metanólicos de la hoja 9, hoja 11, semilla 9 y semilla 11 se muestra en la Figura 1, Figura 2, Figura 3 y Figura 4, respectivamente. Se puede observar que a la máxima concentración evaluada (400 µg/mL), El porcentaje de antioxidante fue de 94.01 ± 0.40 , 96.14 ± 0.14 y 90.60 ± 1.61 % , para los extractos metanólicos de hoja 9 (H9), hoja 11 (H11) y de semilla 9 (S99, respectivamente.; mientras que para el extracto metanólico correspondiente a la semilla 11 (S11) mostró menor % de actividad antioxidante a esa misma concentración (87.94 ± 0.68). El control positivo, la vitamina C, presentó un valor de 97.39 ± 1.6 %. Los resultados muestran que la actividad antiradical DPPH• de los extractos se presentó en el siguiente orden H11 > H9 > S9 > S11; siendo el extracto metanólico de la hoja de la accesión 11 el que presentó la mayor actividad antiradical DPPH• (> 95% de inhibición).

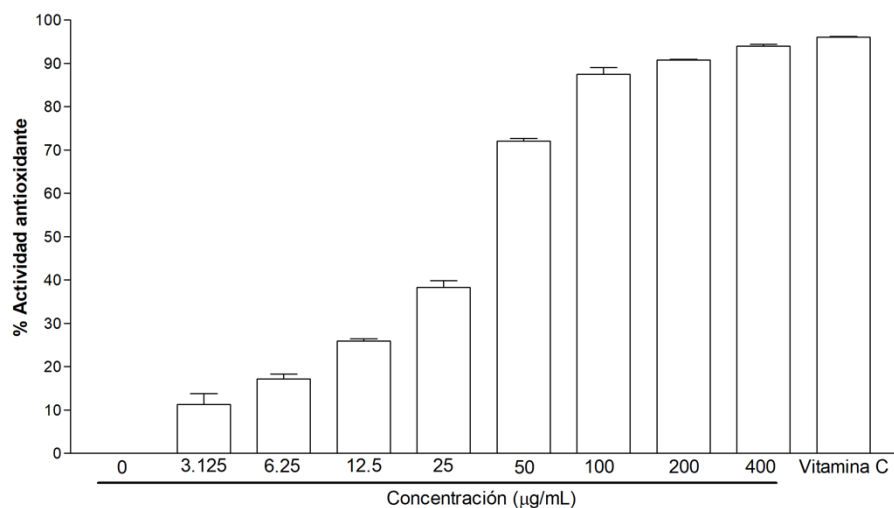


Figura 3. Actividad antioxidante del extracto metanólico de la hoja de la accesión 9 de *Bixa orellana* L. Diferentes concentraciones de H9 fueron utilizadas (0-400 µg/mL). Vitamina C (70 µM, 12.6 µg/mL) fue utilizada como antioxidante estándar. Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar.

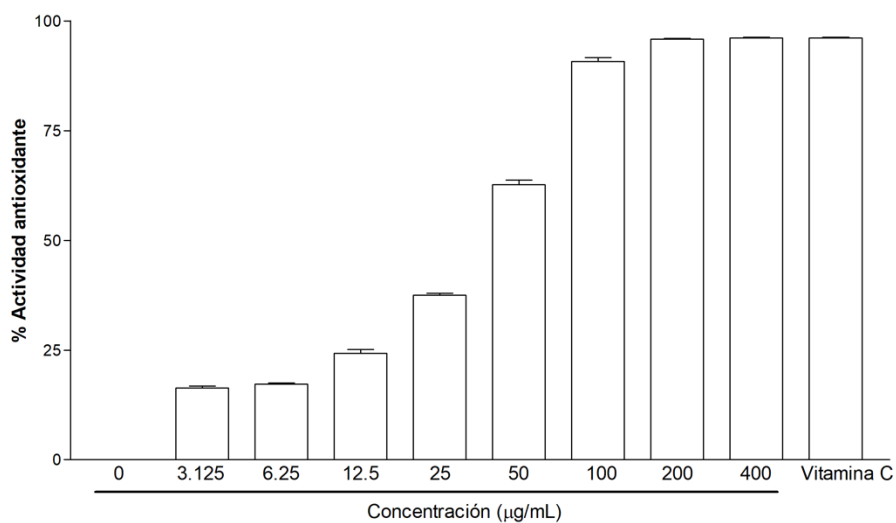


Figura 4. Actividad antioxidante del extracto metanólico de la hoja de la accesión 11 de *Bixa orellana* L. Diferentes concentraciones de H11 fueron utilizadas (0-400 µg/mL). Vitamina C (70 µM, 12.6 µg/mL) fue utilizada como antioxidante estándar. Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar.

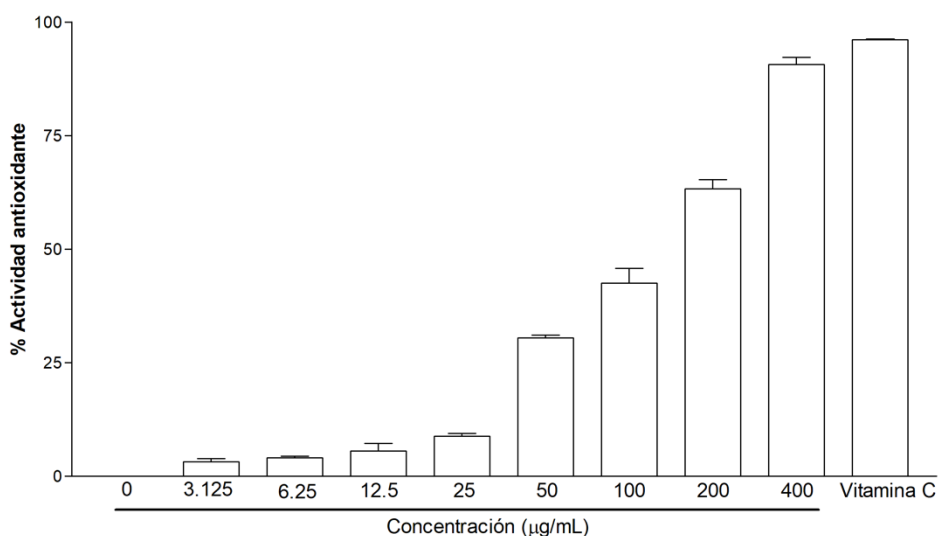


Figura 5. Actividad antioxidante del extracto metanólico de la semilla de la accesión 9 de *Bixa orellana* L. Diferentes concentraciones de S9 fueron utilizadas (0-400 µg/mL). Vitamina C (70 µM, 12.6 µg/mL) fue utilizada como antioxidante estándar. Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar.

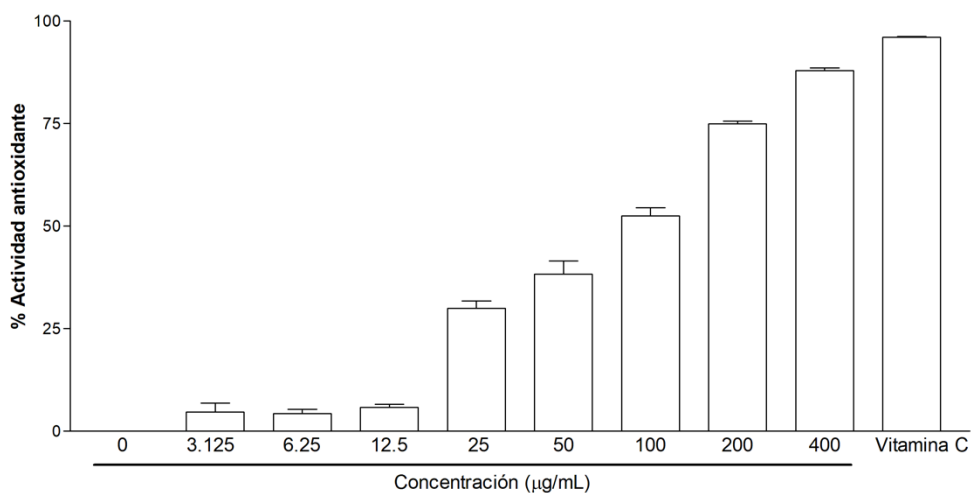


Figura 6. Actividad antioxidante del extracto metanólico de la semilla de la accesión 11 de *Bixa orellana* L. Diferentes concentraciones de S11 fueron utilizadas (0-400 µg/mL). Vitamina C (70 µM, 12.6 µg/mL) fue utilizada como antioxidante estándar. Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar.

En un estudio realizado por Guimet Rojas en el 2012, reportó la actividad antioxidante de diferentes morfotipos de achiote de origen peruano, encontrando que el mayor porcentaje de inhibición frente al radical DPPH fue de con $86.171 \pm 0.611\%$, y el de menor porcentaje de inhibición fue de 79.899 ± 1.261 . (Guimet y col., 2012), lo cual es congruente con los resultados obtenidos.

La concentración inhibitoria media del radical en los extractos metanólicos (EC_{50}) se muestran en la Tabla 3. Las concentraciones evaluadas para los extractos metanólicos y para la vitamina C fueron de 3.125 – 400 y de 0 – 12.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Los resultados muestran que los valores de EC_{50} menores se obtuvieron para los extractos metanólicos de las hojas (H9 y H11), lo cual indica su mayor potencial antioxidante en comparación con los extractos S9 y S11. Shilpi J. Y col., en el 2006 reportaron que el extracto metanólico de las hojas de *Bixa orellana* L (un ecotipo de Bangladesh) mostró un EC_{50} 22.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$, valores menores a los encontrados en este estudio (Shilpi y col., 2006.)

Tabla 3. Concentración inhibitoria media del radical DPPH• (EC_{50}) de los extractos metanólicos de *Bixa orellana*.

Extracto metanólico	EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Hoja de la accesión 9	45.07 ± 3.70
Hoja de la accesión 11	44.23 ± 1.42
Semilla de la accesión 9	185.44 ± 4.41
Semilla de la accesión 11	100.59 ± 3.18
Vitamina C	5.38 ± 0.37

Todos los valores representan la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

Cuantificación del Contenido De Fenoles Totales y Flavonoides Totales

Los compuestos de naturaleza fenólica juegan papel importante en los procesos de oxidación lipídica y se les asocia con la actividad antioxidante (Sokmen y col., 2005), específicamente, los ácidos fenólicos y flavonoides son reconocidos típicamente como poseedores de actividad antioxidante. La actividad antioxidante elevada encontrada en las hojas de achiote (H9, H11) puede deberse a la presencia de diversos fitoquímicos, principalmente de tipo fenólico. En la tabla

4 se muestran los valores del contenido de fenoles totales (CFT) y contenido de flavonoides totales (CFLT) de los extractos de *Bixa orellana* L. evaluados, se observa una correlación entre el total de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante, es decir, a mayor contenido de fenoles totales menor valor de (EC_{50}). Estos resultados muestran que en el caso de (CFT) se presentó en el siguiente orden: H9 > H11 > S11 > S9, siendo H9 quien presentó mayor CFT con un valor > 200 mg EAG/g de muestra seca. Para el caso específico de CFLT presentó el siguiente orden: H11 > S11 > H9 > S9. Zarza-García y colaboradores en el 2017 reportaron valores semejantes para el CFT de los extractos metanólicos de las hojas de achiote, 158.77 ± 3.75 y 163.00 ± 8.41 mg EAG/g para diferentes accesiones de la Península de Yucatán.

Tabla 4. Contenido de fenoles totales y flavonoides en los extractos de *Bixa orellana* (mg/g)

	Hoja 9	Hoja 11	Semilla 9	Semilla 11
Fenoles totales [^]	213.42 ± 3.32	149.22 ± 5.42	56.06 ± 4.45	70.56 ± 1.19
Flavonoides totales*	50.01 ± 3.43	127.95 ± 5.04	49.17 ± 6.74	71.91 ± 2.15

[^]Expresado como mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco (mg EAG/g).

*Expresado como mg equivalentes de quercitina/g de extracto seco (mg EQ/g).

Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

Evaluación de la Actividad Antibacteriana

Las plantas poseen una capacidad de inhibir la proliferación de algunos microorganismos, principalmente, como mecanismo de defensa contra infecciones, o bien, son sustancias constituyentes del metabolismo celular. Los fitoquímicos se han utilizado para el tratamiento de muchas afecciones, y sus aplicaciones se extienden desde las preparaciones de extractos más simples utilizados en la medicina tradicional hasta los procesos farmacológicos más complejos para identificar y obtener sustancias bioactivas que se usan actualmente como fármacos. Para determinar la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de las accesiones 9 y 11 de achiote fue evaluado el efecto antiproliferativo de estos sobre las bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC14028) y Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Se utilizó fue el método de microdilución en caldo, las concentraciones utilizadas para la evaluación antibacteriana de los extractos fueron de 1600, 400,

100 y 25 µg/mL y se utilizó como control de inhibición del crecimiento microbiano a la gentamicina (12 µg/mL). El efecto de la actividad antiproliferativa de los diferentes extractos de *Bixa orellana* (H9, H11, S9 y S11) sobre *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* se muestran las Figura 5, 6 y 7, respectivamente. Los resultados muestran una disminución en la densidad óptica, principalmente en el caso de las bacterias Gram-negativas (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*), lo cual indica que el mayor efecto de los extractos evaluados se presenta de manera selectiva sobre este tipo de bacterias, lo cual podría estar relacionado con la composición química de la pared bacteriana de las bacterias Gram-negativas y la posible interacción con los metabolitos secundarios encontrados en los extractos como terpenos, taninos, cumarinas y saponinas.

En la Tabla 5 se muestran los valores de MIC₅₀ de extractos metanólicos de *Bixa orellana* a 36.5 °C y 24 horas de exposición a los extractos. De acuerdo a los resultados obtenidos, ambos extractos (hojas y semillas) de las dos accesiones 9 y 11 poseen mayor efecto sobre *E. coli* y menor actividad en todos los casos sobre *S. aureus*.

Modupeola Abayomi en el 2014, demostró que el extracto etanólico de las semillas de achiote presentan actividad antibacteriana contra *S. aureus*, con valores de MIC₅₀ en el rango de 75 - 750 µg/mL, efecto contrario a lo encontrado en nuestro estudio. Sin embargo, Shilpi J. Y col. (Shilpi J. Y col., 2006) reportaron mayor efectividad de los extractos metanólicos de achiote (recolectado en Bangladesh) sobre *E. coli* que en *S. aureus* utilizando el método de medición del halo de inhibición.

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (MIC₅₀), en µg/mL, de extractos metanólicos de *Bixa orellana* L. En bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, 36.5 °C y 24 horas de tratamiento.

Extracto metanólico	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Hoja 9 (H9)	>1600	>1600	>1600
Hoja 11 (H11)	1251.79 ± 1.99	>1600	ND
Semilla 9 (S9)	474.88 ± 29.89	1159.32 ± 50.70	>1600
Semilla 11 (S11)	393.81 ± 10.41	500.66 ± 24.18	>1600

Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan la media de tres experimentos independientes ± desviación estándar.

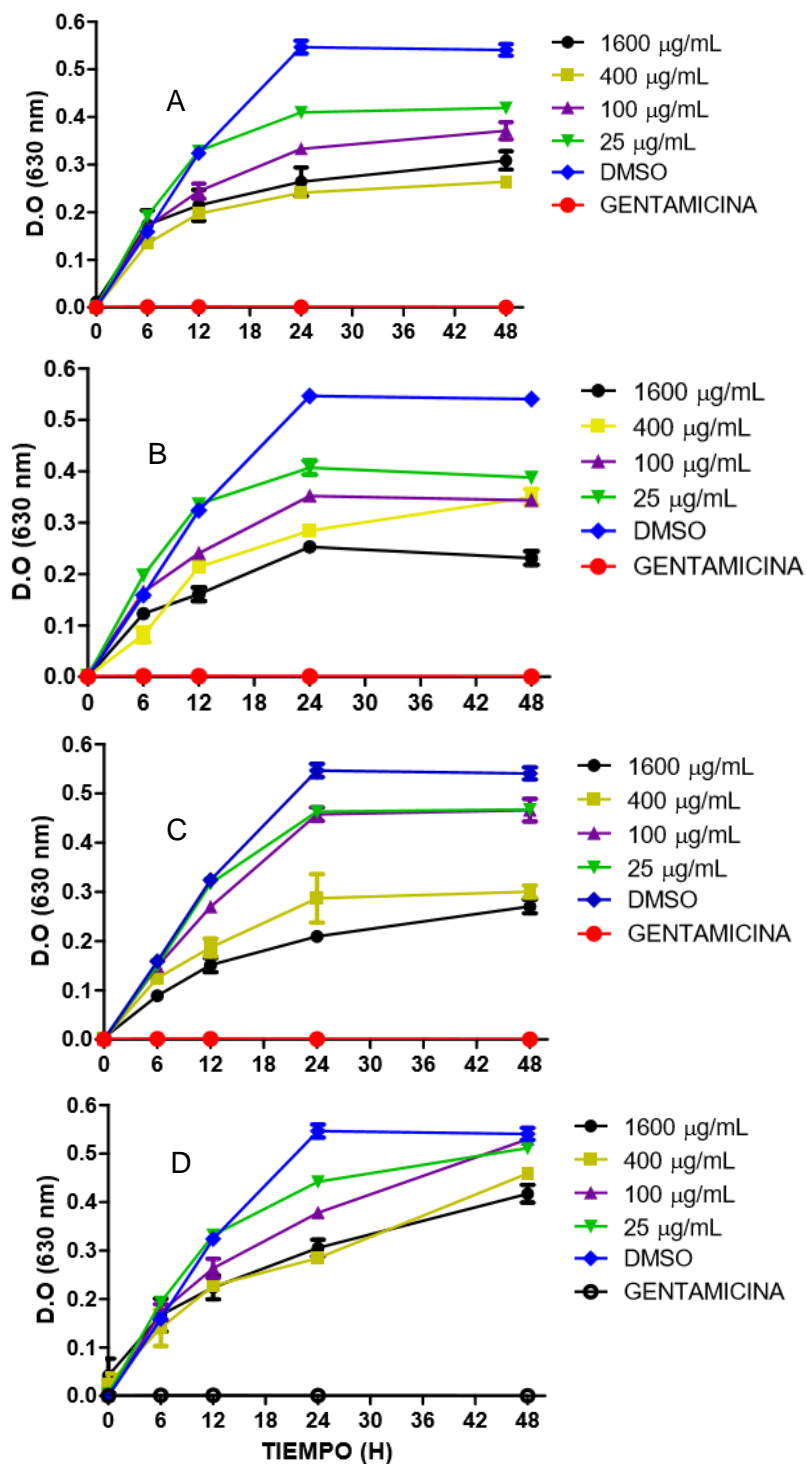


Figura 7. Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de H9 (A), H11 (B), S9 (C) y S11 (D) contra *E. coli*. Gentamicina a 12 µg/mL se utilizó como control positivo de la inhibición del crecimiento bacteriano y DMSO fue utilizado como control de disolvente. Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan el promedio de tres determinaciones \pm desviación estándar.

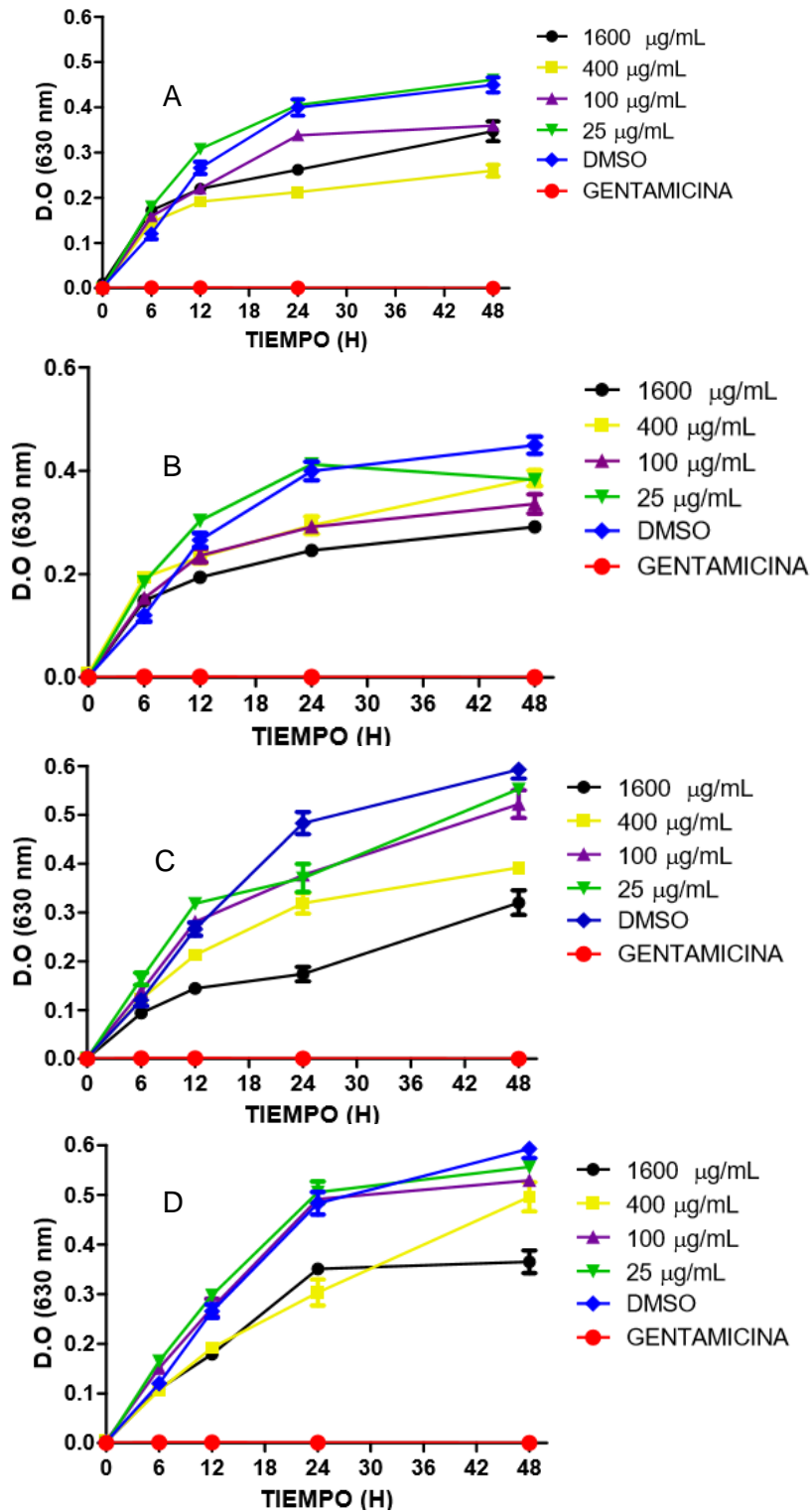


Figura 8. Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de H9 (A), H11 (B), S9 (C) y S11 (D) contra *Salmonella typhimurium*. Gentamicina a 12 µg/mL se utilizó como control positivo de la inhibición del crecimiento bacteriano y DMSO fue utilizado como control de disolvente. Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan el promedio de tres determinaciones \pm desviación estándar.

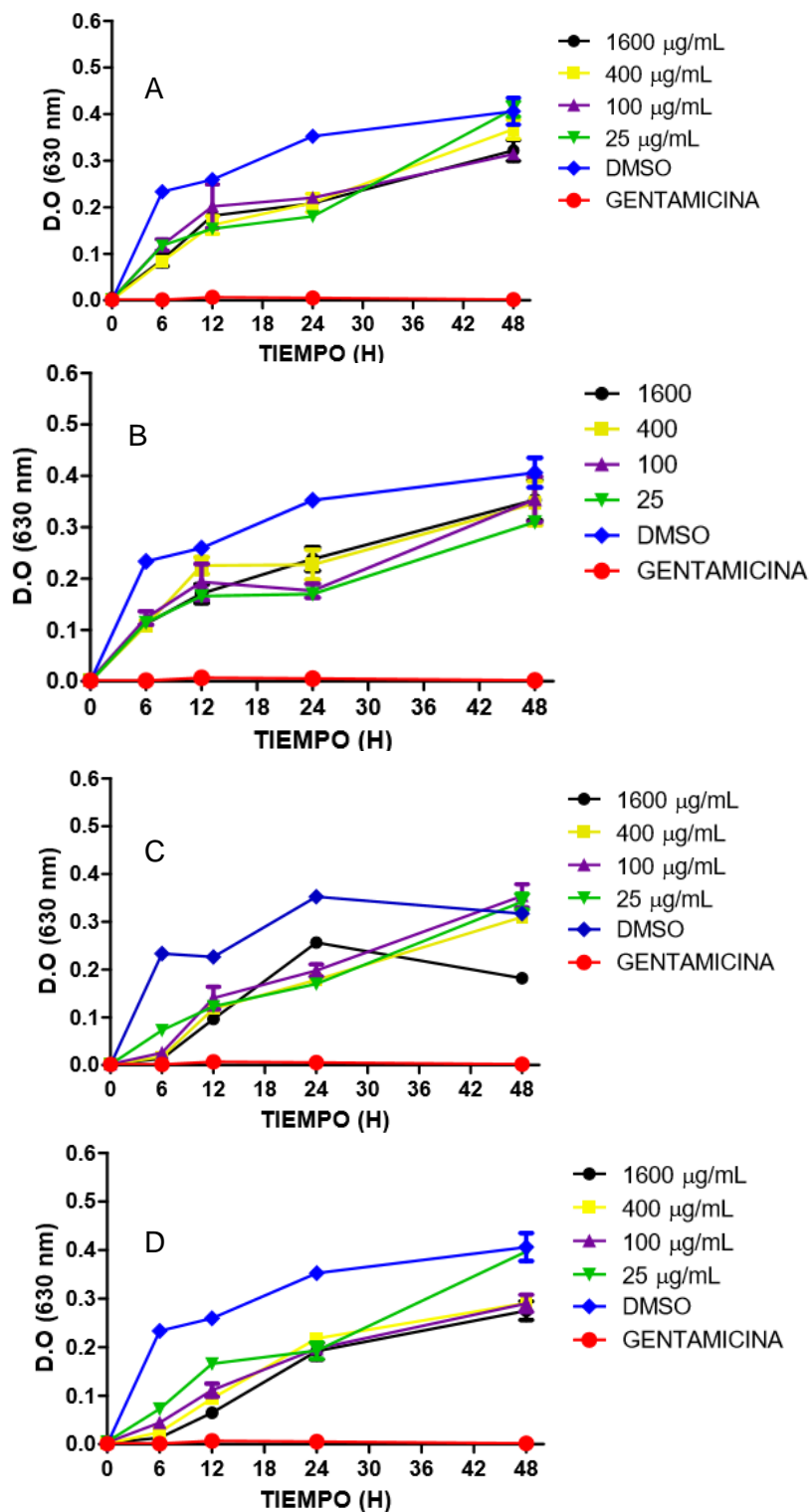


Figura 9. Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de H9 (A), H11 (B), S9 (C) y S11 (D) contra *Staphylococcus aureus*. Gentamicina a 12 µg/mL se utilizó como control positivo de la inhibición del crecimiento bacteriano y DMSO fue utilizado como control de disolvente. Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan el promedio de tres determinaciones \pm desviación estándar.

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa en Líneas Celulares Cancerígenas

Para evaluar la actividad antiproliferativa de los extractos metanólicos de las hojas y semillas de achiote de las accesiones en estudio (H9, H11, S9 y S11) se realizaron ensayos *in vitro* utilizando las líneas celulares cancerígenas: HeLa y RAW 267.4. Las concentraciones evaluadas fueron 200, 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL. En la tabla 6 se muestran los valores de IC₅₀ para cada uno de los extractos evaluados en las líneas celulares mencionadas. Los extractos correspondientes a la accesión 11 (H11 y S11) mostraron mayor actividad antiproliferativa sobre la línea celular HeLa que el efecto evaluado ejercido por la accesión 9 (H9 y S9); mientras que en el efecto sobre la proliferación celular de las células RAW las semillas de ambas accesiones presentaron mayor actividad que los extractos correspondientes a las hojas (H9 y H11); siendo el extracto H9 el que presentó menor efectividad en las líneas celulares evaluadas, con valores de IC₅₀ >200 µg/mL en ambos casos.

De manera general, el orden de actividad antiproliferativa de los extractos de *Bixa orellana* en la línea celular HeLa fue S11 > H11 > S9 > H9, valores de IC₅₀ de 37.29 ± 1.15, 64.95 ± 2.65, > 200, > 200 µg/mL, respectivamente. Mientras que el orden de actividad en células RAW fue S9 > S11 > H11 > H9 con valores de IC₅₀ de 66.04 ± 0.73 µg/mL para el extracto S9, 80.79 ± 1.12 y 130.83 ± 3.19 µg/mL para S11 y H11, respectivamente; mientras que para H9 fue > 200 µg/mL.

En las figuras 8 y 9 se muestra el efecto de los extractos metanólicos de las accesiones 9 y 11 (hoja y semilla) sobre el porcentaje de viabilidad en las líneas celulares HeLa y RAW 267.4, respectivamente.

Tabla 6. Actividad antiproliferativa (IC₅₀)^a de los extractos metanólicos de *Bixa orellana* L.

Extracto metanólico	Líneas celulares	
	HeLa	Raw 264.7
H9	> 200	> 200
H11	64.95 ± 2.65	130.83 ± 3.19
S9	> 200	66.04 ± 0.73
S11	37.29 ± 1.15	80.79 ± 1.12

^a IC₅₀ Los valores de extractos de los extractos metanólicos de achiote (µg/mL) representan la media de por lo menos tres experimentos independientes ± la desviación estándar.

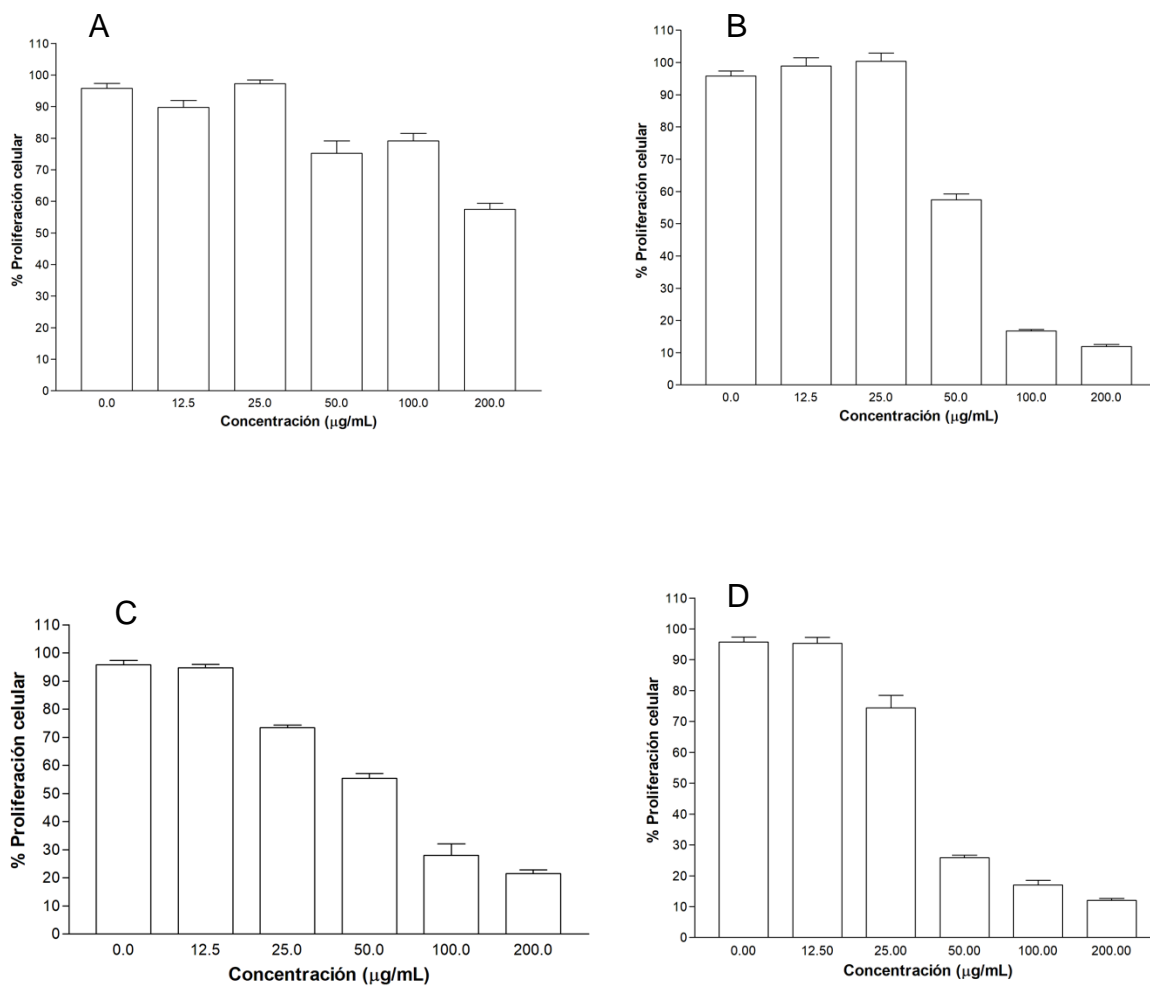


Figura 10. Actividad antiproliferativa de los extractos de *Bixa orellana* (A) H9, (B) S9, (C) H11, (D) S11 sobre la línea celular cancerígena HeLa. Los extractos fueron evaluados en rango de concentraciones de (0 -200 µg/mL). DMSO fue utilizado como control de solvente. Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan el promedio de tres determinaciones \pm desviación estándar.

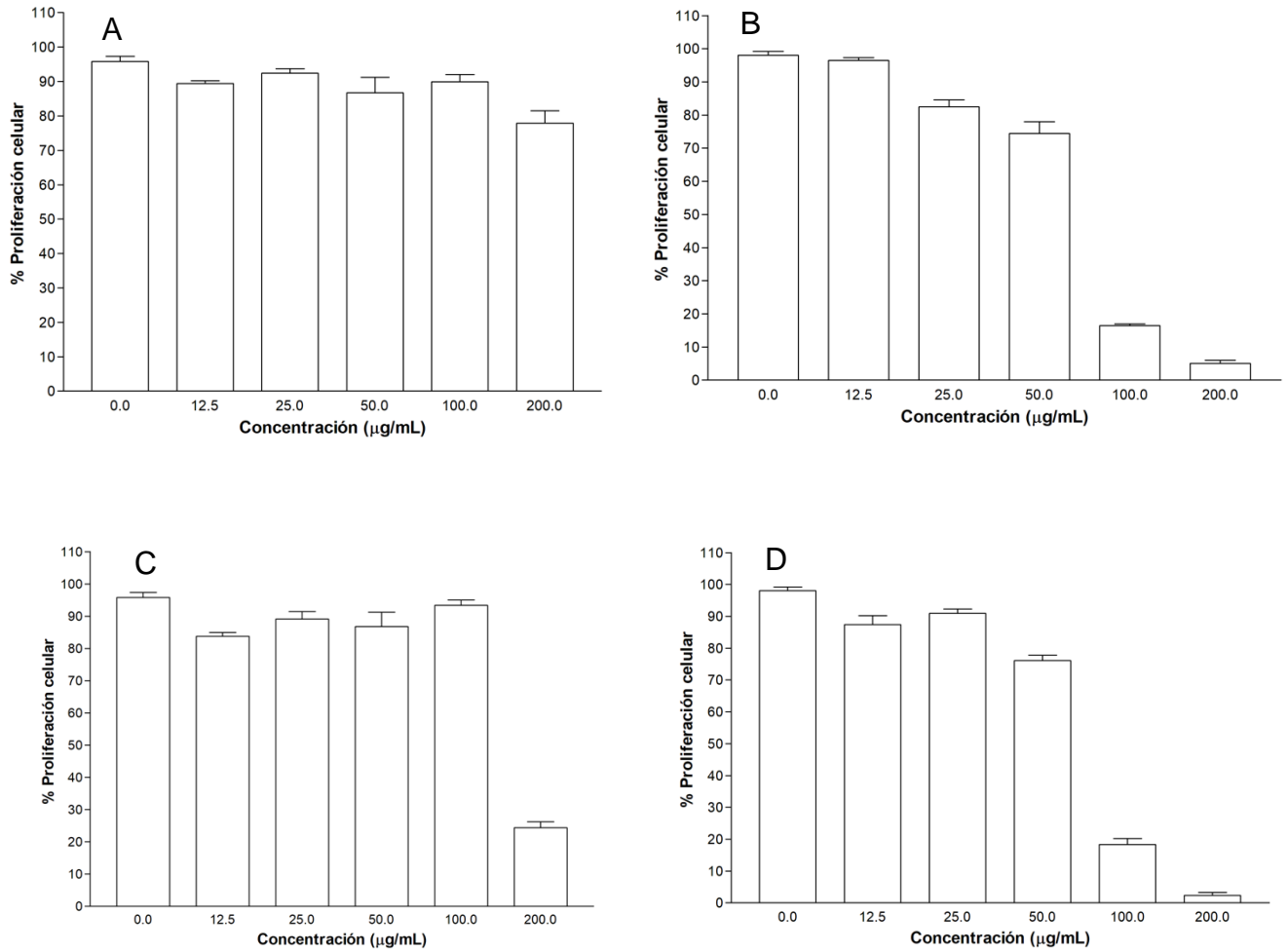


Figura 11. Actividad antiproliferativa de los extractos de *Bixa orellana* (A) H9, (B) S9, (C) H11, (D) S11 sobre la línea celular RAW 267.4. Los extractos fueron evaluados en rango de concentraciones de (0 -200 µg/mL). DMSO fue utilizado como control de solvente. Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan el promedio de tres determinaciones \pm desviación estándar.

Conforme a los criterios del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica, se considera que un extracto tiene actividad alta si la IC_{50} es $\leq 30 \mu\text{g/mL}$, media si es de $31-60 \mu\text{g/mL}$ y baja si es de $61-99 \mu\text{g/mL}$ (Moo-Puc, 2009). En base a este criterio, los resultados sugieren que el extracto metanólico S11 posee potencial como posible fuente de compuestos bioactivos con actividad antiproliferativa, seguido de los extractos H11 y S9 con moderado y bajo potencial, respectivamente.

CONCLUSIONES

Se identificaron los metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de las accesiones de *Bixa orellana* L. en estudio. Se detectaron mediante reacciones químicas cualitativas saponinas, terpenos, quinonas y cumarinas en los extractos metanólicos de las hojas (H9 y H11), mientras que para el caso de los extractos correspondientes a las semillas de achiote (S9 y S11) no detectaron metabolitos con las pruebas realizadas.

Los extractos de las hojas de las dos accesiones estudiadas (9 y 11) mostraron un elevado contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante que validan su uso potencial como un poderoso antioxidante, encontrándose una correlación entre el total de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante, es decir, a mayor contenido de fenoles totales menor valor de (EC₅₀).

La actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de *Bixa orellana* L. Fue mayor en el caso de las bacterias Gram-negativas (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*), que en *S. aureus* (Gram-positiva) lo cual es indicativo de que está actividad se presenta de manera selectiva sobre este tipo de bacterias. De acuerdo a los resultados obtenidos, ambos extractos (hojas y semillas) de las dos accesiones 9 y 11 poseen mayor efecto sobre *E. coli* y menor actividad en todos los casos sobre *S. aureus*.

La accesión 11 de *Bixa orellana* L. Posee mayor efecto sobre la proliferación de líneas celulares cancerígenas. S11 posee potencial como posible fuente de compuestos bioactivos con actividad antiproliferativa, seguido de los extractos H11 y S9 con moderado y bajo potencial, respectivamente.

De manera general, los resultados de este estudio indican que las accesiones de *Bixa orellana* L. estudiadas poseen potencial funcional desde el aspecto antioxidante, antiproliferativo y farmacológico, lo cual lo posiciona como un recurso natural con un gran potencial para la búsqueda de nuevos agentes bioactivos.

RECOMENDACIONES

Con base a los resultados obtenidos se considera conveniente la caracterización química de los extractos metanólicos de la accesión 11, principalmente, la semilla correspondiente a esta ya que mostró una significativa actividad biológica.

Es conveniente aislar y purificar los metabolitos secundarios identificados cualitativamente, utilizando estrategias específicas para cada uno de ellos, con el objetivo de validar si algún grupo de ellos es responsable de las actividades biológicas evaluadas.

Debido al potencial biológico y farmacológico encontrado en las accesiones estudiadas es de suma importancia evaluar más actividades biológicas, como antiinflamatoria e hipoglucemiente; ya que en morfotipos provenientes de otras geolocalizaciones se han reportado resultados interesantes.

BIBLIOGRAFÍA

Abayomi M., Adebayo A.S., Bennett D., Porter R., Shelly-Campbell J. 2014 *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 4 (2),101-106.

Abbott S., 2007, *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas*, and other Enterobacteriaceae. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed. Murray PR et al (editors). ASM Press.

Ainsworth EA. y Gillespie KM. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*. 2: 875-877.

Andino A, Hanning I. 2015, *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *Scientific World J*, 52-179

Annan K y Peter JH, 2007, "Antibacterial, Antioxidant and Fibroblast Growth Stimulation of Aqueous Extracts of *Ficus asperifolia* Miq. and *Gossypium arboreum* L., Wound-healing Plants of Ghana", en *Journal of Ethnopharmacology*,119: 141-144.

Anand P, Kunnumakara B, y Sundaram C. 2008. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*. 25: 2097-2116.

Barthelson, Roger A., 2006, "Development of a Comprehensive Detection Method for Medicinal and Toxic Plant Species", en *American Journal of Botany*, 4: 566-574.

Barragán SA, 2016, La práctica de la autoatención por fitoterapia en un grupo de familias mexicanas, en *Archivos en Medicina Familiar*, (8): 155-162.

Benavides T, Martínez V, Mitjans M, Infante MR, Moran C, Clapés P, Clothier R, Vinardel MP. 2014. Assessment of the potential irritation and photoirritation of novel amino acid-based surfactants by *in vitro* methods as alternative to the animal tests. *Toxicology* 201: 87-93.

Biltencourt C, Felicissimo MP, Pireaux J, Houssiau L. 2005, Characterization of thermal modifications of bixin from *Bixa orellana* fruit. *J Agric Food Chem*. 53(16):6195-200.

Brand-Williams W, Cuvelier ME y Berset C. 1995, Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Ddpartement Science de l'Aliment, ENSIA 1, avenue des Olympiades, 91305 Massy (France).

Butler, M S. 2005, Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Natural Product Reports*. 22: 162-195.

Bye R y Linares E, 2003, Usos pasados y presentes de algunas plantas medicinales encontradas en los mercados mexicanos, en *América Indígena*, 47(2): 200-230.

Cáceres A., Menéndez H., Mendex E-, Cohobon E., Samayoa BE., Jaurequi E. 2005, *Journal Ethnopharmacology*; 48(2), 5-85.

Carmona JJ. y Beltrán YP. 2007, Las algas rojas de aguas continentales en la región central de México. Editor UNAM.

Cavia M, López A., Hernando B, López S, García C, Coma M, Muñiz P. 2007, Estado redox celular y cáncer. Influencia sobre el tratamiento con citostáticos. *Revista Electrónica de Biomedicina*. 2, 45-51.

Cossart P, Sansonetti PJ., 2004, Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, 304: 242-8.

Costerton JW, 2009: Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284:1318

Dandekar T, Fieselmann A, Fischer E, Popp J, Hensel M, Noster J. 2014, *Salmonella*-how a metabolic generalist adopts an intracellular lifestyle during infection. *Front Cell Infect Microbiol*, 4-191.

De Araújo-Vilar D., De Araújo-Vilar M., De Lima-e Moura T., Nervo R., De Oliveira M., De Oliveira F.C., Filgueiras de Athayde-Filho P., Formiga Melo Diniz F.M., Barbosa-Filho J.M. 2014, Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa orellana* L.: A Review. *The Scientific World Journal*, 1-11.

Denizot F, y Lang R. 1986, Rapid colorimetric assay for the cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Immunol Methods*. (2): 22-89

Divins Maria-Josep. 2014, *Revista de farmacia profesional*. Vol 28(5): 5-50.

Dudonne S, Vitrac X., Coutière P, Woillez M. y Mérillon JM. 2009, Comparative Study Of Antioxidant Properties of Total Phenolic Content Of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC Assays. *Journal of Agriculture of Food Chemistry*. 57: 1768–1774.

Edwards RA y Puente JL. 2018, Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends. Microbiology*. 6:282-287

Elejalde JI., 2001, Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de medicina interna*. (18): 326-335.

Eruslanov E, y Kusmartsev S., 2010, Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow cytometry. *Advanced protocols in oxidative stress*. (594): 57-69.

Fernández GM, Corona LA, Hernández J, Espinosa A, Pereira E, Figueiras B. 2013, Mortalidad por neoplasias malignas en la población adulta de la provincia de Cienfuegos durante el decenio 1988-1997. *Rev Cubana Med*. 42(2).

Figuroa IM, Verdugo A., 2015, *Revista latinoamericana de microbiología*, 47(2) 25 – 42

Galán JE., Ginocchio CC, y Costeas P. 2012, Molecular and functional characterization of the Salmonella invasion gene invA: homology of InvA to members of a new protein family. *J. Bacteriol*. 174:4338-4349

García de Alba JE, Ramírez Hernández BC, Robles AG, Zañudo HJ, Salcedo AL, y García de Alba JE., 2012, Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*, (39), 29-44

Giuliano G., 2003, To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. *TRENDS in Biotechnology*. 21(12):6-513.

Goossens A, Häkkinen S, Laakso I, SeppänenLaakso T, Biondi S, De Sutter V, Lammertyn F, Nuutila AM, Söderlund H, Zabeau M, Inze D, Oksman-Caldentey K., 2003, A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc Natl Acad Sci* 100:8595-8600

Gutiérrez SD, Pérez GP, Ruiz BE y Ríos HI., 2014, Formas clínicas de infecciones por Enterobacterias, Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz. España.

Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L., Parikh R. y Bullock, P. 2004, Comparison of Alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in vitro* 18: 703-710

Haq N., In vitro production of bioactive compounds from medicinal and aromatic plants.

Hernández CA, Roldan SA, 1994, Automedicación. *Farmacología general una guía de estudio*. 21: 100-115.

Hernández JF, Goycoolea M, Quintero J, Acosta A, Castañeda M, Domínguez Z, Robles R, Vázquez-Moreno L, Velázquez EF, Astiazaran H, Lugo E y Velázquez C .2007, Sonoran propolis: Chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Med.* 73: 1469-1474.

Instituto Nacional de Estadística y geografía (INEGI), 2012.

Instituto Nacional de Estadística y geografía (INEGI), 2010.

Jawetz, Melnick, y Adelberg. 2016, *Microbiología médica*. 26ed.

Júnior AC, Asad LM, Oliveira EB, Kovary K, Asad NR, Felzenszwalb I.2005, Antigenotoxic and Antimutagenic Potential of an Annatto Pigment (norbixin) against Oxidative Stress. *Genet Mol Res.*4(1):9-94.

Karadag A. Ozcelik B. y Saner S. 2009, Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*. 2: 41–60.

Kuskoski E. Asuero M, Asuero AG., Troncoso AM., Mancini-Filho J, y Roseane F. 2005, Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4), 726-732.

Lock, D. U. 1988, "Investigación Fitoquímica" Métodos En El Estudio De Productos Naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú.

López P, Sánchez C, Batlle R, y Nerín C., 2005, Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6939-6946.

López-Malo, Palou A, Parish E, y Davidson, P. 2005, Methods for activity assay and evaluation of results. En P.M. Davidson, J., Sofos, y A. Branen, *Antimicrobials in Food* 3 (21): 659-680

Lourido Pérez, Hetzel de la C., & Martínez Sánchez, Gregorio. 2010, La Bixa orellana L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. Revista Cubana de Farmacia, 44(2), 231-244.

Martínez M., 2016, Las plantas medicinales de México, Editorial Botas, México.

Martínez MA, Baldiris ÁR, Díaz CA., 2013, Infección por papiloma virus humano y carcinoma escamocelular bucal: diversas técnicas moleculares para detectar su presencia. 30(2):69-78.

Miranda MM. 2002, Métodos de análisis de drogas y extractos. Universidad de la Habana.

Moo-Puc R., Robledo D., Freile-Peigrín Y. 2009, Actividad citotóxica y antiproliferativa in vitro de macroalgas marinas de Yucatán, México. Ciencias Marinas. 35: 1-14.

Mosmann, T. 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays. J. Immunol Methods. 65: 55-63.

Monks, A, Scudiero, D, Skehan, P, Shoemaker, KP, Vistica, D, Hose, C, Langley, J, Cronise, P, Vaigro-Wolff, A, Gray-Goodrich, M, Campbell, H, Mayo, J, Boyd, M., 2011, Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen using a diverse panel of culture human tumor cell lines Journal of the National Cancer Institute 83: 757-766

Mussaret BZ, López MC, Calva E., 2006, Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: Epidemiología, vacunas y biología molecular. Revista latinoamericana de microbiología. 48 (2): 121-125.

Navarro Moisés. CIAD, AC, Tesis de Maestría en Ciencias, 2007, Pág. 1-59.

Newman DJ, Cragg GM. 2007, Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J Nat Prod.70:461-77.

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. y Pognan, F. 2013, Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. European Journal of Biochemistry 267: 5421-5426.

Ocegueda, S., E. Moreno y P. Koleff.2005, Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. Biodiversitas 62: 12-15.

Peter G. von Carlowitz, G.V. Wolf and E.M. Kemperman. 1991.

Pérez-Alonso N; Jiménez E., 2011, Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. Biotecnología Vegetal. 11,(4): 2074-8647.

- Pérez S, Cuen M., y Becerra, R. 2003, El achiote Biodiversitas. 46: 7-11.
- Popova, M., V. Bankova, D. Butovska, V. Petkov, B. Nikolova-Damyanova, A. G. Sabatini, G. L. Marcazzan and S. Bogdanov. 2004, Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem. Analysis*. 15: 235-240
- Prashant T, Bimlesh K., Mandeep K., Gurpreet K. y Harleen K. 2011, Phytochemical Screening and Extraction: a Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 1(1): 98-106.
- Rasmussen ES., 2018, Use of fluorescent redox indicators to evaluate cell proliferation and viability. *in vitro and Molecular Toxicology* 12: 47-58.
- Ringuelet, J., Viña S. 2013, Productos naturales vegetales. Universidad Nacional de la Plata. 34(8): 950-978
- Rodríguez AG. 2002, Principales características y diagnóstico de los grupos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de Méx.* 44: 464-475
- Rodríguez S., 2007, Isolation and purification of RNA from tissues rich in polyphenols, polysaccharides, and pigments of annatto *Bixa orellana* L.. *Mol Biotechnol*. 37(3):4-220.
- Ryesky, Diana, 2006, *Conceptos tradicionales de la medicina en un pueblo mexicano. Un análisis antropológico*, Dirección General de Divulgación, Secretaría de Educación Pública, México.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. 1998, "A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76:270-76
- Sepúlveda JG, Porta DH, Rocha SM, 2003, la Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21,(3): 355-363
- Shahid-ul-Islam, Luqman J. Rather, Faqeer Mohammad., 2016, Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications. *Journal of Advanced Research* 7, 499–514.
- Sharapin, N. 2000, *Fundamentos de la tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: Roberto pinzón.
- Shilpa, K, Varun K, Lakshmi BS, 2010, An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *J Plant Sci* 5:222-247
- Shilpi JA, Taufiq-Ur-Rahman M, Uddin SJ, Alam MS, Sadhu SK, Seidel v. 2006, Preliminary Pharmacological Screening of *Bixa orellana* L. Leaves. *J Ethnopharmacol*. 108(2): 71-264.

Singleton, V.L. Rossi, J.A. 1965, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. 16: 144-158.

Sokmen M. y col., 2005, In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. Life Sciences: 76 (25), 2981-2993.

Usia T, Banskota AH, Tezuka Y, Midorikawa K, Matsushige K y Kadota S. 2002, Constituents of Chinese Propolis of their Antiproliferative Activities. Journal of Natural Products. 65 (5): 673-676

Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S,. 2000, Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. Epidemiol Infect, 125: 229-55.

Wink M., 2007, Bioprospecting: The search for bioactive lead structures from nature.

Yusuf M., Chowdhury J.U., Yahab M.A., Begum J. 1994. *Medicinal Plants of Bangladesh*. BCSIR Laboratories, Bangladesh, 38

Wink, M., y Schimmer, O. 1999, Modes of action of defensive secondary metabolites:17-134.

World Health Statistics (WHO) 2013, Estadísticas mundiales de salud.

Zarza AL., 2017, composición química y actividad farmacológica de 5 accesiones de achiote (*Bixa orellana* L.) perteneciente a un banco de germoplasma de Yucatán.

Zendejas-Manzo GS, Avalos-Flores H, Soto-Padilla MY., 2014, Revista Biomed. 25:129-143