

**EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS
METABOLITOS SECUNDARIOS MAYORITARIOS EN HOJAS DE *Bixa orellana***

JENIFFER VÉLEZ BEDOYA

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS – QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2015**

**EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS
METABOLITOS SECUNDARIOS MAYORITARIOS EN HOJAS DE *Bixa orellana***

JENIFFER VÉLEZ BEDOYA

**Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar el
título de Magíster en Ciencias – Química**

DIRECTOR:

ANA JULIA COLMENARES DE VÉLEZ, Ph. D.

CODIRECTOR:

JOSÉ HIPÓLITO ISAZA, Ph. D.



**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS – QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2015**

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS – QUÍMICA

JENIFFER VÉLEZ BEDOYA

EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS
METABOLITOS SECUNDARIOS MAYORITARIOS EN HOJAS DE *Bixa orellana*

Palabras claves: *Bixa orellana*, metabolitos secundarios mayoritarios, actividad antioxidante, actividad bactericida

A mí esposo Johann con todo mí amor, a Daniel, a mis padres

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. OBJETIVOS	5
1.1. Objetivo general	5
1.2. Objetivos específicos	5
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
3. ESTADO DEL ARTE	8
3.1. <i>Bixa orellana</i>	8
3.1.1. Generalidades	8
3.1.2. Origen, distribución geográfica y producción	10
3.1.3. Usos tradicionales	11
3.1.4. Estudios farmacológicos	12
3.1.5. Estudios fitoquímicos	15
3.1.5.1. Flavonoides	15
3.1.5.2. Terpenos	16
3.1.5.3. Otros compuestos	18
3.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	19
3.2.1. Método FRAP	20
3.3. BACTERIAS PATÓGENAS	21
3.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	22
3.3.2. <i>Escherichia coli</i>	23
3.3.3. <i>Salmonella entérica</i> serotipo Typhimurium	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	25
4.2. REACTIVOS Y SOLVENTES	25

4.3. ANÁLISIS FITOQUÍMICO	26
4.3.1. Saponinas	26
4.3.1.1. Prueba de espuma	26
4.3.1.2. Prueba de hemólisis	26
4.3.1.3. CCD utilizando como revelador H_2SO_4	27
4.3.2. Polifenoles	27
4.3.2.1. Ensayo con el reactivo de Folin-Ciocalteu	27
4.3.3. Taninos	27
4.3.3.1. Prueba con cloruro férrico	27
4.3.3.2. Prueba de gelatina – sal	28
4.3.3.3. Prueba de sulfato de magnesio	28
4.3.4. Flavonoides	28
4.3.4.1. Prueba de Shinoda	28
4.3.4.2. Prueba de Rosenhein	28
4.3.4.3. CCD utilizando como revelador vapores de amoníaco	29
4.3.4.4. Prueba con H_2SO_4	29
4.3.5. Antraquinonas	29
4.3.5.1. Prueba con HCl/Zn	29
4.3.5.2. Prueba de Borntröger – Krauss	29
4.3.6. Alcaloides	30
4.3.6.1. Prueba de Wagner	30
4.3.6.2. Prueba de Dragendorff	30
4.3.7. Terpenos	30
4.3.7.1. Reacción de Lieberman – Burchard	30
4.3.7.2. Reacción de Salkowski	31
4.4. EXTRACCIÓN	31
4.4.1. Extracción por maceración	31
4.4.2. Extracción líquido – líquido	31
4.5. SEPARACIÓN	32

4.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS	32
4.7. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	33
4.7.1. Actividad antioxidante	34
4.7.1.1. Ensayos FRAP	34
4.7.1.1.1. Preparación del reactivo FRAP	34
4.7.1.1.2. Extracción del material vegetal	34
4.7.1.1.3. Método FRAP	35
4.7.2. Actividad bactericida	36
4.7.2.1. Microorganismos utilizados	36
4.7.2.2. Preparación del medio de cultivo Agar Triptona y Soja	36
4.7.2.3. Recuperación y preservación de las cepas bacterianas	37
4.7.2.4. Preparación de los inóculos bacterianos	37
4.7.2.5. Preparación de los medios de cultivo. Medio líquido (caldo Mueller-Hinton) y Agar Mueller Hinton	39
4.7.2.6. Obtención del rango de concentraciones de los extractos de hoja de <i>Bixa orellana</i> L	39
4.7.2.7. Método de microdilución en caldo y determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	40
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL EXTRACTO	42
5.2. ANÁLISIS FITOQUÍMICO	42
5.2.1. Saponinas	42
5.2.2. Taninos	43
5.2.3. Flavonoides	43
5.2.4. Antraquinonas	44
5.2.5. Alcaloides	44

5.2.6. Terpenos	45
5.3. EXTRACCIÓN LÍQUIDO – LÍQUIDO	46
5.4. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO DE HEXANO	46
5.5. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EXTRACTO DE HEXANO DE LAS HOJAS DE <i>Bixa orellana</i>	48
5.5.1. Análisis de la fracción C1F1	48
5.5.2. Análisis de la fracción C1F2	50
5.5.3. Análisis de la fracción C1F7	61
5.6. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LA FRACCIÓN C1F12	63
5.7. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA FRACCIÓN C1F12	65
5.7.1. Análisis de la fracción C2F41-46	65
5.7.2. Análisis de la fracción C2F47-52	75
5.7.3. Análisis de la fracción C2F67-79	77
5.8. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	87
5.8.1. Método FRAP para determinar la capacidad antioxidante	87
5.8.1.1. Características de los extractos	87
5.8.1.2. Método FRAP	87
5.8.2. Estudios microbiológicos <i>In vitro</i>	90
6. CONCLUSIONES	94
BIBLIOGRAFÍA	96

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CC	Cromatografía de columna
CCD	Cromatografía de capa delgada
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
cm	Centímetros
CMI	Concentración mínima inhibitoria
d	Doblete
DEPT-135	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EM	Espectrometría de masas
eV	Electronvoltio
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ExHBoHex	Extracto de hexano de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L.
ExHBoMeOH	Extracto de metanol de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L.
ExFOELL	Extracto fase orgánica – Extracción líquido-líquido
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power (Poder antioxidante de reducción férrica)
FRAPAce	Extracto de acetona del método FRAP
FRAPMeOH	Extracto de metanol del método FRAP
g	Gramos
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
m	Multiplete
mg	Miligramos
MHz	Megahertz

mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
μL	Microlitros
μM	Micromolar
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singlete
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
TPTZ	2,4,6-Tri(2-piridil)-1,3,5-triazina
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
UV- <i>vis</i>	Ultravioleta visible

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Achiote (<i>Bixa orellana</i>): A. Árbol. B. Fruto. C. Flor	9
Figura 2. Variedades de <i>Bixa orellana</i> : A. Flores blancas. B. Flores rosadas	10
Figura 3. Distribución geográfica de la <i>Bixa orellana</i>	11
Figura 4 Estructuras de los flavonoides encontrados en las hojas de <i>Bixa orellana</i> . A. Apigenina. B. Luteolina. C. Hipoaetina	15
Figura 5. Monoterpenos encontrados en las semillas y en las hojas de <i>Bixa orellana</i> . A. α - pineno. B. β -pineno. C. β -mirceno. D. α -felandreno. E. α -terpineno. F. D-limoneno	16
Figura 6. Sesquiterpenos encontrados en las semillas de <i>Bixa orellana</i> . A. Humuleno. B. γ -elemeno. C. Germacreno B. D. α -copaeno. E. Espatulenol. F. α -cubebeno. G. β -cariofileno. H. Germacreno D	17
Figura 7. Metabolitos aislados de las hojas de <i>Bixa orellana</i> . A. Ishwareno. B. Fitol. C. Estigmasterol. D. Sitosterol	17
Figura 8. Componentes mayoritarios de las semillas de <i>Bixa orellana</i> . A. Estructura de la bixina. B. Estructura de la norbixina	18
Figura 9. Esquema de formación de los principales radicales libres del oxígeno. A. Radical superóxido. B. Peróxido de hidrógeno. C. Radical hidroxilo	20
Figura 10. Estructura del complejo hierro – tripiridiltriazina	21
Figura 11. Metodología empleada para la extracción de los metabolitos mayoritarios secundarios presentes en las hojas de <i>Bixa orellana</i>	41
Figura 12. Rendimiento de la extracción	42
Figura 13. Reacción de un tanino con FeCl_3	43
Figura 14. Reacción de Shinoda	44

Figura 15.	Reacción de antraquinonas con HCl/Zn	44
Figura 16.	Rendimiento de las fracciones obtenidas por CC del extracto de hexano	48
Figura 17.	Perfil cromatográfico de la fracción C1F1	49
Figura 18.	Estructura propuesta del compuesto 1	49
Figura 19.	Fragmentación propuesta para el compuesto 1	49
Figura 20.	Espectro de masas del compuesto 1	50
Figura 21.	Perfil cromatográfico de la fracción C1F2	51
Figura 22.	Espectro RMN ¹ H del compuesto 2	53
Figura 23.	Espectro RMN ¹³ C del compuesto 2	54
Figura 24.	Espectro DEPT-135 del compuesto 2	55
Figura 25.	Espectro bidimensional HSQC del compuesto 2	56
Figura 26.	Expansión del espectro bidimensional HSQC del compuesto 2	57
Figura 27.	Espectro bidimensional HMBC del compuesto 2	58
Figura 28.	Estructura propuesta para el compuesto 2	59
Figura 29.	Fragmentación propuesta para el compuesto 2	60
Figura 30.	Espectro de masas del compuesto 2	61
Figura 31.	Perfil cromatográfico de la fracción C1F7	61
Figura 32.	Estructura propuesta del compuesto 3	62
Figura 33.	Fragmentación propuesta para el compuesto 3	62
Figura 34.	Espectro de masas del compuesto 3	63
Figura 35.	Rendimiento de las fracciones obtenidas por CC de la fracción C1F12	65
Figura 36.	Perfil cromatográfico de las fracciones C2F41-46	66
Figura 37.	Estructuras propuestas para los compuestos de la fracción C2F41-46	67

Figura 38.	Fragmentación propuesta para el compuesto 8	67
Figura 39.	Espectro de masas del compuesto 8	68
Figura 40.	Fragmentación propuesta para el compuesto 9	68
Figura 41.	Espectro de masas del compuesto 9	68
Figura 42.	Fragmentación propuesta para el compuesto 11	69
Figura 43.	Espectro de masas del compuesto 11	70
Figura 44.	Perfil cromatográfico de la fracción C2F47-52	71
Figura 45.	Estructuras propuestas para los compuestos de la fracción C2F47-52	71
Figura 46.	Perfil cromatográfico de la fracción C2F67-79	72
Figura 47.	Estructuras propuestas para los compuestos de la fracción C2F467-79	73
Figura 48.	Fragmentación propuesta para el compuesto 15	73
Figura 49.	Espectro de masas del compuesto 15	74
Figura 50.	Fragmentación propuesta para el compuesto 19	74
Figura 51.	Espectro de masas del compuesto 19	75
Figura 52.	Fragmentación propuesta para el compuesto 20	76
Figura 53.	Espectro de masas del compuesto 20	77
Figura 54.	Curva de calibración para el α -Tocoferol	77
Figura 55.	Resultados de la determinación de la CMI para los microorganismos empleados	77

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación taxonómica de la <i>Bixa orellana</i>	9
Tabla 2. Variedades de <i>Bixa orellana</i> según las colecciones de germoplasma	10
Tabla 3. Concentraciones de α -tocoferol empleadas en la curva de calibración	35
Tabla 4. Estándares de la escala de McFarland utilizados para calibrar el tamaño del inóculo bacteriano	38
Tabla 5. Resultados de las pruebas fitoquímicas de las hojas de <i>Bixa orellana</i>	45
Tabla 6. Fracciones obtenidas de la separación cromatográfica del extracto de hexano	47
Tabla 7. Asignación de señales de RMN ¹ H y ¹³ C para el compuesto 2	52
Tabla 8. Fracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción C1F12	64
Tabla 9. Compuestos identificados por CG-EM para las fracciones C2F41-46	66
Tabla 10. Compuestos identificados por CG-EM para las fracciones C2F47-52	75
Tabla 11. Compuestos identificados por CG-EM para las fracciones C2F67-79	78
Tabla 12. Concentraciones de α -tocoferol y absorbancia a 593 nm	87
Tabla 13. Absorbancia para los extractos FRAPMeOH y FRAPAce	88
Tabla 14. Concentraciones para los extractos FRAPMeOH y FRAPAce	89

Tabla 15.	Capacidad antioxidante calculada (CA) para las concentraciones de los extractos FRAPMeOH y FRAPAce	90
Tabla 16.	Capacidad antioxidante de los extractos FRAPMeOH y FRAPAce	90
Tabla 17.	Intervalo de confianza del 95% de la Capacidad antioxidante de los extractos FRAPMeOH y FRAPAce	91
Tabla 18.	CMI's de ExHBoHex para el crecimiento bacteriano expresadas en mg de extracto/mL de caldo	92

RESUMEN

En el extracto metanólico de las hojas de *Bixa orellana* se detectó la presencia de taninos, flavonoides, alcaloides y terpenos mediante análisis fitoquímico preliminar.

A partir de los extractos de hexano de hojas de *Bixa orellana*, se aisló el sesquiterpeno α -Guaiano, el cual se reporta por primera vez para la especie en estudio, cuya elucidación estructural se realizó mediante RMN unidimensional (RMN¹H y RMN¹³C) y bidimensional (HMBC y HSQC) y CG-EM. También, se proponen 20 compuestos identificados por medio de CG-EM por comparación de los espectros de masas con los datos reportados en la literatura y en la biblioteca del equipo; encontrando entre los componentes mayoritarios nueve compuestos entre los que se encuentran el aromático azuleno, el aldehído 5-fenil-2-pentenal, los sesquiterpenos oxigenados eudesm-7(11)-en-4-ol, isoespatulenol y junipercanfor; el diterpeno isofitol y los esteroides β -stigmasterol y γ -sitosterol. De los componentes mayoritarios propuestos se reportan por primera vez para la *Bixa orellana* el azuleno, 5-fenil-2-pentenal, junipercanfor, eudesm-7(11)-en-4-ol, isofitol y γ -sitosterol.

Las propiedades antioxidantes de los extractos de las hojas de *Bixa orellana* fueron evaluadas por el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Los extractos Metanol:Agua y Acetona:Agua exhibieron alto poder reductor con valores de 266.70 ± 13.58 y 83.47 ± 7.35 $\mu\text{mol } \alpha\text{-tocoferol/g}$, respectivamente.

Para la actividad bactericida la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de hexano de hojas de *Bixa orellana* frente a *Staphylococcus aureus* fue 0.020 mg/mL, para *Escherichia coli* fue 0.045 mg/mL y *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium fue 0.028 mg/mL; evidenciando que la bacteria *Staphylococcus aureus* presenta mayor sensibilidad.

Palabras claves: *Bixa orellana*, metabolitos secundarios mayoritarios, actividad antioxidante y bactericida

ABSTRACT

In the methanol extract from the leaves of *Bixa orellana* the presence of tannins, flavonoids, alkaloids and terpenes detected by preliminary phytochemical analysis.

From the hexane extracts of *Bixa orellana* leaves, the α -Guaiano sesquiterpene, which is reported for the first time for the species under study, the structural elucidation was performed by one-dimensional NMR (NMR^1H y NMR^{13}C) and two-dimensional (HMBC y HSQC) and GC-MS was isolated. 20 compounds identified by GC-MS by comparing the mass spectra data reported in the literature and library team is also proposed; finding among the major components nine compounds among which are the azulene aromatic, aldehyde 5-phenyl-2-pentenal, oxygenated sesquiterpenes eudesm-7(11)-en-4-ol, junipercanfor and isoespatulenol; the isophytol diterpene and sterols β -stigmasterol and γ -sitosterol. Of the major components identified are reported for the first time for the species in study azulene, 5-phenyl-2-pentenal, junipercanfor, eudesm-7(11)-en-4-ol, isophytol and γ -sitosterol.

The antioxidant properties of the extracts of *Bixa orellana* leaves were evaluated by the FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) method. The extracts Methanol:Water and Acetone:Water exhibited with high reducing power values 266.70 ± 13.58 and 83.47 ± 7.35 $\mu\text{mol } \alpha\text{-tocopherol/g}$, respectively.

Bactericidal activity for the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the hexane extracts of leaves of *Bixa orellana* against *Staphylococcus aureus* was 0.020 mg/mL, for *Escherichia coli* was 0.045 mg/mL and *Salmonella enterica* serotype Typhimurium was 0.028 mg/mL; showing that the bacterium *Staphylococcus aureus* has greater sensitivity.

Keywords: *Bixa orellana*, major secondary metabolites, antioxidant activity and bactericidal

INTRODUCCIÓN

A través de la historia el ser humano ha utilizado plantas aromáticas, medicinales y condimentarias debido al descubrimiento paulatino de sus beneficios terapéuticos, cosméticos y alimenticios. Sin embargo, el uso de las plantas aromáticas se vio limitado por el surgimiento de nuevos productos sintéticos empleados principalmente en las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos. No obstante, la humanidad nuevamente ha volcado sus esfuerzos hacia el aprovechamiento de los recursos naturales porque se han demostrado los grandes beneficios que éstos aportan.

La *Bixa orellana* o achiote ha sido utilizado desde tiempos primitivos, y lo es aún, por indígenas del Amazonas como tinte para la piel, lo cual, además de su valor ornamental, protege contra las picaduras de insectos y ayuda en la cicatrización de las heridas. Se emplea como condimento para colorear los alimentos como arroz, queso, margarina, mantequilla y aceites. También puede servir como materia prima en la fabricación de barnices, cosméticos, repelentes, tatuajes, decoración de cerámicas y textiles (Aparnathi, K. y colaboradores, 1990).

Diferentes estudios han demostrado que la *Bixa orellana* es un analgésico astringente, antiséptico, cicatrizante; presenta propiedades antioxidantes, antibacterianas, anticonvulsivas e hipoglucémicas, también es desinflamante, diurético, expectorante, purgante, tónico y repelente (Fonnegra, R y colaboradores, 2007). Los extractos de las diferentes partes de la planta (hojas, semillas, raíz) han sido ampliamente empleados y se ha evidenciado su acción farmacológica, especialmente actividad antimicrobiana y antifúngica frente a diferentes organismos patógenos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*. Además, ha mostrado actividad anticarcinogénica, antimalaria y como antídoto.

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos que producen las plantas e intervienen en la interacción ecológica de la misma con el medio ambiente. Diversas investigaciones han demostrado que los extractos de *Bixa orellana* presentan actividad farmacológica, estos estudios han identificado algunos de los componentes químicos responsables de la actividad biológica. Además, se han realizado análisis fitoquímicos que muestran la presencia de terpenos, esteroides, saponinas, azúcares, taninos, alcaloides y flavonoides en semillas y hojas de *Bixa orellana*. Yong, Y. K. y colaboradores a partir de extractos acuosos detectaron 54

compuestos, de los cuales se identificaron cinco compuestos mayoritarios: 2-butanamina, pantolactona y los ácidos acético, pentanoico y benzoico. La especie *Bixa orellana* posee diversos terpenos, en su mayoría monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos dentro de los cuales se encuentran α - y β -pineno, β -mirceno, α -felandreno, α -terpineno, limoneno D, α -cubebeno, α -copaeno, β -cariofileno, germacreno B y D, humuleno, γ -elemeno, α -copaeno, espatulenol (Galindo-Cuspinera, V. y colaboradores, 2002, Giorgi, A. y colaboradores, 2013) los cuales están presentes en aceites esenciales de otras plantas y han mostrado actividad frente a algunos microorganismos patógenos. No obstante, el conocimiento sobre la composición química de las semillas es mayor que el que se tiene por los metabolitos presentes en las hojas. Por lo cual se hace pertinente brindar mayor conocimiento científico en este aspecto para contribuir con la información que se tiene sobre los metabolitos presentes en las hojas de *Bixa orellana* y su potencial aplicación en diversas áreas.

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al estudio de las hojas de *Bixa orellana* (variedad amarilla), aislando e identificando los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en ellas y evaluar su actividad biológica.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer y purificar los metabolitos mayoritarios obtenidos a partir de las hojas de *Bixa orellana* (variedad amarilla).
- Identificar los metabolitos secundarios mayoritarios mediante técnicas de espectrometría de masas (CG-EM) y resonancia magnética nuclear (RMN) unidimensional y bidimensional.
- Realizar ensayos *In vitro* con los extractos obtenidos de las hojas de *Bixa orellana* para determinar su actividad antioxidante y bactericida.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde la antigüedad, la actividad agrícola ha sido útil para el sustento del hombre. Por tal razón, éste siempre ha buscado mecanismos que le permitan obtener un mejor provecho de sus cultivos. A través del tiempo dicha actividad ha sido desarrollada por el hombre tanto para la producción de alimentos como para la obtención de recursos industriales a través de los diferentes cultivos. En los países latinoamericanos, especialmente en Colombia, la actividad agrícola tiene gran importancia debido a su alto impacto social, económico y alimenticio pues genera fuentes de empleo, mejora la economía del país y permite el desarrollo de industrias que producen una diversidad de productos naturales.

En Colombia, la *Bixa orellana* es una planta conocida comercial y agrícolamente ya que comprende un gran número de variedades. Ha sido utilizada tradicionalmente por su propiedades terapéuticas, generalmente se usa como laxante suave, digestivo, tónico, antiinflamatorio y antiespasmódico. Es por eso que la especie *Bixa orellana* ha sido objeto de algunas investigaciones fitoquímicas. Estos estudios han mostrado que las diferentes partes de la planta y sus extractos presentan importantes actividades biológicas, entre las cuales figuran actividad frente a cepas de *Leishmania*, amplia actividad antimicrobiana y antifúngica frente a diferentes organismos patógenos. Mostrando también actividad anticarcinogénica y antimalaria. Esta actividad se debe a la variedad de compuestos presentes en esta especie, entre los cuales se encuentran monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y flavonoides. No obstante, los estudios realizados se han enfocado en determinar la actividad biológica de la planta dejando de lado el conocimiento científico sobre los metabolitos presentes.

Las diferentes investigaciones sobre la planta se han enfocado en el estudio de las semillas ya que en ellas se encuentran los colorantes naturales bixina y norbixina. Sin embargo, investigaciones realizadas con extractos (acuosos, metanólicos, de hexano y diclorometano) de las hojas han demostrado su potencial biológico en el tratamiento de la inflamación prostática; otras investigaciones recientes muestran que a diferentes concentraciones, los extractos presentan actividad bactericida y antifúngica, también estudios *In vitro* mostraron su potencial antiinflamatorio, anticancerígeno y como antídoto. Todo lo anterior sugiere que es necesario realizar nuevas investigaciones que permitan tener mayor información acerca de los metabolitos presentes en las hojas de *Bixa orellana*; puesto que teniendo mayor conocimiento científico de la *Bixa orellana*, se puede validar y soportar

desde el ámbito científico el saber popular con el que se ha cultivado la planta, otorgándole mayor importancia a su siembra y uso, permitiendo así, su comercialización y potencial aplicación biológica. Además, debido a las condiciones favorables que ofrece el medio en el país para su cosecha, se puede sugerir el cultivo de *Bixa orellana* como remplazo viable de cultivos ilícitos que están presentes en una gran cantidad de hectáreas en las diversas regiones del país generando un impacto negativo en el ámbito socio-económico y cultural.

Así entonces, los estudios encaminados al conocimiento de las diversas propiedades de la planta no solo tienen un impacto científico sino que además contribuirán a generar nuevos mecanismos de uso y explotación de la misma.

Por consiguiente se plantean las siguientes preguntas de investigación:

¿Qué clase de metabolitos secundarios mayoritarios se encontrarán en los extractos de las hojas de *Bixa orellana*?

¿Qué tipo de actividad biológica tendrán los extractos de las hojas de *Bixa orellana*?

3 ESTADO DEL ARTE

“...con las semillas unas pelotas, con las cuales se pintaban la cara y le mezclaban ciertas gomas, o se hacían unas pinturas como bermellón fino, y de aquél color se pintaban la cara y el cuerpo, de tan buena gracia que parecían el mismo diablo...”. Francisco de Orellana.

3.1 *Bixa orellana*

El nombre del género *Bixa* se deriva del nombre común (biza o bija) dado por los indígenas de las Antillas; la especie lleva el calificativo *orellana* en honor a Francisco de Orellana, el conquistador español que desde Quito recorriendo el río Amazonas, descubrió la selva amazónica. La *Bixa orellana* era cultivada en épocas precolombinas desde Brasil y Bolivia hasta México (Smithsonian Tropical Research Institute, 2014).

3.1.1 Generalidades

El achiote (*Bixa orellana*) es un árbol pequeño que alcanza 3 a 4 metros de altura, de copa baja y extendida (Figura 1A). Es de tronco corto, 20 a 30 cm, de diámetro en la base del tallo. Su raíz es pivotante, las hojas son verdes claras, alternas, acorazonadas y puntiagudas, de 10 a 20 cm de largo y 5 a 10 cm de ancho. El fruto (Figura 1B) es una cápsula rojiza con espinas que contiene 50 semillas en promedio; estas semillas están cubiertas de una pulpa rojiza y cerosa que constituye el colorante llamado achiote. Las flores son hermafroditas y se disponen en ramilletes (Figura 1C), los pétalos son anchos y redondeados y pueden ser de color rosado, blanco o lila, dependiendo de la variedad (Idrobo, R., 2014). La clasificación taxonómica del achiote se encuentra en la Tabla 1.

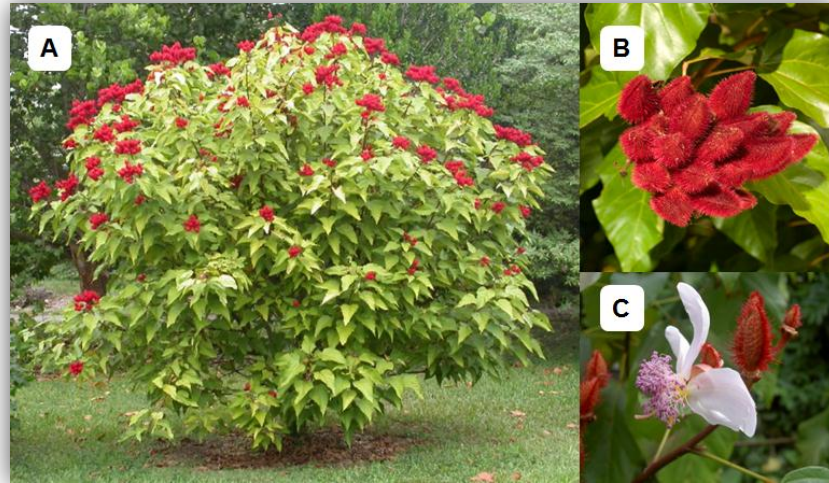


Figura 1. Achiote (*Bixa orellana*): A. Árbol. B. Fruto. C. Flor
Fuente: Smithsonian Tropical Research Institute, 2014

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la *Bixa orellana*

Taxonomía	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida
Orden	Malvales
Familia	Bixaceae
Género	<i>Bixa</i>
Especie	<i>orellana</i>

Autor: Linneo. C. Fuente: <http://www.tropicos.org/Name/3800005>

La *Bixa orellana* es una planta conocida comercial y agrícolamente, comprende un gran número de variedades que se distinguen por las características fenotípicas que pueden observarse cuando la planta crece. Dentro de ellas existen tres variedades bien diferenciadas: negra, roja y amarilla, siendo esta última la más aconsejable industrialmente para su fomento por tener mayor contenido de materia colorante que las otras (Álvarez, L. A. y colaboradores, 1990). Desde el punto de vista de las flores se pueden considerar dos variedades de *Bixa orellana*, de flores blancas (Figura 2A), que dan cápsulas amarillo-verdosas y casi lampiñas, y de flores rosadas (Figura 2B), que producen cápsulas rojizas y densamente recubiertas de pelos rígidos. La variedad de flores blancas tiene un 10.4 % de colorante y la de flores rosadas un 8.2% (Janick, J., 2012).



Figura 2. Variedades de *Bixa orellana*: A. Flores blancas. B. Flores rosadas
Fuente: Janick, J., 2012

3.1.2 Origen, distribución geográfica y producción

El cultivo de *Bixa orellana* es originario de América tropical, más específicamente de la región de la Amazonía, aunque en Kenia e India también existe. En el Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y el Caribe se reportaron las variedades de *Bixa orellana* en la región de América Latina (Tabla 2) (Knudsen, H., 2000).

Tabla 2. Variedades de *Bixa orellana* según las colecciones de germoplasma

País	Variedades disponibles
Bolivia	18 variedades silvestres
Brasil	9 variedades silvestres
Colombia	100 variedades tradicionales
Costa Rica	132 variedades silvestres
Ecuador	6 variedades tradicionales
Guatemala	19 variedades tradicionales
Perú	26 variedades silvestres

Fuente: Knudsen, H., 2000

En la Figura 3 se observa la distribución geográfica de los países donde se cultiva la planta *Bixa orellana* (Smithsonian Tropical Research Institute, 2014).



Figura 3. Distribución geográfica de la *Bixa orellana*
Fuente: Smithsonian Tropical Research Institute, 2014

Perú es el primer productor y exportador mundial de achiote, representa un 35% de la producción mundial, el otro 65% proviene de Kenia, Brasil e India. Los principales países a los que se les venden los derivados del achiote, Bixina y Norbixina, son Estados Unidos (33%), Japón (10%), Reino Unido (9%), Alemania (8%) y Holanda (6%) (FAO, 2014).

3.1.3 Usos tradicionales

La *Bixa orellana* ha sido utilizada desde tiempos primitivos, y lo es aún por indígenas del Amazonas como tinte para la piel, lo cual, además de su valor ornamental, protege contra las picaduras de insectos y ayuda en la cicatrización de las heridas. Además, los chamanes y las comunidades indígenas de la Amazonía lo emplean en prácticas culturales, ya que la pintura obtenida de las semillas la aplican en la fontanela de los lactantes, la mezclan con la resina del caucho y esto sirve para protegerlos contra los espíritus del bosque (Aparnathi, K. y colaboradores, 1990).

En la actualidad se ha retomado el interés industrial por el achiote o *Bixa orellana* como colorante natural ya que algunos colorantes sintéticos, como la tartrazina, han generado reacciones alérgicas o algunas patologías a quienes consumen alimentos con estos colorantes (Tanaka, T., 2006). En la actualidad, las legislaciones de algunos países son drásticas acerca del uso de los colorantes químicos en la producción de alimentos. El achiote se emplea como condimento alimenticio. Su principal función es colorear los alimentos como arroz, queso, margarina, mantequilla y aceites. También puede servir como materia prima en la fabricación de barnices, cosméticos, repelentes, tatuajes, decoración de cerámicas y textiles.

Diferentes estudios han demostrado que el achiote es un analgésico astringente, antiséptico, antibacteriano, antidisentérico, anticonorréico, antioxidante, cicatrizante, desinflamante, diurético, expectorante, hipoglicémico, purgante, tónico y repelente. Las diferentes partes de la planta han sido utilizadas tradicionalmente por sus propiedades terapéuticas y medicinales. Las semillas son empleadas para la curación del sarampión, la viruela y la lepra. También sirven para afecciones estomacales, renales y disentería, como astringente y purgante ligero. Las hojas son empleadas en afecciones respiratorias y de la garganta, para aliviar la conjuntivitis, el dolor renal, la diarrea y el vómito y para minimizar las cicatrices y desinflamar hemorroides. Además, se utiliza para las inflamaciones dérmicas y vaginales, sirve como antídoto contra la intoxicación y la picadura de serpientes. La raíz se usa para diabetes, malaria, oliguria, asma e ictericia. De acuerdo a la enfermedad, las diferentes partes de la planta pueden ser preparadas en infusión, machacadas, molidas, en forma de té o en decocción (Fonnegra, R., 2007).

3.1.4 Estudios farmacológicos

Los extractos de las diferentes partes de la planta (hojas, semillas, raíz) han sido ampliamente empleados y se ha evidenciado su acción farmacológica, especialmente actividad antimicrobiana y antifúngica frente a diferentes organismos patógenos. Además, ha mostrado actividad anticarcinogénica, antimalaria y como antídoto.

Shilpi y colaboradores, mostraron que el extracto metanólico de las hojas presentan actividad antibacteriana contra agentes causantes de la diarrea y disentería, incluyendo *Shigella dysenteriae*. Braga y colaboradores, encontraron que los extractos metanólicos de 24 plantas, entre ellas la *Bixa orellana*, presentaron actividad antileishmánica y antifúngica. Estas plantas son empleadas en la medicina tradicional de Brasil para el tratamiento de algunas infecciones y desórdenes inflamatorios. Se evaluó la actividad de estos extractos en las especies *Leishmania* (*L. amazonensis* y *L. chagasi*) y dos hongos (*Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*). Huamán y colaboradores emplearon las hojas de *Bixa orellana* para el tratamiento de la inflamación prostática y la infusión para el tratamiento de la gastritis y la úlcera. Zhai y colaboradores, demostraron que extractos isopropanólicos de la raíz presentan actividad frente a las cepas 3D7 y K1 responsables de producir malaria y ocasionar la muerte de medio millón de personas en el mundo, especialmente niños. Singh Bais encontró que los extractos etanólicos de las hojas de *Bixa orellana* presentan amplio poder antibacterial, especialmente frente a *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*.

Los extractos alcohólicos de hojas y semillas de *Bixa orellana* mostraron actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas y también frente al hongo *Candida albicans* que produce afecciones vaginales, orales y en el intestino (Tamil Selvi, A. y colaboradores, 2011; Fleischer, T.C. y colaboradores, 2003). Osorio determinó que los extractos de semillas obtenidos por fluidos supercríticos mostraron actividad frente a las bacterias fitopatógenas *Erwinia sp* (responsable de la pudrición del cogollo en banano, plátano, papa, entre otros cultivos) y *Ralstonia solanacearum* (responsable de la marchitez bacteriana en plantas ornamentales). Investigaciones realizadas por Gómez, y colaboradores con el extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* encontraron la concentración mínima inhibitoria (CMI) para las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes* y los hongos *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* y *Byssoschlamys fulvas* de interés en la industria alimenticia. Los hongos mostraron mayor sensibilidad al extracto que las bacterias con CMI entre 1 y 512 ppm. Mientras que para las bacterias fue entre 256 y 1024 ppm. El sesquiterpeno Ishwareno fue aislado por Raga y colaboradores mediante la extracción con diclorometano a partir de las hojas, mostrando actividad antifúngica para *Candida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*, con una menor actividad bacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Fue inactivo contra *Bacillus subtilis* y *Aspergillus niger*.

Castello y colaboradores, encontraron que los extractos de las hojas muestran una actividad máxima contra *Bacillus pumilus* en comparación con los extractos de raíces. Otros estudios realizados por Rojas y colaboradores, mostraron que extractos etanólicos, hexánicos y acuosos de las hojas de *Bixa orellana* presentaban actividad frente a *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*. Venugopalan y colaboradores, emplearon extractos de metanol, etanol, acetona y dimetil sulfóxido de hojas y cápsulas sin semillas de *Bixa orellana* para evaluar la actividad frente a las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados muestran que, a diferentes concentraciones, los extractos presentan actividad bactericida, siendo los de las hojas los que tienen mayor potencial antibacterial.

Alonso-Castro y colaboradores, realizaron estudios *In vivo* en pacientes con síntomas de cáncer y demostraron tener efectos citotóxicos en las líneas celulares. En investigaciones realizadas con perros por Russell y colaboradores, demostraron que el extracto de achiote parcialmente purificado presentaba actividad hipoglucémica; es decir, se observó una disminución de los niveles de glucosa en la sangre. Estudios realizados sobre los edemas en las patas de las ratas, encontraron que los extractos acuosos de hojas de *Bixa orellana* presentaban actividad antiinflamatoria, disminuyendo el 56.2% de la hinchazón (Yong, Y. K. y colaboradores, 2013). Otros estudios con ratones mostraron que el extracto de hojas y ramas de *Bixa orellana* presentaban actividad antivenenosa para *Bothrops asper* y *Bothrops atrox* (Otero R., 2000).

Shilpi y colaboradores realizaron estudios *In vivo* y mostraron que los extractos de *Bixa orellana* presentan actividad antioxidante. El extracto metanólico de las hojas presenta actividad antioxidante por el ensayo DPPH ($IC_{50}=22.36 \mu\text{g/mL}$). Chisté y colaboradores, demostraron actividad depuradora de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) de los extractos de semillas de *Bixa orellana* obtenidos con diferentes solventes. Aseervatham Smilin Bell y colaboradores, determinaron la capacidad antioxidante de extractos de *Bixa orellana* en ratas que fueron sometidas a estrés oxidativo inducido por acetaminofén exhibiendo que los extractos tenían actividad significativa contra el daño producido por el acetaminofén en niveles de dosis de 200 mg/Kg. Viuda-Martos y colaboradores, demostraron que los extractos polares de las hojas de *Bixa orellana* presentaban mayor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides que los extractos polares de las semillas, lo que indica mayor capacidad antioxidante en los extractos de las hojas.

3.1.5 Estudios fitoquímicos

Diversas investigaciones han demostrado que los extractos de *Bixa orellana* presentan actividad farmacológica, estos estudios han permitido la identificación de algunos de los componentes químicos responsables de la actividad biológica. Además, se han realizado análisis fitoquímicos que muestran la presencia de compuestos volátiles (alcoholes, aldehídos, cetonas), terpenos, esteroides, saponinas, azúcares, taninos, alcaloides, flavonoides y otros compuestos fenólicos en las semillas y hojas de *Bixa orellana*. No obstante, el conocimiento sobre la composición química de las semillas es mayor que el que se tiene por los metabolitos presentes en las hojas (Giorgi, A. y colaboradores, 2013; Yong, Y. K. y colaboradores, 2013; Tamil Selvi, A. y colaboradores, 2011; Huamán, O. y colaboradores, 2009; Fleisher, T. C. y colaboradores, 2003).

3.1.5.1 Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en las especies vegetales y sus coloraciones van del amarillo al rojo. Son responsables de la polinización debido al aroma y al color que le confieren a las plantas. En el ser humano, poseen propiedades antimicrobianas y anticancerígenas. Algunos flavonoides como apigenina (Figura 4A), la cual presenta efectos antiinflamatorios y anticancerígenos (Patel, D. y colaboradores, 2007), luteolina (Figura 4B) que es conocida por sus propiedades antialérgicas, antiinflamatorias, anticancerígenas y antioxidantes (Kimata, M. y colaboradores, 2000) e hipoaetina (Figura 4C).

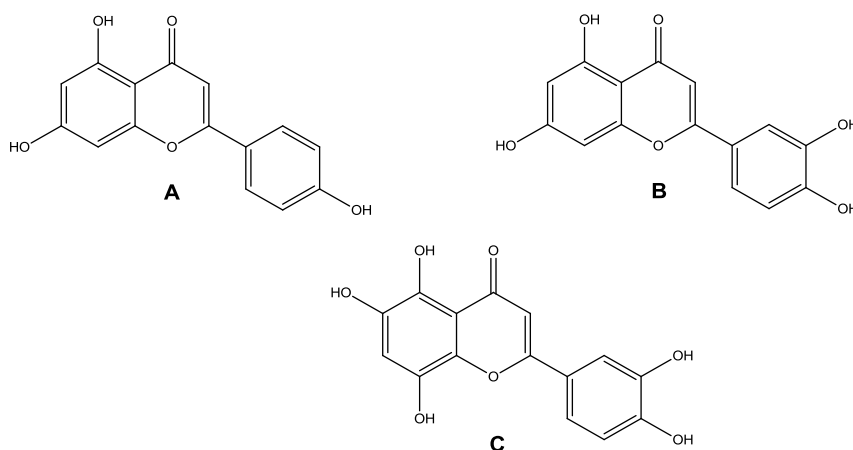


Figura 4. Estructuras de los flavonoides encontrados en las hojas de *Bixa orellana*.

A. Apigenina. B. Luteolina. C. Hipoaetina

Fuente: Chisté, R. C. y colaboradores, 2011

3.1.5.2 Terpenos

La especie *Bixa orellana* posee diversos terpenos, en su mayoría son monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos. Galindo-Cuspinera y colaboradores encontraron algunos monoterpenos como el α - y β -pineno, β -mirceno y α -felandreno (Figura 5) a partir de extractos acuosos y aceitosos de semillas de *Bixa orellana*. Giorgi y colaboradores a partir de la extracción con agua y etanol de las hojas encontraron α -terpineno y limoneno D (Figura 5).

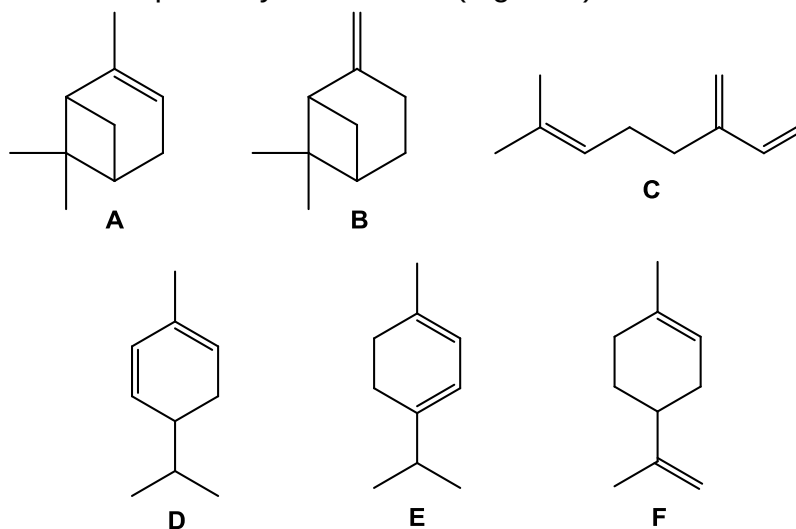


Figura 5. Monoterpenos encontrados en las semillas y en las hojas de *Bixa orellana*.

A. α - pineno. B. β -pineno. C. β -mirceno. D. α -felandreno. E. α -terpineno. F. D-limoneno

Fuente: Galindo-Cuspinera, V. y colaboradores, 2002; Giorgi, A. y colaboradores, 2013

Los sesquiterpenos humuleno, γ -elemeno, germacreno B, α -copaeno, espatulenol (Figura 6) conforman el mayor grupo de compuestos volátiles identificados en los extractos acuosos y aceitosos de semillas de *Bixa orellana* (Galindo-Cuspinera, V. y colaboradores, 2002). Giorgi y colaboradores mediante extracción con agua y etanol de las hojas identificaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) los sesquiterpenos α -cubebeno, α -copaeno, β -cariofileno y germacreno D, entre otros (Figura 6). Estos compuestos también han sido encontrados en las especies *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea* y *Cyperus longus* mostrando actividad bactericida frente a bacterias comunes asociadas a intoxicación como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecium* (Ait-Ouazzou, A. y colaboradores, 2012).

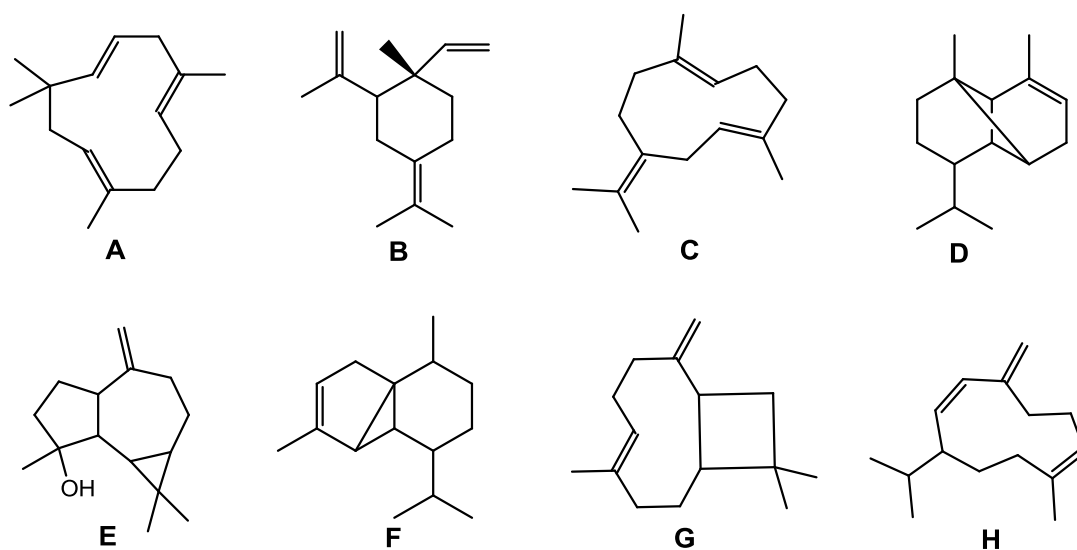


Figura 6. Sesquiterpenos encontrados en las semillas de *Bixa orellana*. A. Humuleno. B. γ-elemeno. C. Germacreno B. D. α-copaeno. E. Epatulenol. F. α-cubebeno. G. β-cariofileno. H. Germacreno D

Fuente: Giorgi, A. y colaboradores, 2013; Galindo-Cuspinera, V. y colaboradores, 2002

Raga y colaboradores en 2011 aislaron el sesquiterpeno Ishwareno mediante extracción con diclorometano de las hojas, exhibiendo actividad antifúngica moderada contra *Candida albicans* y actividad antibacterial frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Además, encontraron fitol, estigmasterol y sitosterol (Figura 7).

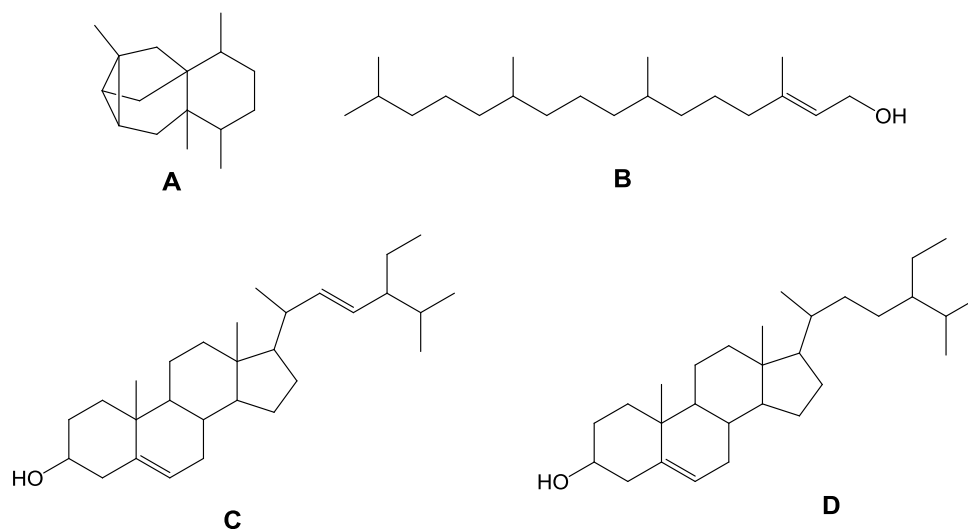


Figura 7. Metabolitos aislados de las hojas de *Bixa orellana*. A. Ishwareno. B. Fitol. C. Estigmasterol. D. Sitosterol

Fuente: Raga, D. D. y colaboradores, 2011

Los diterpenos bixina (Figura 8A) y norbixina (Figura 8B) son los compuestos mayoritarios de las semillas y son los responsables del color amarillo, naranja o rojo de los extractos, cuyo principal uso es como colorantes en la industria alimenticia sustituyendo colorantes sintéticos como la tartrazina.

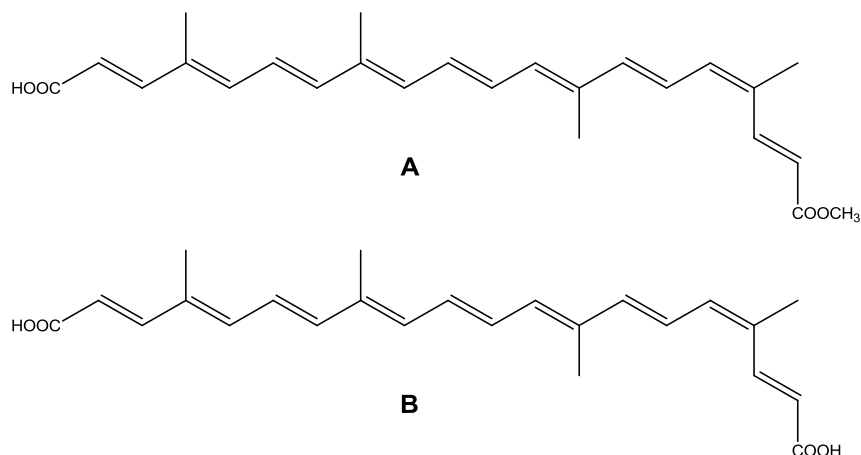


Figura 8. Componentes mayoritarios de las semillas de *Bixa orellana*. A. Estructura de la bixina. B. Estructura de la norbixina

3.1.5.3 Otros compuestos

Se han identificado compuestos volátiles presentes en extractos acuosos y aceitosos de semillas de *Bixa orellana*. Mediante CG-EM se detectaron 107 compuestos volátiles, de los cuales fueron identificados 51. Dentro de los compuestos descritos se evidenciaron alcoholes (pentanol, hexanol y algunos derivados de éstos), aldehídos (hexanal, 2-heptenal, nonanal, entre otros), cetonas (6-metil-5-hepten-2-ona, 3-penten-2-ona y 3-octanona), el *cis*- y *trans*-1,3-dimetilciclohexano fue el alcano hallado en todos los extractos. Se identificaron algunos ácidos y ésteres de acuerdo al extracto analizado. También se reconocieron compuestos heterocíclicos, principalmente piridina y derivados del furano (Galindo-Cuspinera, V. y colaboradores, 2002). A partir de extractos acuosos se detectaron 54 compuestos, de los cuales se identificaron cinco compuestos mayoritarios: 2-butanamina, pantolactona y los ácidos acético, pentanoico y benzoico (Yong, Y. K. y colaboradores, 2013).

Al comparar los análisis fitoquímicos de las hojas de *Bixa orellana* con las semillas, se detectaron alcaloides en las hojas pero no en las semillas, mientras que se detectaron antraquinonas en las semillas pero no en las hojas (Tamil Selvi, A. y colaboradores, 2011).

3.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados lo que lo convierte en una molécula muy inestable y altamente reactiva, con un tiempo de vida media muy corto. Para lograr la estabilidad modifican las moléculas de su entorno formando otros radicales libres por reacciones en cadena.

Los radicales libres del oxígeno son los más abundantes en los organismos aeróbicos y se forman continuamente como parte de su metabolismo. No obstante, factores como la polución, la radiación, los pesticidas, algunos medicamentos y el agua contaminada generan radicales libres que están implicados en más de 100 enfermedades en los seres humanos, como artritis, aterosclerosis, gastritis, generación de tumores, desórdenes neurológicos como la epilepsia y la inflamación. Lo normal es tener un equilibrio entre radicales libres y compuestos antioxidantes; sin embargo, determinadas enfermedades o una nutrición insuficiente pueden alterar este balance, siendo este un factor implicado en el desarrollo o incremento de las enfermedades, lo que se conoce como estrés oxidativo. Por esto, se requiere evaluar la actividad antioxidante de los productos vegetales que inhiban el daño oxidativo (Robles, M. y colaboradores, 2007).

Dentro de las especies reactivas de oxígeno (ERO) se encuentran el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se origina en la mayoría de células aerobias por transferencia de un electrón al oxígeno molecular como producto colateral del transporte electrónico (Figura 9A). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no es un radical libre pero es considerado un oxidante tóxico para las células y puede ocasionar rupturas en las membranas y lesiones en el ADN (Figura 9B), en presencia de metales forma el radical hidroxilo que es la especie más dañina. El radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$) tiene una vida media muy corta y puede dañar el ADN, proteínas y enzimas; alterar la membrana plasmática y destruir la célula (Figura 9C) (Korc, D. I. y colaboradores, 1995).

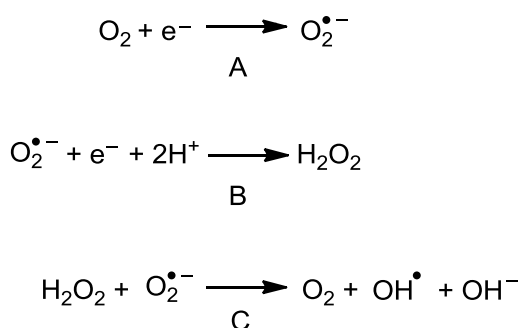


Figura 9. Esquema de formación de los principales radicales libres del oxígeno. A. Radical superóxido. B. Peróxido de hidrógeno. C. Radical hidroxilo

Fuente: Korc, D. I. y colaboradores, 1995

Los antioxidantes son sustancias que cuando están presentes en los alimentos o en el cuerpo a concentraciones bajas comparadas con las del sustrato oxidable, retardan o previenen la oxidación de dicho sustrato. Los antioxidantes han sido utilizados para prevenir el deterioro de la calidad de los productos y mantener su valor nutricional. También son de importancia en la salud ya que ayudan al cuerpo a protegerse contra el daño causado por las especies reactivas de oxígeno y las enfermedades degenerativas. Pueden disminuir la concentración de oxígeno, previniendo la reacción de iniciación por un radical hidroxilo, secuestrar metales y degenerar los productos de oxidación primarios a compuestos estables (López, L., 2011).

3.2.1 Método FRAP

Este método permite la determinación de la actividad antioxidante basada en la capacidad de reducir al hierro (FRAP, por sus siglas en inglés). Fue presentado por primera vez en 1996 por Benzie, I.F.F. y colaboradores como una técnica sencilla, rápida y fácilmente reproducible para la medición del poder antioxidante total de una sustancia. Esta técnica ha tenido buenos resultados tanto en mezclas como en soluciones puras.

Este método ha sido utilizado para determinar el aumento en el poder antioxidante proporcionado por el consumo de té verde y otros derivados de este mismo producto, el cual es reconocido como un buen proveedor de antioxidantes, y los resultados han sido positivos, permitiendo diferenciar la actividad antioxidante proporcionada entre diferentes productos (Benzie, I.F.F. y colaboradores, 1999).

A bajo pH y en presencia de antioxidantes (reductores), la forma férrica del complejo hierro-tripiridiltriazina $[\text{Fe(III)}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ se reduce a su forma ferrosa $[\text{Fe(II)}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ (Figura 10). El complejo reducido posee una coloración azul intensa que presenta su máxima absorción a 593 nm. La aparición del color indicará la capacidad reductora de la muestra, que será proporcional a la concentración de antioxidantes en la misma, estos valores se obtienen midiendo los cambios de absorbancia a la longitud de onda dada después de ser añadida la muestra y dichos valores son comparados con una curva estándar de Trolox o α -Tocoferol.

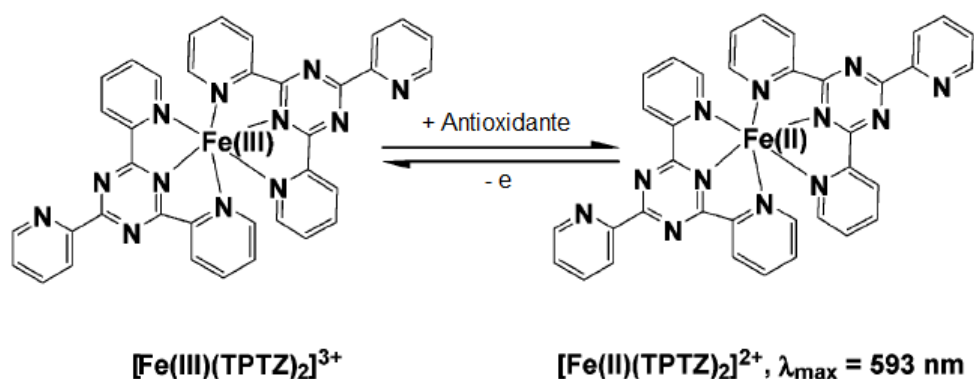


Figura 10. Estructura del complejo hierro – tripiridiltriazina

3.3 BACTERIAS PATÓGENAS

Las bacterias son microorganismos unicelulares que poseen una pared celular compuesta por peptidoglicano y carecen de núcleo definido presentando su material genético disperso en el citoplasma. La mayoría de las bacterias son inofensivas y necesarias para el reciclaje de algunos elementos químicos o como ayudantes en diversos procesos metabólicos. Sin embargo, algunas bacterias patógenas son las responsables de causar enfermedades infecciosas como cólera, sífilis, tuberculosis, entre otras.

Algunas de estas bacterias producen enfermedades que son transmitidas a través de los alimentos, estas patologías se denominan de origen alimentario y los peligros para la salud relacionados con el consumo de productos alimenticios pueden tener causas físicas (por ejemplo la ingesta de cualquier objeto punzante), químicas (por ejemplo, iones de metales pesados) o microbiológicas. Las enfermedades transmisibles por los alimentos y causadas por microorganismos se clasifican en términos generales en infecciones e intoxicaciones de acuerdo con el modo de acción del agente causal (Yousef, A.E. ,2006).

3.3.1 *Staphylococcus aureus*

Son células esféricas, con un diámetro de 0.5 – 1.5 μm , se presentan solos, en pares o racimos irregulares, son Gram positivas, no móviles y son anaerobios facultativos; es decir, poseen las dos rutas metabólicas, la respiratoria (en presencia de oxígeno) y la fermentativa (en ausencia de oxígeno) (Soriano, J. M. y colaboradores, 2002). Esta bacteria se caracteriza por sobrevivir en condiciones de sequedad durante un largo período de tiempo. Este patógeno produce la enterotoxina estafilocócica, que causa la gastroenteritis estafilocócica, una enfermedad transmitida por los alimentos (Yousef, A.E., 2006).

El *Staphylococcus aureus* tiene predilección por los alimentos ricos en proteínas, como la leche, el queso, la mantequilla, la mayonesa, la carne, las cremas, los helados, las ensaladas con pollo, entre otros (Salgado, M.T., 2006). El síntoma principal de intoxicación estafilocócica es vómito dentro de 1 a 6 horas después de comer el alimento contaminado y usualmente seguido por diarrea, calambres abdominales y agotamiento. En casos más severos, pueden presentarse síntomas adicionales como dolor de cabeza, calambres musculares, cambios en la presión sanguínea y velocidad del pulso. (Soriano, J. M. y colaboradores, 2002).

Las toxinas estafilocócicas son entéricas y por ello, causan gastroenteritis. Un adulto saludable puede consumir unos 30 g o mL de un alimento que contenga 100 a 200 ng de toxinas producidas por una población de células de 10^6 a 10^7 por gramo o mililitro; los niños, los viejos y los enfermos resisten cantidades menores. Los síntomas se presentan en un lapso de 2 a 4 horas, lo que está en relación directa con la potencia y las cantidades de toxinas ingeridas, así como con la resistencia del individuo. La enfermedad dura 1 a 2 días y en pocas ocasiones es fatal. Los primeros síntomas que provocan las toxinas al estimular el sistema nervioso autónomo son salivación, náuseas, vómito, calambres abdominales y

diarrea. Algunos síntomas secundarios incluyen sudoración, escalofríos, dolor de cabeza y deshidratación. Sin embargo, los síntomas y su intensidad varían de un individuo a otro, aunque se trate del mismo brote (Bibek, R. y colaboradores 2010).

3.3.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Se trata de una bacteria Gram negativa, flagelada y de forma bacilar. Este microorganismo es anaerobio facultativo. *Escherichia coli* es una peligrosa bacteria que constituye parte normal de la microbiota residente en el tracto intestinal de los seres humanos, animales de sangre caliente y aves. En virtud de que generalmente se encuentra presente en muy altos niveles (millones por gramo del intestino delgado), durante mucho tiempo se ha usado como índice de posible contaminación fecal del organismo y para determinar la presencia de patógenos en el agua y los alimentos. (Bibek, R. y colaboradores, 2010).

Las cepas patogénicas de *E. coli* se pueden clasificar en diferentes patotipos y cada uno de ellos causa una enfermedad distinta. Todos los patotipos pueden ser divididos en dos grandes grupos: La *E. coli* patogénica intestinal y la *E. coli* patogénica extraintestinal. La *E. coli* patogénica intestinal no solamente coloniza el intestino humano, ella también puede causar enfermedades del intestino delgado desde diarrea leve hasta colitis severa y disentería. La *E. coli* patogénica extraintestinal reside en el intestino asintóticamente pero puede causar infecciones severas alcanzando nichos extraintestinales como el tracto urinario o torrente sanguíneo (Bibek, R. y colaboradores, 2010).

La *E. coli* enteropatógena agrupa varios patotipos, que incluyen *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), y *E. coli* con adherencia difusa (DAEC) y la cepa de *E. coli* adherente invasiva (AIEC) involucrada en la enfermedad de Crohn's. La *E. coli* O157:H7 es otra cepa de esta familia que se descubrió en 1982 y es la causante de la diarrea hemorrágica intensa y del síndrome urémico hemorrágico en seres humanos (SUH) (Shpigel, N. Y. y colaboradores, 2008).

3.3.3 *Salmonella* entérica serotipo Typhimurium

Las *Salmonellae* son un grupo de bacterias móviles Gram negativas que son patógenas para humanos y otros animales, son anaerobios facultativos presentando las dos rutas metabólicas, la oxidativa y la fermentativa. Son parásitos intestinales, intracelulares en una variedad de hospederos vertebrados y también pueden persistir en otros hábitats, incluyendo plantas y cursos de agua.

Salmonella es un microorganismo invasivo que causa infecciones en el ser humano, conocidas como salmonelosis. Este proceso se da en muchos países y afecta sobre todo a los individuos más jóvenes y más ancianos. Aunque se asume que la dosis infectiva de *Salmonella* es alta, la ingesta de solamente 1 a 10 células puede desencadenar la infección. La bacteria invasiva *Salmonella* entérica serovar Typhimurium posee un sistema que media la transferencia de proteínas efectoras desde la bacteria hacia las células del hospedero. Una vez dentro del citoplasma celular, estos efectores alteran diversas funciones celulares (estructura del citoesqueleto, transducción de señales, expresión de citoquinas) para promover la supervivencia y replicación bacteriana (Yousef, A.E., 2006).

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se colectaron 1124 g de hojas sanas y maduras de *Bixa Orellana* L. (No. COL: 527644, Herbario Nacional Colombiano) en el jardín botánico Juan María Céspedes localizado en el corregimiento de Mateguadua, municipio de Tuluá. Posteriormente, el material vegetal se lavó con agua para eliminar impurezas, a continuación las hojas se lavaron con etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 0.5%, para limpiar y desinfectar. El exceso de agua se eliminó con toallas de papel estéril y se dejaron en un horno Thelco a una temperatura controlada de 38.1°C durante 60 horas. El material seco se pulverizó en un molino Arthur – Thomas #2 Wiley Mill de cuchillas. Se almacenó al vacío a 4°C.

4.2 REACTIVOS Y SOLVENTES

Para la extracción del material vegetal se empleó hexano, acetato de etilo, acetona, metanol y agua. Las fases móviles utilizadas en cromatografía fueron hexano, cloroformo, acetato de etilo, acetona, metanol. Estos solventes fueron grado analítico de Merck. Para las pruebas fitoquímicas se utilizó ácido acético, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido tánico, alcohol amílico, amoníaco, anhídrido acético, benceno, bicarbonato de sodio, cloruro férrico, cloruro de sodio, hidróxido de potasio, magnesio, peróxido de hidrógeno, subnitrato de bismuto, sulfato de magnesio, yodo, yoduro de potasio y zinc de Merck. Para realizar los ensayos de actividad antioxidante se empleó 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, 2,4,6-Tri(2-piridil)-1,3,5-triazina y cloruro de hierro hexahidratado de Sigma, ácido acético y acetato de sodio trihidratado de MOL Labs.

4.3 ANÁLISIS FITOQUÍMICO

Para el análisis fitoquímico, 50 g de material vegetal pulverizado se pusieron en contacto con metanol, en proporción 1:3 (masa:solvente) por un período de tres días. Posteriormente, se llevó a sonicación durante una hora a 28°C, utilizando un sonicador Branson 2510. Transcurrido este tiempo, se realizó filtración al vacío de este extracto. Al extracto obtenido, se le realizaron pruebas cualitativas para determinar los metabolitos presentes en las hojas de *Bixa orellana* L. El análisis fitoquímico se realizó siguiendo la metodología propuesta por Murillo, E. y colaboradores, 2008.

4.3.1 Saponinas

4.3.1.1 Prueba de espuma

A 1 mL del extracto etanólico en un tubo de ensayo, se le añadieron 9 mL de agua. Se tomó 1 mL de esta solución en un tubo de ensayo pequeño, se agitó vigorosamente por 30 segundos y se dejó en reposo durante 15 minutos. La espuma sobrenadante indica la presencia de saponinas en la muestra. La proporción de saponinas se mide de acuerdo a la altura de la espuma sobrenadante así:

Altura de menos de 5 mm = no se detectan saponinas.

Altura de 5-9 mm = contenido bajo.

Altura de 10-14 mm = contenido moderado.

Altura mayor de 15 mm = contenido alto.

4.3.1.2 Prueba de Hemólisis

Se tomaron 5 mL de sangre, se añadieron 50 mL de suero fisiológico 0.9%. Luego, se centrifugó por 3 minutos y se decantó el sobrenadante. Se repitió la operación y finalmente se suspendieron los glóbulos rojos en 100 mL de suero fisiológico 0.9%. Se agregaron 3 mL de esta suspensión a dos tubos de ensayo. Uno sirvió como blanco y el otro se mezcló con 3 mL del extracto etanólico. Se incubaron en baño maría por 3 minutos a 37°C. Si hay hemólisis, la prueba es positiva para saponinas.

4.3.1.3 CCD utilizando como revelador H_2SO_4

Se realizó cromatografía de capa delgada (CCD) con una gota de extracto utilizando como eluyente Hexano:Acetato de etilo, en proporción 1:1, y como revelador una solución de ácido sulfúrico en metanol, seguida de calentamiento. La presencia de manchas azules o azules violetas y zonas amarillas al visible son indicativo de la existencia de saponinas.

4.3.2 Polifenoles

4.3.2.1 Ensayo con el reactivo de Folin-Ciocalteu

En un tubo de ensayo se añadieron 0.5 mL del extracto, 5 gotas del reactivo de Folin-Ciocalteu y 2 gotas de Na_2CO_3 al 7.5%. En un segundo tubo sólo se depositó la mezcla de reactivos y se substituyó el volumen de extracto por agua destilada. La presencia de una coloración azul es indicativa de polifenoles. Los resultados se evalúan así:

Coloración amarilla: indica que no se detectaron fenoles.

Coloración verdosa: se detectaron fenoles en baja cantidad.

Coloración azul clara: se detectaron fenoles en cantidad moderada.

Coloración azul intensa: se detectaron fenoles en alta cantidad.

4.3.3 Taninos

4.3.3.1 Prueba con cloruro férrico

Se depositaron 0.5 mL del extracto metanólico en 5 tubos de ensayo pequeños; a cada uno se le añadieron 2 gotas de agua destilada obteniendo un color amarillo. Se dejó el tubo 1 como blanco, y se adicionaron gotas de cloruro férrico a los siguientes tubos así: una gota al tubo 2, dos gotas al tubo 3, tres gotas al tubo 4 y cuatro gotas al tubo 5. La caracterización de taninos se hace de acuerdo a la coloración observada, así:

No hay cambio significativo de color: no se detecta presencia de taninos.

Cambio en el color a azul, negro azulado: taninos pirogálicos (hidrosolubles).

Cambio de color a verde, azul verdoso, precipitado negro verdoso: taninos de tipo catecol (condensados).

4.3.3.2 Prueba de gelatina – sal

A un tubo de ensayo con 1 mL de extracto se le agregó 1 mL de solución acuosa de gelatina-sal, que contenía 0.2 g de gelatina por 2 g de sal en 20 mL de solución, se empleo como solución patrón ácido tánico al 10%. Esta solución la precipitan todos los taninos, incluso los pseudotaninos a altas concentraciones.

4.3.3.3 Prueba de sulfato de magnesio

0.5 mL del extracto se colocaron en un tubo de ensayo y se mezclan con 0.5 mL de etanol, se agitó y se agregó una solución de sulfato de magnesio al 30%. La presencia de catéquicos (condensados) hace que haya precipitación completa. Los taninos pirogálicos (hidrolizables) son precipitados.

4.3.4 Flavonoides

4.3.4.1 Prueba de Shinoda

A 1 mL de extracto se le añadieron 0.5 g de limaduras de magnesio y gotas de HCl hasta que terminó el desprendimiento de hidrógeno. Coloraciones rosada, roja, violeta, anaranjada son positivas para sustancias que posean en su estructura el núcleo de la γ - benzopirona, tales como: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, xantonas. Las isoflavonas, chalconas y auronas no dan coloración.

4.3.4.2 Prueba de Rosenhein

A 1 mL de extracto se le agregó la mitad del volumen de ácido clorhídrico concentrado. Se mezcló y calentó por 10 minutos a 90°C. Luego se enfrió y se agitó con 0.4 mL de alcohol amílico. En la fase amílica se debe observar una coloración de carmesí a rosado claro para considerar la prueba como positiva.

4.3.4.3 CCD utilizando como revelador vapores de amoníaco

Se realizó cromatografía de capa delgada (CCD) con una gota de extracto utilizando como eluyente Éter:Acetato de Etilo, en proporción 2:1 y como revelador vapores de amoníaco. Las antocianinas presentan coloración rojo, azul o púrpura dependiendo del pH y de la absorción en el UV. Los flavonoles y flavonas presentan coloración amarillo o marfil.

4.3.4.4 Prueba con H₂SO₄

Se tomó 0.5 mL del extracto y se le agregaron 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Cambios de color a amarillo y naranja son positivos para flavonas y flavonoles. Las chalconas y auronas dan coloración rojo o violeta.

4.3.5 Antraquinonas

4.3.5.1 Prueba con HCl/Zn

A 0.2 mL de extracto etanólico se le agregó zinc en polvo y 5 gotas de ácido clorhídrico concentrado. Coloraciones amarillas, rojas o púrpuras, indican la presencia de un grupo donador de electrones. Las antraquinonas tornan la solución amarilla.

4.3.5.2 Prueba de Bornträger – Krauss

0.3 g de material vegetal pulverizado, se dejaron en ebullición por 10 minutos con KOH al 5% y 1 mL de H₂O₂. Se dejó enfriar y se filtró. 5 mL del filtrado se acidularon con ácido acético y se agitaron en un embudo de separación con 10 mL de benceno. 2 mL del extracto bencénico se agitaron con 1 mL de una solución diluida de amoníaco. Las antraquinonas colorean de rojo la capa alcalina.

4.3.6 Alkaloides

Para las pruebas de alcaloides se utilizó un extracto ácido de las hojas, con el fin de evitar la interferencia de las clorofilas.

4.3.6.1 Prueba de Wagner

El extracto se llevó a sequedad, se le agregaron 10 mL de HCl concentrado y se calentó por 10 minutos. La solución resultante se filtró, y al filtrado se le agregaron gotas de una solución de yodo en yoduro de potasio. Las soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados marrón.

4.3.6.2 Prueba de Dragendorff

Se disolvieron 8 g de subnitrato de bismuto, $4[\text{Bi}(\text{NO}_3)(\text{OH})_2]\text{BiO}(\text{OH})$, en 20 mL de HNO_3 concentrado y se añadieron lentamente 27.2 g de KI en 50 mL de agua. Se enfrió y decantó para separar los cristales de nitrato de potasio, los cuales se diluyeron en 100 mL de agua. 5 gotas de éste reactivo se hicieron reaccionar con 1 mL del extracto ácido. La prueba es positiva para alcaloides si hay formación de precipitados de color rojo, naranja o marrón persistente por 24 horas.

4.3.7 Terpenos

4.3.7.1 Reacción de Lieberman-Burchard

Se colocó 1 mL del extracto en un crisol; se evaporó casi hasta sequedad, se dejó enfriar y se adicionaron 3 gotas de cloroformo. Se repartió la mezcla en dos tubos de ensayo, se secaron al aire, en uno de los tubos se adicionaron 3 gotas de anhídrido acético seguido por una gota de ácido sulfúrico concentrado, el otro se dejó como blanco.

Los cambios de color interpretarlos así:

Azul o verde: esteroides.

Rojo, rosado o violeta: triterpenos.

Amarillo pálido: esteroides o triterpenos saturados.

4.3.7.2 Reacción de Salkowski

0.5 mL del extracto se mezclaron con 1 mL de cloroformo, se dejó caer por las paredes del tubo 1 mL de ácido sulfúrico al 85%. La formación de colores amarillo o rojo se considera positivo para esta reacción. Si en la interfase se forma color azul, verde o violeta característica de los carotenoides, sirve para distinguirlos de otros pigmentos naturales, como las antocianinas.

4.4 EXTRACCIÓN

La extracción del material vegetal se llevó a cabo mediante extracción estacionaria por maceración con sonicación, empleando hexano y metanol como solventes. Posteriormente, al extracto de hexano se le realizó extracción líquido – líquido.

4.4.1 Extracción por maceración

Para la extracción del material vegetal, se utilizó el método de maceración con ayuda de un sonicador Branson 2510. En este método, 424.6341 g de material vegetal pulverizado se pusieron en contacto con hexano, en proporción 1:3 (masa:solvente). Después, se llevó a sonicación durante 20 minutos a 28°C. Transcurrido este tiempo, se realizó filtración al vacío de este extracto. Este proceso se hizo por cuadruplicado. El residuo sólido se extrajo con metanol y se repitió el procedimiento empleado con el hexano. Los extractos de hexano y metanol obtenidos fueron evaporados a sequedad en un rotaevaporador Heidolph Hei – VAP.

4.4.2 Extracción líquido – líquido

El extracto seco de hexano se disolvió en hexano para obtener la muestra líquida y para la separación se utilizó una mezcla Metanol:Agua (MeOH:H₂O) en proporción 1:1. El extracto se depositó en un embudo de separación y se adicionó la mezcla Metanol:Agua. La fase acuosa se aisló y la fase orgánica se dejó en el embudo para realizar nuevamente el proceso de extracción. Para este procedimiento se realizaron cuatro repeticiones. A la fase orgánica se le adicionó

sulfato de sodio anhidro como agente secante. Posteriormente, el extracto se evaporó a sequedad en un rotaevaporador Heidolph Hei – VAP.

4.5 SEPARACIÓN

El aislamiento de los metabolitos se realizó mediante cromatografía de columna (CC) utilizando sílica gel 60 Merck 230-240 mesh como fase estacionaria. Se definió la proporción de disolventes con polaridad creciente adecuada para separar los metabolitos de interés. Las fases móviles que se emplearon fueron hexano (Hex), acetato de etilo (AceOEt), acetona (Ace), metanol (MeOH). El seguimiento de las separaciones se realizó por cromatografía de capa delgada (CCD) con placas de sílica gel 60 GF254 Merck Kiesegel 0.25 mm de espesor e indicador fluorescente. Las placas se observaron con lámpara ultravioleta (UV) referencia UVGL – 58 Mineral Light Lamp Multiband 254 y 365 nm.

4.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS

La caracterización de los metabolitos se realizó mediante espectrometría de masas en un espectrofotómetro Shimadzu GCMS-QP2010, usando ionización por impacto electrónico a 70 eV con un analizador de cuadrupolo y una inyección en modo Split empleando helio como gas de arrastre. La temperatura de la columna inició en 40°C hasta 320°C a 10°C/min. Los espectros de masas obtenidos se compararon con los almacenados en las bases de datos NIST Chemistry WebBook y Wiley 7N2 (biblioteca del equipo).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron en el equipo Bruker-400 Ultrashield Advanced II, empleando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno y cloroformo-d (CDCl_3) como solvente. Los valores de δ están referenciados con respecto al pico de CDCl_3 (7.25 ppm en RMN^1H y 77 ppm en RMN^{13}C). Todos los equipos se encuentran ubicados en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad del Valle.

4.7 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los estudios de actividad biológica realizados a partir de los extractos de las hojas de *Bixa orellana* fueron para determinar actividad antioxidante y actividad bactericida.

La determinación de la actividad antioxidante se llevó a cabo por el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) donde la forma férrica del complejo hierro-tripiridiltriazina $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ se reduce a su forma ferrosa $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ adquiriendo una coloración azul cuando existen antioxidantes en la muestra. La actividad bactericida se evaluó a través del método CMI (Concentración Mínima Inhibitoria), donde se establecen las concentraciones del extracto que inhiben el crecimiento de las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium.

4.7.1 Actividad antioxidante

4.7.1.1 Ensayos FRAP

Los ensayos FRAP se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Benzie, I. F. F.; 1996.

4.7.1.1.1 Preparación del reactivo FRAP

El reactivo FRAP es una solución que contiene buffer de ácido acético – acetato de sodio a pH 3.6, FeCl_3 20 mM y 2,4,6-Tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) 10 mM en proporción 10:1:1, respectivamente. Se pesaron 1550 mg de acetato de sodio trihidratado y se adicionaron 8.0 mL de ácido acético glacial y se aforó a 500.0 mL con agua destilada ajustando la solución a pH 3.63. La solución se guardó a temperatura ambiente en un frasco ámbar.

Se diluyeron 270.0 mg de cloruro de hierro hexahidratado en 50 mL de agua destilada, para preparar una solución de concentración 20 mM. La solución presentó un color naranja intenso. Se conservó guardada a temperatura ambiente, en ausencia de luz.

Inicialmente se preparó una solución 40 mM de HCl, diluyendo 10 mL de HCl 0.1 M en un balón de 25.0 mL con agua destilada. Esta solución se utilizó como solvente del TPTZ. Posteriormente, se pesaron 32.1 mg de TPTZ y se aforaron a 10 mL con la solución de HCl 40mM. La solución presentó un color levemente azul translúcido. Esta solución se conservó a baja temperatura y en ausencia de luz hasta el momento de preparar el reactivo.

Las soluciones mencionadas anteriormente se mezclaron y se almacenaron a temperatura ambiente y en ausencia de luz hasta su utilización.

4.7.1.1.2 Extracción del material vegetal

Los extractos empleados se obtuvieron por el método de maceración con ayuda de un sonicador Branson 2510. Se tomaron 100 mg de material vegetal y se le adicionaron 10 mL de una mezcla Metanol:Agua (MeOH:H₂O) en proporción 1:1. Después, se llevó a sonicación durante 30 minutos a 28°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó en una centrífuga IEC International durante 20 minutos a 1200 rpm y se realizó filtración al vacío de este extracto. Este procedimiento se realizó una sola vez. Al residuo, se le realizó una segunda extracción con 10 mL de una mezcla Acetona:Agua (Ace:H₂O) en proporción 7:3. Después, se llevó a sonicación durante 30 minutos a 28°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó durante 20 minutos a 120 rpm y se realizó filtración al vacío de este extracto. Este procedimiento se realizó una sola vez.

4.7.1.1.3 Método FRAP

A 50 µL de extracto (MeOH:H₂O y Ace:H₂O, por separado) se le adicionaron 1.3 mL del reactivo FRAP y 130 µL de agua. Transcurridos 30 minutos se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-vis 1700 a una longitud de onda de 593 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada extracto obtenido (Metanol:Agua y Acetona:Agua).

Tabla 3. Concentraciones de α -tocoferol empleadas en la curva de calibración

Concentración (μ M)	
1	97.5
2	260
3	283
4	399
5	478
6	492
7	604
8	836
9	994

La curva de calibración se realizó a partir de α -tocoferol, recomendado como un estándar alimenticio apto para reportar valores de importancia nutricional. El α -tocoferol se diluyó en acetona pura, en un rango de concentraciones entre 100 – 1000 μ M. Las concentraciones empleadas en la construcción de la curva de calibración se encuentran en la Tabla 3. Para cada concentración se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-vis 1700 a una longitud de onda de 593 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado.

4.7.2 Actividad bactericida

Se realizaron estudios de actividad biológica *In vitro* con las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Escherichia coli* para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de las hojas de *Bixa orellana*.

4.7.2.1 Microorganismos utilizados

Se utilizaron las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, de Microbiologics. La bacteria *Escherichia coli* serotipo O157:H7 fue donada, y pertenece al banco de cepas del Laboratorio de Microbiología, Facultad de Salud de la Universidad del Valle.

4.7.2.2 Preparación del medio de cultivo Agar Triptona y Soja

Se disolvieron 40 g de Agar Triptona y Soja marca Scharlau, en 1000 mL de agua destilada ajustada a pH 7.0 utilizando NaOH 1N o HCl 1N, el medio permaneció en inmersión durante 15 minutos con la finalidad de permitir una hidratación total de las moléculas, lo cual facilita su disolución, luego se calentó hasta ebullición; posteriormente, se esterilizó en autoclave horizontal Eastern, a 1.5 Kg/cm² de presión de vapor, proporcionando una temperatura de 121°C, con un tiempo de permanencia en autoclave de 20 minutos, después de enfriarse a 45-50°C, bajo cabina de flujo laminar fue vertido aproximadamente 20 mL del medio en cajas de Petri plásticas estériles de 90x15 mm, dejándolo solidificar y en prueba de esterilidad durante 24 horas. Antes de su utilización, el medio contenido en las cajas Petri fue secado con la finalidad de eliminar el exceso de agua en la superficie y así, evitar la mezcla de las colonias en el momento de realizar la siembra. Este secado de la superficie del agar también previene la contaminación y fue llevado a cabo en la estufa incubadora a 37°C durante 20 minutos, quitando la tapa de la caja Petri y colocando el medio con la superficie hacia abajo.

4.7.2.3 Recuperación y preservación de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas ATCC *Staphylococcus aureus*, *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium, *Escherichia coli*, y la bacteria *Escherichia coli* serotipo O157:H7 fueron preservadas utilizando el Sistema Cryobank de Laboratorios Copan. Cada criovial contiene perlas de cerámica de colores rojo, amarillo, verde y azul suspendidas en una solución criogénica compuesta por Buffer Fosfato Salino suplementado con sacarosa, glicerol y peptona.

Los cultivos puros de cada una de las bacterias se obtuvieron al sembrar por estrías en tres fases sobre las placas con Agar Triptona y Soja marca Scharlau, estos fueron incubados a una temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 horas y fueron preservados inoculando con asa estéril varias colonias en cada uno de los viales que contienen la solución criogénica. El vial fue agitado e invertido varias veces para mezclar la suspensión de cada una de las bacterias, permitiendo así su adherencia a las perlas de cerámica. Posteriormente, se procedió a extraer la solución criogénica del tubo Cryobank y cada uno de los tubos que contenía las bacterias adheridas a las perlas fue almacenado a una temperatura de -70°C , teniendo en cuenta un color para cada una de los microorganismos.

4.7.2.4 Preparación de los inóculos bacterianos

Para preparar las suspensiones de cada uno de los microorganismos se utilizó el método directo, el cual consiste en partir de cultivos puros de las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium, *Escherichia coli* y *Escherichia coli* serotipo O157:H7; los cuales fueron obtenidos recuperando las cepas de los viales Cryobank, tomando con un asa de inoculación común una perla del tubo correspondiente a cada bacteria y realizando una siembra en estría en tres fases sobre la superficie de placas con Agar Triptona y Soja marca Scharlau, las cuales fueron incubadas a una temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas; con esta siembra se logró una buena separación de las células bacterianas obteniendo así colonias aisladas.

Se obtuvo un inóculo puro seleccionando cinco colonias bien aisladas, transfiriéndolas con un asa estéril a tubos conteniendo 3 mL de solución salina fisiológica estéril al 0.85% hasta lograr una suspensión turbia. El tamaño estándar del inóculo se logró calibrando las suspensiones bacterianas utilizando un espectrofotómetro a 625 nm hasta alcanzar una absorbancia de 0.1 ajustándolo al estándar 0.5 de McFarland, que proporcionó una densidad óptica comparable con la de una suspensión bacteriana de 1.5×10^8 UFC/mL. Posteriormente, como alternativa se comparó visualmente la turbidez de la suspensión de cada microorganismo con el estándar 0.5 de McFarland. Para facilitar la comparación a simple vista de la turbidez, se colocaron juntos la suspensión bacteriana y el tubo de McFarland observándolos contra un fondo con rayas negras. Los estándares de turbidez de McFarland se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Estándares de la escala de McFarland utilizados para calibrar el tamaño del inóculo bacteriano

Tubo	BaCl ₂ 1% (mL)	H ₂ SO ₄ 1% (mL)	Concentración bacteriana UFC/mL
0.5	0.05	9.95	1.5x10 ⁸
1	0.1	9.9	3.0x10 ⁸
2	0.2	9.8	6.0x10 ⁸
3	0.3	9.7	9.0x10 ⁸
4	0.4	9.6	12.0x10 ⁸
5	0.5	9.5	15.0x10 ⁸
6	0.6	9.4	18.0x10 ⁸
7	0.7	9.3	21.0x10 ⁸
8	0.8	9.2	24.0x10 ⁸
9	0.9	9.1	27.0x10 ⁸
10	1.0	9.0	30.0x10 ⁸

Fuente: Gamazo, C. y colaboradores, 2005

4.7.2.5 Preparación de los medios de cultivo. Medio líquido (caldo Mueller-Hinton) y Agar Mueller Hinton

Para preparar el caldo Mueller Hinton marca Scharlau se disolvieron 21 g del medio deshidratado en 1000 mL de agua destilada ajustada a pH 7.0 utilizando NaOH 1N o HCl 1N, dejándolo inmerso durante 15 minutos permitiendo una hidratación total de las moléculas, lo cual facilita su disolución, luego se calentó hasta ebullición; posteriormente, se esterilizó en autoclave horizontal Eastern, a 1.5 Kg/cm² de presión de vapor, proporcionando una temperatura de 121°C, con un tiempo de permanencia en el autoclave de 20 minutos, antes de utilizarlo el medio líquido se dejó en prueba de esterilidad durante 24 horas.

Para preparar el agar Mueller Hinton marca Scharlau se disolvieron 38 g de Agar en 1000 mL de agua destilada ajustada a pH 7.0 utilizando NaOH 1N o HCl 1N, el medio permaneció inmerso durante 15 minutos con la finalidad de permitir una hidratación total de las moléculas, lo cual facilita su disolución, luego se calentó hasta ebullición; posteriormente, se esterilizó en autoclave horizontal Eastern, a 1.5 Kg/cm² de presión de vapor, proporcionando una temperatura de 121°C, con un tiempo de permanencia en el autoclave de 20 minutos, después de enfriarse a 45-50°C, bajo cabina de flujo laminar fue vertido aproximadamente 20 mL del

medio en cajas de Petri plásticas estériles de 90x15mm, dejándolo solidificar y en prueba de esterilidad durante 24 horas. Antes de su utilización el medio contenido en las cajas Petri fue secado con la finalidad de eliminar el exceso de agua en la superficie, evitando la coalescencia y mezcla de las colonias, al realizar la siembra. Este secado de la superficie del agar también previene la contaminación; y fue llevado a cabo en la estufa incubadora a 37°C durante 20 minutos, quitando la tapa de la caja Petri y colocando el medio con la superficie hacia abajo.

4.7.2.6 Obtención del rango de concentraciones de los extractos de hoja de *Bixa orellana* L.

Los rangos de concentraciones de los extractos de hoja de *Bixa orellana* L. fueron logrados mediante una serie de diluciones utilizando para la concentración inicial los diluyentes: Tween 20 esterilizado en autoclave horizontal Eastern, a 1.5 Kg/cm² de presión de vapor, proporcionando una temperatura de 121°C, con un tiempo de permanencia en autoclave de 20 minutos.

Para el extracto de hexano de las hojas de *Bixa orellana* se pesaron 100 µg de extracto y se disolvieron en 1mL de Tween 20 logrando la primera concentración 100 µg/mL; la segunda concentración 50 µg/mL se obtuvo realizando una dilución doble, transfiriendo 100µL de la concentración inicial a un tubo eppendorf estéril que contenía 100 µL de caldo Mueller Hinton marca Scharlau; de la segunda concentración se transfirieron 90 µL a un tubo eppendorf estéril que contenía 10 µL de caldo Mueller Hinton marca Scharlau obteniéndose la tercera concentración 45 µg/mL. Las concentraciones 40 µg/mL, 35 µg/mL, 30 µg/mL, 25 µg/mL, 20 µg/mL, 15 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 4.5 µg/mL también se obtuvieron a partir de la segunda concentración 50 µg/mL utilizando diferentes volúmenes de caldo Mueller Hinton marca Scharlau.

4.7.2.7 Método de microdilución en caldo y determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Todas las pruebas de sensibilidad bacteriana se realizaron por triplicado.

Para la obtención del panel de extracto seco de las hojas se prepararon 11 tubos eppendorf. Se agregó a cada uno 90 µL de las concentraciones adecuadas en un rango de mayor a menor y que fueron preparadas por diluciones apropiadas en el caldo Mueller Hinton marca Scharlau. Inmediatamente cada uno de los 11 tubos

eppendorf fueron inoculados por separado con 10 μL de las suspensiones correspondientes a cada una de las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* entérica serotipo Typhimurium, *Escherichia coli* y *Escherichia coli* serotipo O157:H7; las cuáles fueron estandarizadas con la misma turbidez del estándar 0.5 de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL) alcanzando una concentración bacteriana final de 1.5×10^7 UFC/mL en cada uno de los tubos eppendorf; asegurando que el extracto fuera probado con cada bacteria.

Posteriormente, los tubos eppendorf con las diferentes concentraciones de los extractos de hexano de las hojas de *Bixa orellana* y después de sembrados, se incubaron en condiciones que optimizaron el crecimiento bacteriano y no interfirieron en la actividad antibacteriana. Para cada una de las bacterias probadas las condiciones de incubación fueron: *Staphylococcus aureus*, temperatura de 30-35°C en aerobiosis, durante 24 horas; *Salmonella* entérica serotipo Typhimurium, *Escherichia coli* y *Escherichia coli* serotipo O157:H7 a una temperatura de 35°C en aerobiosis, durante 16-20 horas. Se incluyeron como controles un tubo eppendorf estéril con 90 μL de caldo Mueller Hinton marca Scharlau que no contenía extracto (control de crecimiento de las bacterias); un tubo eppendorf estéril con 90 μL del diluyente utilizado en la preparación de la concentración inicial de los extractos de hoja (control de crecimiento bacteriano en el diluyente) y un tubo eppendorf estéril con 90 μL de extracto sin sembrar (control de esterilidad del extracto).

De cada uno de los tubos eppendorf conteniendo las diferentes concentraciones de los extractos de hojas, inoculados e incubados en las condiciones específicas para cada bacteria, se realizaron siembras con un asa estéril distribuyéndolas en cajas de Petri con Agar Mueller-Hinton marca Scharlau, teniendo en cuenta los controles. Los medios sembrados fueron incubados en aerobiosis; a una temperatura de 30- 35°C durante 24 horas para la bacteria *Staphylococcus aureus* y una temperatura de 35°C durante 16-20 horas para las bacterias *Salmonella* entérica serotipo Typhimurium, *Escherichia coli* y *Escherichia coli* serotipo O157:H7. Este procedimiento permitió determinar la Concentración Inhibitoria Mínima del extracto de hojas y verificar si hubo o no contaminación externa.

En la figura 11 se observa el diagrama de la metodología empleada para la extracción de los metabolitos mayoritarios presentes en las hojas de *Bixa orellana*.



Figura 11. Metodología empleada para la extracción de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las hojas de *Bixa orellana*

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL EXTRACTO

Se colectaron 1124 g de hojas sanas y maduras. Después del secado el peso del material vegetal fue 496 g. Al finalizar la extracción se obtuvieron 33.75 g de extracto de hexano y 32.66 g de extracto de metanol. Después de la evaluación gravimétrica se determinó que el rendimiento de la extracción fue 6.80 % para el extracto de hexano y 6.58 % para el extracto de metanol (Figura 12). Los extractos de hexano presentaron color amarillo oscuro y los extractos de metanol color verde oscuro, ambos extractos tenían consistencia viscosa. Los extractos de hexano y metanol se rotularon como ExHBoHex y ExHBoMeOH, respectivamente.

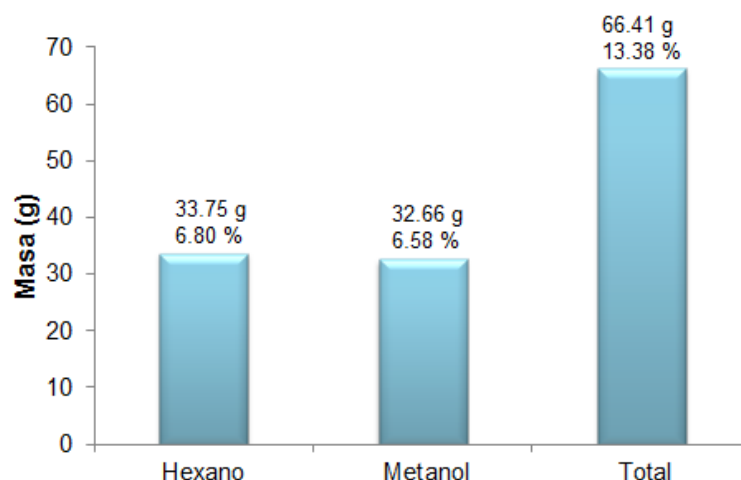


Figura 12. Rendimiento de la extracción

5.2 ANÁLISIS FITOQUÍMICO

5.2.1 Saponinas

La prueba de hemólisis realizada precipitó de forma inmediata los glóbulos rojos y oscureció la solución. Esto indica la presencia de saponinas, ya que estas destruyen los eritrocitos en la sangre, observándose precipitado. La cromatografía de capa delgada (CCD) realizada para la determinación de saponinas, mostró poca separación de los compuestos con la fase móvil utilizada (Hexano:Acetato de

etilo, 1:1) y se observaron tres colores a una longitud de onda de 366 nm, verde, naranja y amarillo. Al utilizar el revelador de vainillina al 1% seguido de ácido sulfúrico al 5%, y después de calentar, se observaron cambios de color a amarillo, azul y azul violeta lo que indicó la presencia de saponinas.

5.2.2 Taninos

En la prueba de cloruro férrico (FeCl_3) se observó un cambio de color de amarillo a café verdoso, debido a la formación de un complejo de hierro como se muestra en la Figura 13 y la formación de un precipitado de color café. Este resultado indica la presencia de taninos tipo catecol condensados. En la prueba de gelatina-sal, se observó la formación de precipitados, debido a que los taninos precipitan las proteínas de sus soluciones. Con estas dos pruebas se confirma la presencia de taninos en el extracto. La prueba con sulfato de magnesio demuestra que en la solución se encuentran taninos catéquicos o condensados, que son totalmente precipitados.

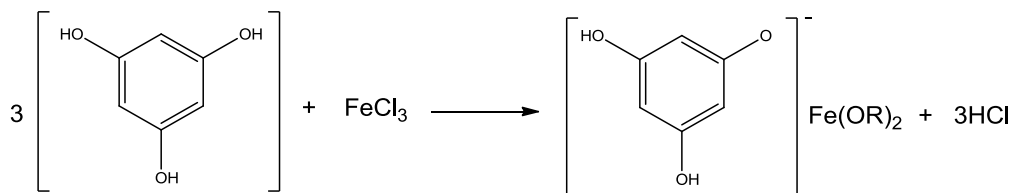


Figura 13. Reacción de un tanino con FeCl_3

5.2.3 Flavonoides

La prueba de Shinoda para flavonoides realizada al extracto, dio como resultado una coloración roja, intensificando su coloración hasta café. Después de transcurrida una hora desapareció la coloración. Las coloraciones entre rojo, naranja y amarillo se interpretan como positivas para flavonas y flavonoles. El MgCl_2 , que es el compuesto obtenido durante la reacción (Figura 14), forma complejos con los flavonoides dando coloraciones características y el magnesio divalente intensifica la coloración por estar doblemente coordinado.

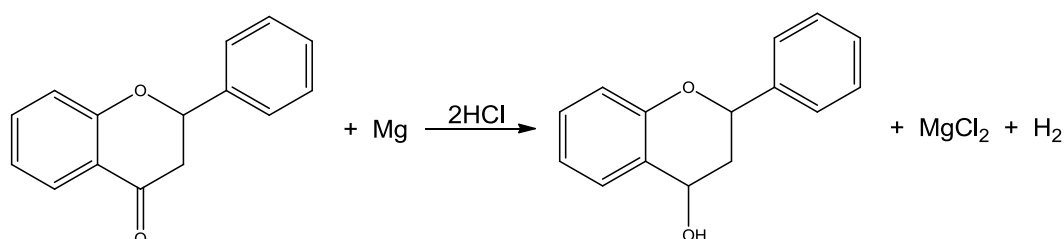


Figura 14. Reacción de Shinoda

En la prueba con ácido sulfúrico se apreció un oscurecimiento de la solución, que se interpretó como positivo para flavonas y flavonoles. La CCD utilizando como revelador vapores de amoníaco y ácido clorhídrico, fue negativa en ambos casos debido a que estos compuestos no son mayoritarios en el extracto.

5.2.4 Antraquinonas

Las antraquinonas se encuentran principalmente en tallos y raíces, por lo que no se esperaba la presencia de estos compuestos en las hojas, como se demuestra con la prueba de Bornträger-Krauss. En cambio, la reacción con HCl/Zn, (Figura 15), da positiva con coloraciones que van de naranja a rojo. La reacción ocurre cuando los grupos carbonilos son reducidos. Sin embargo, este grupo se encuentra en otros compuestos como los flavonoides, por lo que no es una prueba exclusiva y no es determinante de la presencia de antraquinonas.

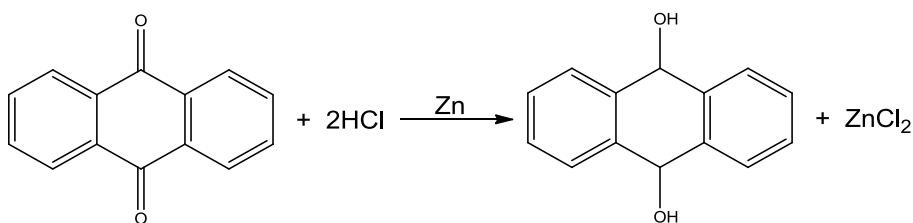


Figura 15. Reacción de antraquinonas con HCl/Zn

5.2.5 Alcaloides

Para la determinación de alcaloides se utilizó una solución ácida de las hojas, para facilitar la observación de los cambios de color. La prueba de Wagner fue positiva, generándose un precipitado de color café.

La presencia de estos precipitados al hacer reaccionar el extracto con el reactivo de Dragendorff fue positiva ya que se formó precipitado de color rojo oscuro que persistió al cabo de 24 horas.

5.2.6 Terpenos

Se evaluó la presencia de terpenos en el extracto, por medio de la prueba de Lieberman-Burchard. En esta se produjo una coloración inicial azul oscuro, evidenciando la presencia de terpenos, que fue confirmada por medio de la prueba de Salkowski al observarse una capa rojiza traslúcida en la solución. La coloración observada se debe a la deficiencia de electrones del anhídrido acético, que es compensada por los electrones de los dobles enlaces conjugados. Es una reacción utilizada para determinar la presencia de esteroides que contienen enlaces conjugados adyacentes a un grupo hidroxilo. Esta reacción debe ocurrir en un medio totalmente anhidro para que moléculas de agua no reaccionen con el anhídrido acético, anulando la reacción.

Los resultados del análisis fitoquímico preliminar se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de las pruebas fitoquímicas de las hojas de *Bixa orellana*

Grupo	Prueba	Resultados*
Saponinas	Espuma	–
	Hemólisis	+
	Vainillina – H ₂ SO ₄	+
Polifenoles	Folin-Ciocalteu	+
Taninos	Cloruro férrico	+
	Gelatina – sal	+
	Acetato de Mg	+
Flavonoides	Shinoda	+
	Rosenhein	+
	Cloruro férrico	+
	H ₂ SO ₄	+
Antraquinonas	HCl/Zn	+
	Bornträger – Krauss	–
Alcaloides	Wagner	+
	Dragendorff	+
Terpenos	Lieberman – Burchard	+
	Salkowski	+

*+: Positivo. –: Negativo

5.3 EXTRACCIÓN LÍQUIDO – LÍQUIDO

Para la extracción líquido-líquido se empleó el extracto ExHBoHex. Esta técnica se utilizó para fraccionar los extractos de hexano y facilitar el proceso de separación mediante cromatografía de columna. Al finalizar la extracción se obtuvo una fase acuosa de color amarillo claro y una fase orgánica de color amarillo oscuro. La fase orgánica fue evaporada a sequedad, obteniendo 10.65 g de extracto (rótulo: ExFOELL). La CCD mostró que la fase orgánica presentaba una mezcla de compuestos; por lo tanto, se escogió esta fase para realizar la separación.

5.4 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO DE HEXANO

Se realizó separación cromatográfica a EXFOELL empleando 10.65 g de extracto. Se obtuvieron 30 fracciones denominadas C1F1 a C1F30. La separación cromatográfica fue monitoreada por CCD. De acuerdo a los cromatogramas obtenidos, se observó un pico mayoritario en las fracciones C1F1, C1F2 y C1F7; por lo tanto, para estas fracciones, se consideró únicamente la presencia de un metabolito secundario mayoritario. Al compuesto C1F2 se le realizó CG-EM y RMN. A los compuestos C1F1 y C1F7 solo se les realizó CG-EM. También la fracción C1F12 fue sometida a separación cromatográfica ya que tuvo un rendimiento de 27.09%. En la Tabla 6 se presentan las fracciones obtenidas con cada fase móvil empleada. El porcentaje de rendimiento de la extracción se representa en la Figura 16. Las fracciones C1F6 y C1F8 se evaporaron completamente.

Tabla 6. Fracciones obtenidas de la separación cromatográfica del extracto de hexano

Solvente	Fracción	Peso (g) ±0.0001	Código asignado	Rendimiento (%)
Hexano	1	1,8952	C1F1	17,80
	2	1,6769	C1F2	15,75
	3	0,2977	C1F3	2,80
	4	0,2797	C1F4	2,63
	5	0,9861	C1F5	9,26
	7	1.9212	C1F7	18.04
Hexano:Acetato de etilo (1:1)	9	0,8782	C1F19	8,25
	10	0,8319	C1F10	7,81
	11	0,0736	C1F11	0,69
	12	2,8851	C1F12	27,09
	13	0,0964	C1F13	0,91
	14	0,1098	C1F14	1,03
Acetato de etilo	15	0,5547	C1F15	5,21
	16	0,3703	C1F16	3,48
	17	0,1980	C1F17	1,86
	18	0,0959	C1F18	0,90
	19	0,0514	C1F19	0,48
Acetona	20	0,0375	C1F20	0,35
	21	0,0423	C1F21	0,40
	22	0,0144	C1F22	0,14
	23	0,0058	C1F23	0,05
	24	0,0055	C1F24	0,05
Metanol	25	0,0010	C1F25	0,01
	26	0,0029	C1F26	0,03
	27	0,0040	C1F27	0,04
	28	0,0056	C1F28	0,05
	29	0,0044	C1F29	0,04
	30	0,0021	C1F30	0,02

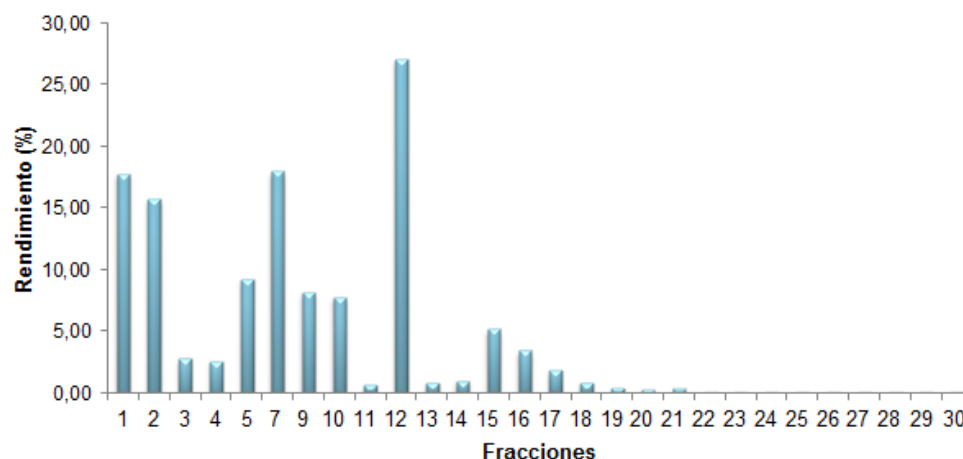


Figura 16. Rendimiento de las fracciones obtenidas por CC del extracto de hexano

5.5 IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EXTRACTO DE HEXANO DE LAS HOJAS DE *Bixa orellana*

Las fracciones C1F1, C1F2 y C1F7 se analizaron por espectrometría de masas. La fracción C1F2 se analizó también por resonancia magnética unidimensional (RMN¹H y RMN¹³C) y bidimensional (HMBC y HSQC).

5.5.1 Análisis de la fracción C1F1

El compuesto **1** fue obtenido como un aceite azul. El perfil cromatográfico muestra un pico mayoritario con un tiempo de retención de 11.390 minutos y un porcentaje de área de 15.07 (Figura 17). En el espectro de masas (Figura 20) se observa el pico base a m/z 128 y éste es el mismo pico correspondiente al ion molecular cuya fórmula es C₁₀H₈.

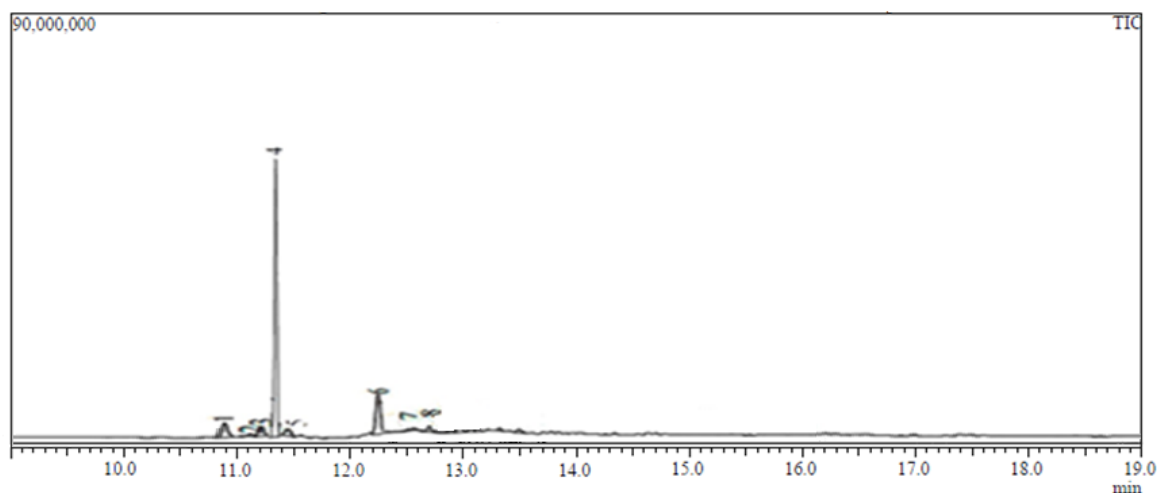


Figura 17. Perfil cromatográfico de la fracción C1F1

El compuesto sugerido por la base de datos del equipo y por comparación de su espectro con el de la base de datos NIST Chemistry WebBook corresponde al aromático azuleno (Figura 18).

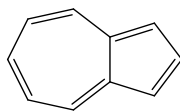


Figura 18. Estructura propuesta del compuesto 1

El ion molecular es el pico base a m/z 128 debido a la estabilidad del catión-radical formado (resonancia). El ion molecular sufre la eliminación de una molécula de acetileno originando un fragmento a m/z 102, este puede reorganizarse para perder el formar el catión con m/z 51 (Figura 19).

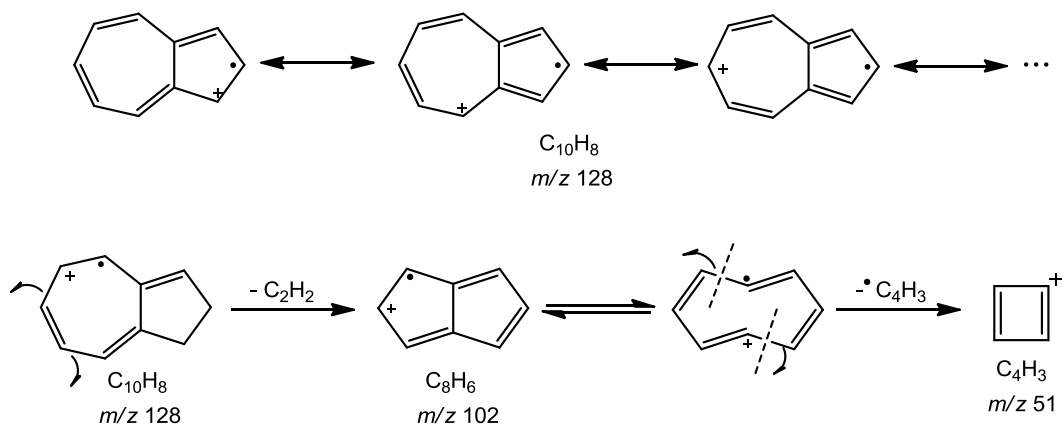


Figura 19. Fragmentación propuesta para el compuesto 1

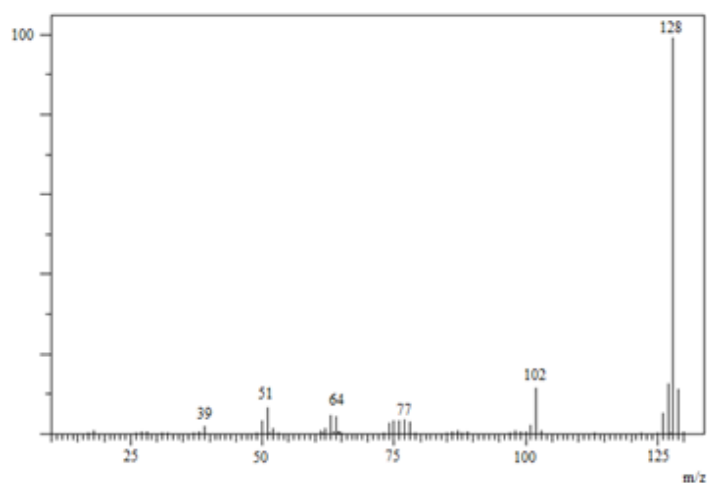


Figura 20. Espectro de masas del compuesto **1**

5.5.2 Análisis de la fracción C1F2

El compuesto **2** fue obtenido como un sólido amorfo blanco. El perfil cromatográfico muestra un pico mayoritario con un tiempo de retención de 13.270 minutos y un porcentaje de área de 80.90 (Figura 21). En el espectro de masas por impacto electrónico (Figura 28) se observa el pico del ion molecular a m/z 204 que corresponde a la fórmula $C_{15}H_{24}$.

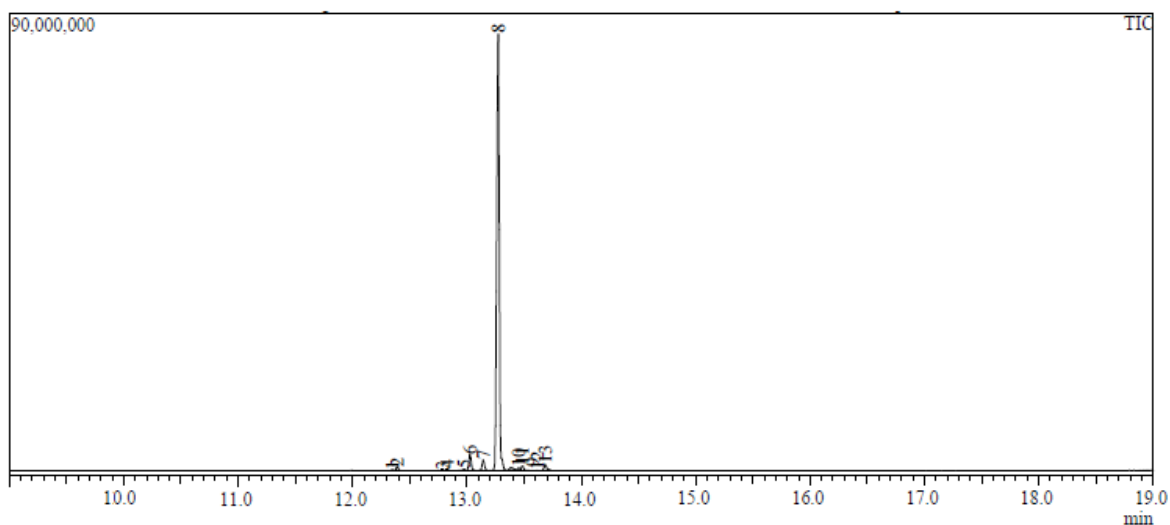


Figura 21. Perfil cromatográfico de la fracción C1F2

La estructura del compuesto **2** fue identificada mediante RMN¹H, RMN¹³C, DEPT 135, HMBC y HSQC (Figura 28) y corresponde al sesquiterpeno α -guaiano.

En el espectro de RMN¹H se observan señales que integran para 24 protones. Las señales a 1.09 y 1.11 ppm integran para tres protones cada uno y corresponden a los protones de las posiciones 11 y 12 (d, 3H, CH₃), a 1.19 y 1.31 ppm (t, 2H, H4), a 1.43 ppm (t, 1H, H5), a 1.45 ppm (t, 1H, H9), a 1.80 ppm (s, 3H, H15), a 1.96 ppm (t, 1H, H5), a 1.97 ppm (t, 1H, H9), a 2.01 ppm (d, 1H, H7), a 2.17 ppm (t, 1H, H6), a 2.22 ppm (t, 1H, H3), a 2.23 (d, 1H, H10), a 2.25 ppm (d, 1H, H7), a 2.31 ppm (d, 1H, H10), a 2.36 ppm (t, 1H, H8), a 4.92 y 5.11 ppm (s, 2H, H14) (Figura 22).

En el espectro de RMN¹³C (Figura 23) se observan 15 señales. Mediante el experimento DEPT-135 (Figura 24) se determinó que las señales a 127.95, 139.30 y 144.71 ppm corresponden a carbonos cuaternarios en las posiciones 1, 2 y 13 respectivamente. La señal en fase negativa a 110.64 ppm corresponde a un grupo metileno terminal (=CH₂) de la posición 14, también aparecen cinco señales en fase negativa que corresponden a carbonos metilénicos a 31.88 (C5), 33.62 (C10), 35.66 (C4), 35.85 (C7) y 36.47 (C9) ppm. A 38.68, 41.22 y 43.94 ppm se observan tres señales correspondientes a los carbonos de las posiciones 3, 8 y 6 respectivamente. Se observan tres señales a 19.86, 20.10 y 21.31 ppm que corresponden a carbonos primarios ubicados en las posiciones 12, 11 y 15 respectivamente.

El espectro HSQC (Figuras 25 y 26) muestra las correlaciones a entre el carbono y el hidrógeno unido directamente a él. Los protones del grupo metileno terminal a 4.92 y 5.11 ppm se correlacionan con el carbono a 110.64 ppm. Se estableció la correlación entre los carbonos e hidrógenos de los tres grupos metilo (C12 a 19.86 ppm con H12 a 1.09 ppm; C11 a 20.10 ppm con H11 a 1.11 ppm; C15 a 21.31 ppm con H15 a 1.80 ppm). Los protones a 1.19 y 1.31 ppm están unidos al carbono 4 a 35.66 ppm. Los protones a 1.43 y 1.96 ppm están unidos al carbono 5 a 31.88 ppm. El protón a 2.17 ppm está unido al carbono 6 a 43.94 ppm.

El espectro HMBC (Figura 27) muestra las correlaciones a ²J y ³J entre el carbono y el hidrógeno y es fundamental para analizar la presencia de carbonos cuaternarios. El carbono 1 se identificó con una correlación a dos enlaces con el protón de la posición 8 y a tres enlaces con los protones del metilo de la posición 12. El carbono 2 se identificó por una correlación a dos enlaces con el protón del carbono 3 y con los protones del carbono 10 y a tres enlaces con los protones del

metilo en la posición 11. El carbono 13 se identificó por una correlación a dos enlaces con los hidrógenos del metileno terminal (C14) y con el protón del carbono 6, a tres enlaces con los protones del metilo en la posición 15.

En la Tabla 7 se muestran las asignaciones de las señales de RMN¹H y ¹³C para el compuesto **2**.

Tabla 7. Asignación de señales de RMN¹H y ¹³C para el compuesto **2**

Posición	RMN ¹ H (ppm)	RMN ¹³ C (ppm)	Posición	RMN ¹ H (ppm)	RMN ¹³ C (ppm)
1	–	127.95	9	1.45, 1.97	36.47
2	–	139.30	10	2.23, 2.31	33.62
3	2.22	38.68	11	1.11	20.10
4	1.19, 1.31	35.66	12	1.09	19.86
5	1.43, 1.96	31.88	13	–	144.71
6	2.17	43.94	14	4.92, 5.11	110.64
7	2.01, 2.25	35.85	15	1.80	21.31
8	2.36	41.22			

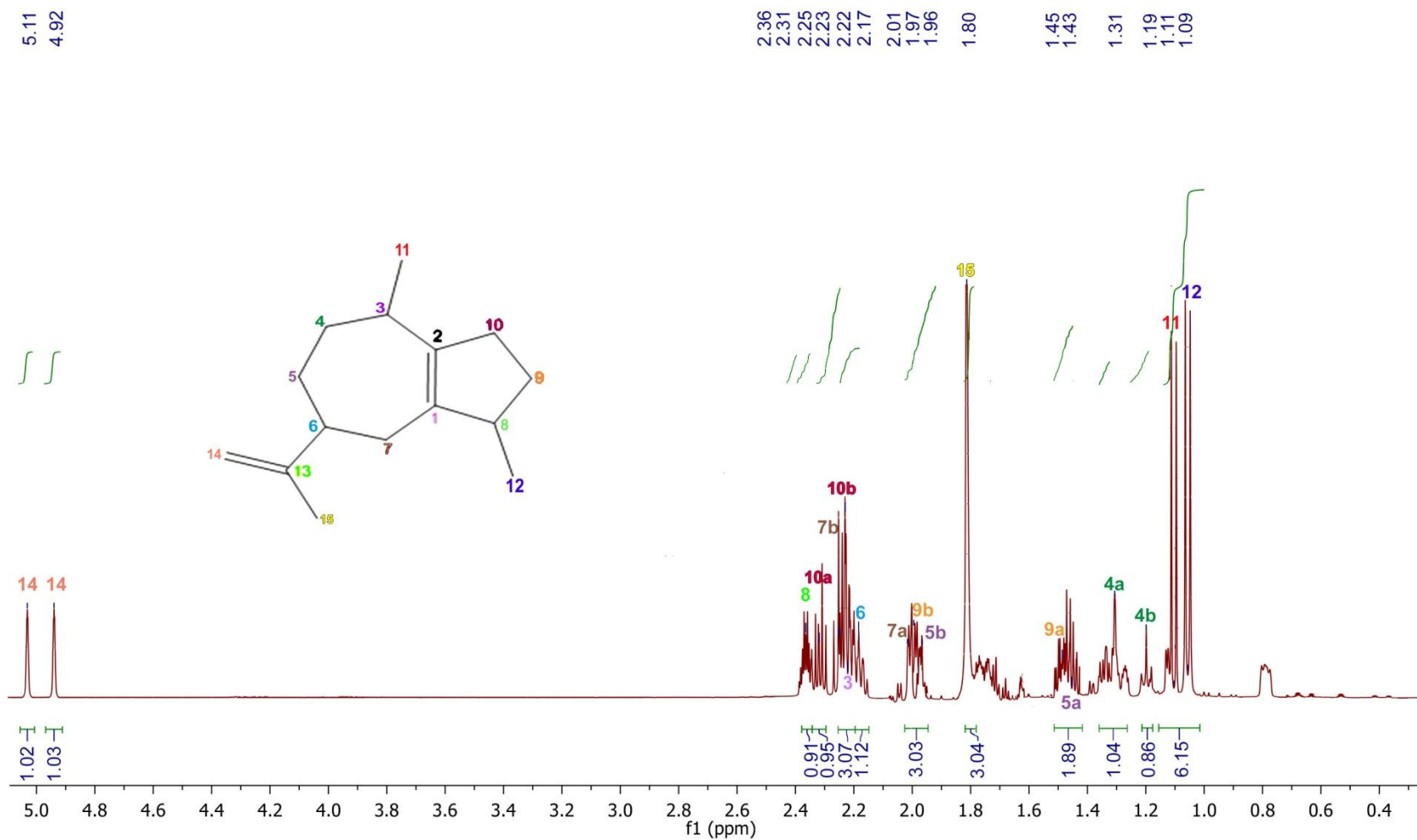


Figura 22. Espectro RMN ^1H del compuesto **2**

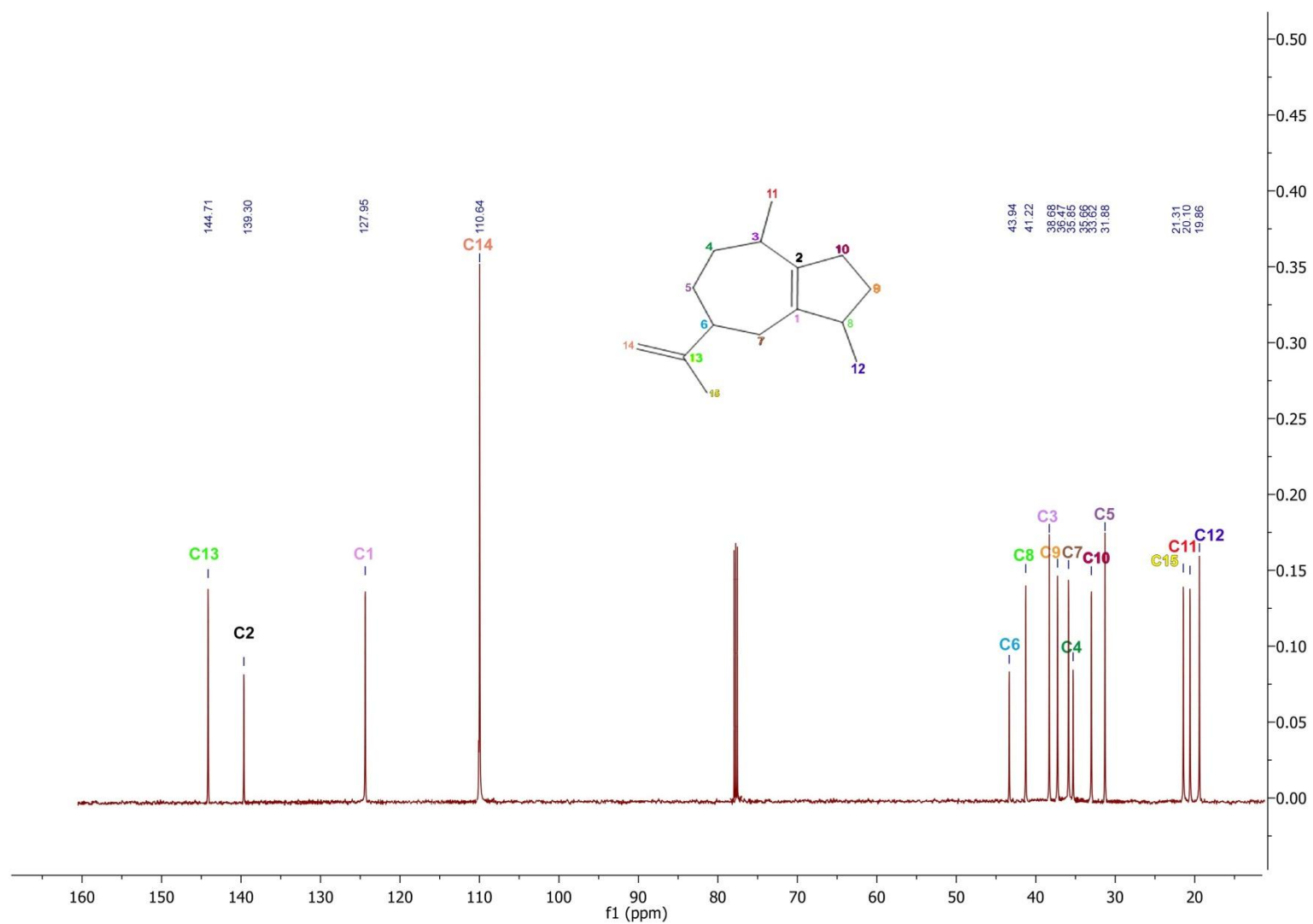


Figura 23. Espectro RMN ^{13}C del compuesto 2

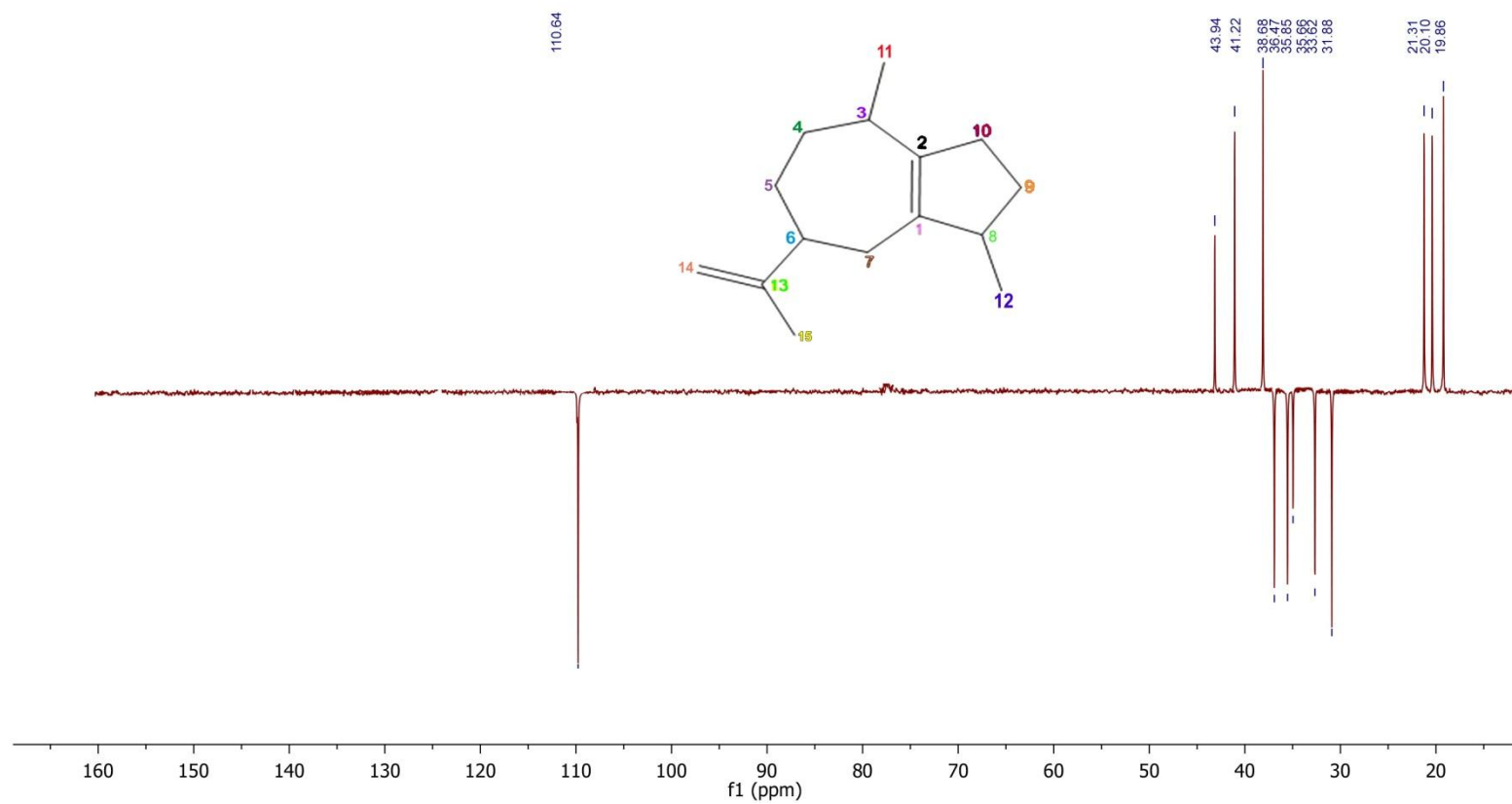


Figura 24. Espectro DEPT-135 del compuesto 2

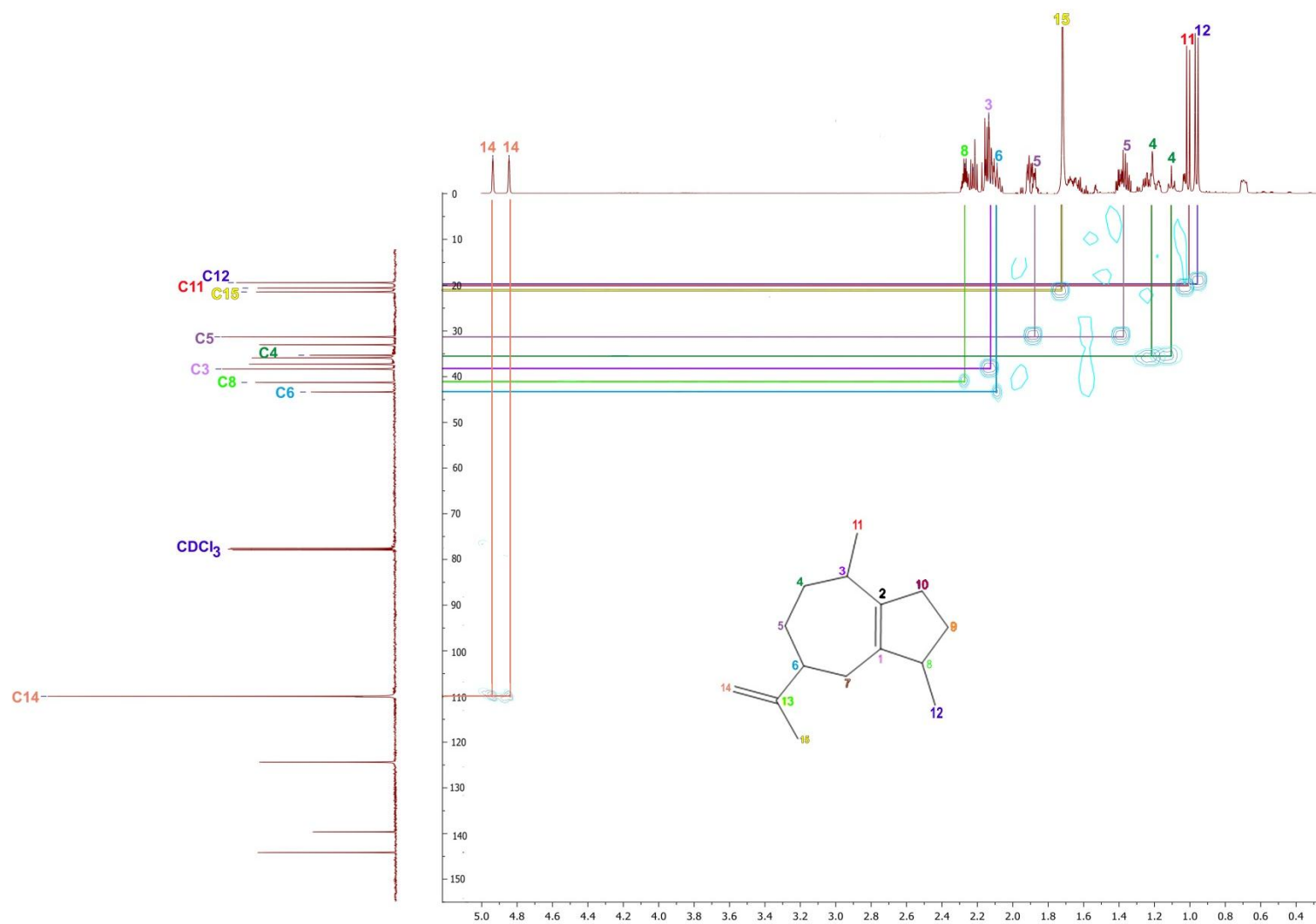


Figura 25. Espectro bidimensional HSQC del compuesto 2

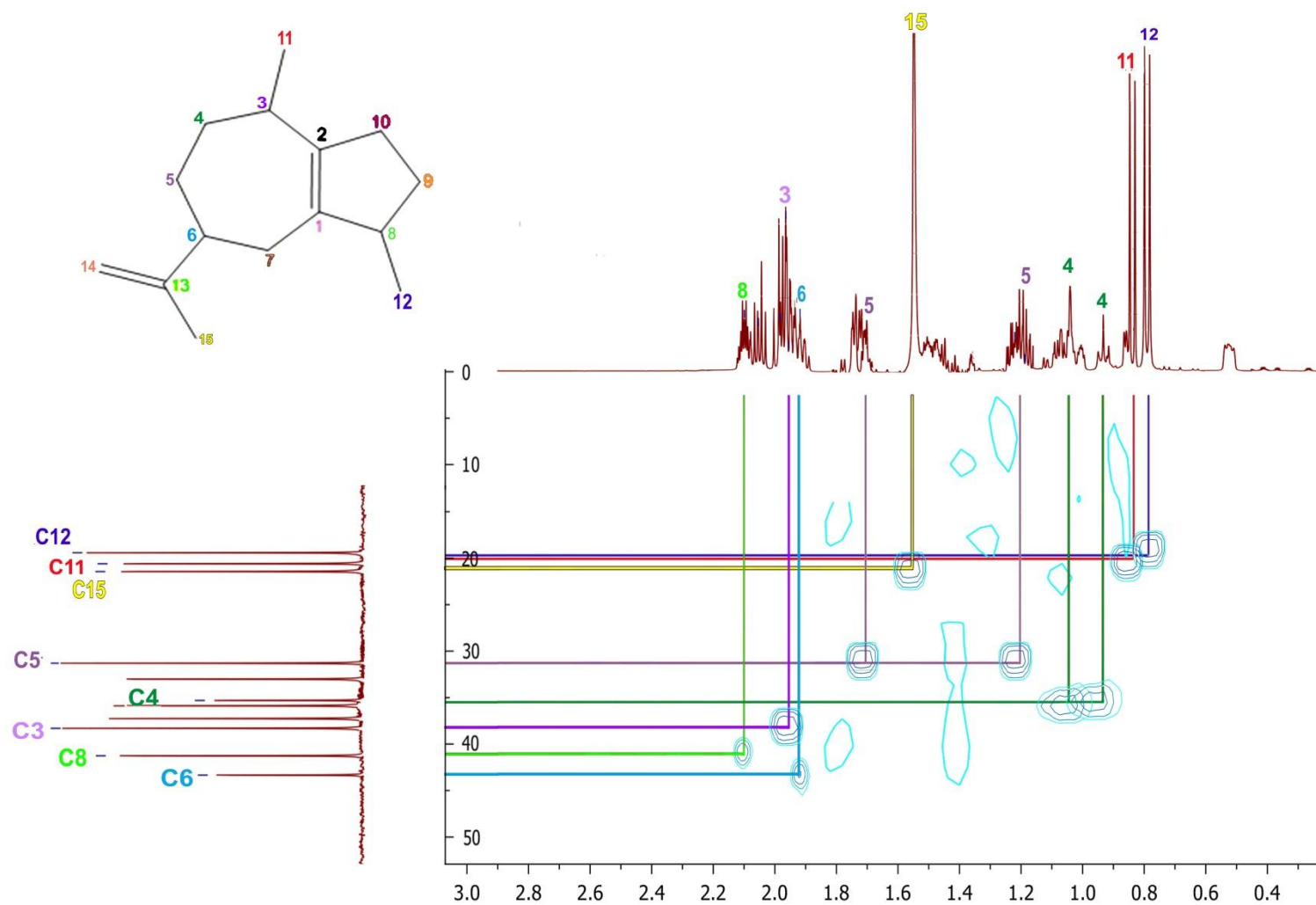


Figura 26. Expansión del espectro bidimensional HSQC del compuesto 2

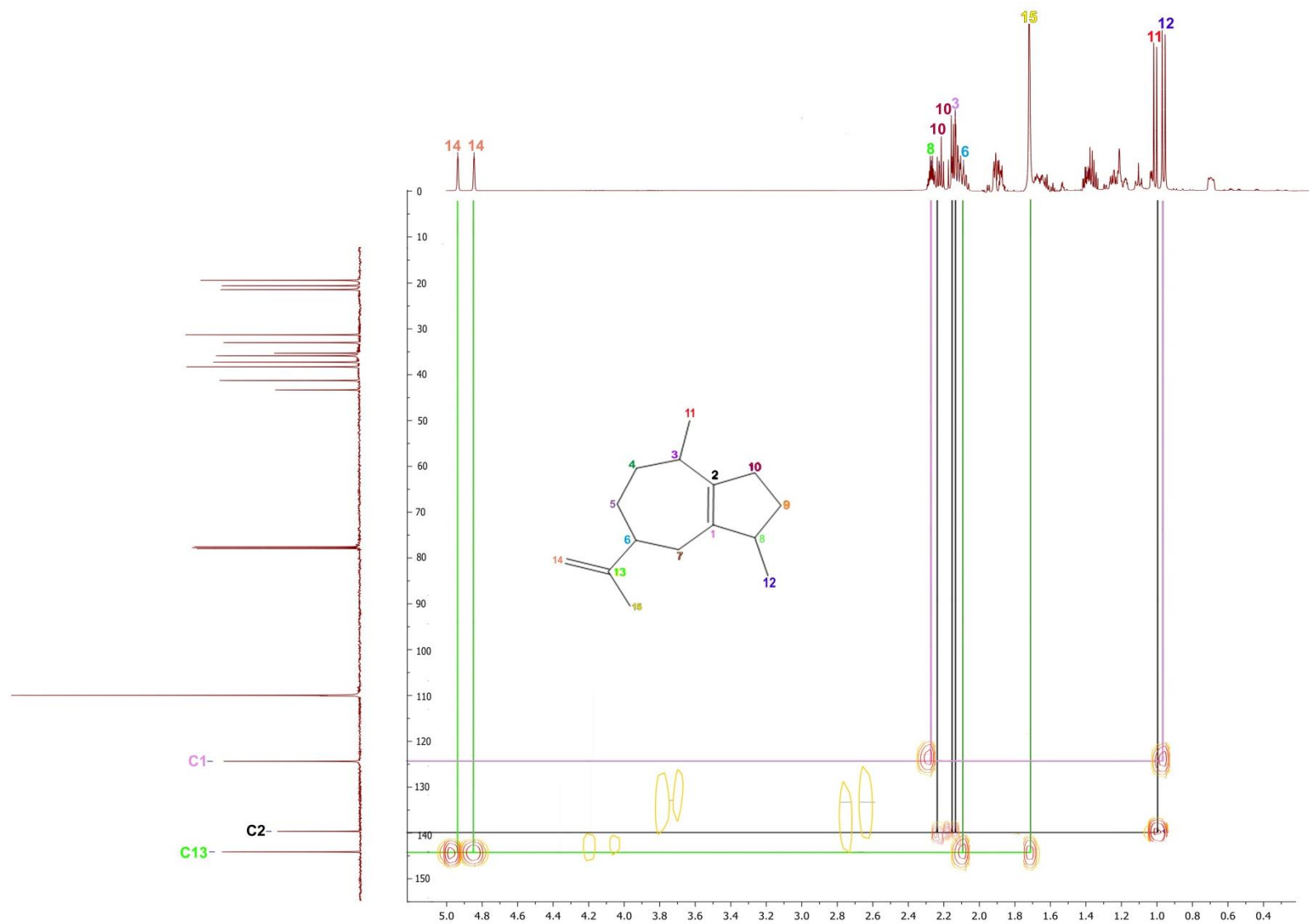


Figura 27. Espectro bidimensional HMBC del compuesto 2

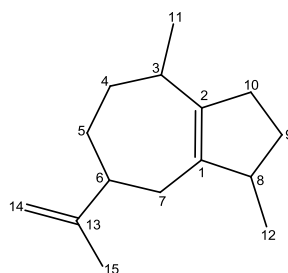


Figura 28. Estructura propuesta del compuesto **2**

Para el compuesto **2** se observa el pico del ion molecular a m/z 204. (Figura 30). El ion molecular a m/z 204 sufre la eliminación de un radical metilo originando un fragmento a m/z 189. El ion molecular pierde un radical alilo y se forma el pico a m/z 163. Este fragmento sufre una ruptura entre los carbonos 3-3a y 1-8a dando origen al fragmento a m/z 107; este a su vez, pierde una molécula de acetileno formando el fragmento a m/z 81. También, se observa el pico correspondiente a catión alilo a m/z 41 por la pérdida del radical $C_{12}H_{19}$. También, el ion molecular sufre una reacción de Retro Diels-Alder dando origen al fragmento a m/z 122, que puede perder un radical metilo (formando el ion a m/z 107) o un radical alilo (formando el ion a m/z 81) (Figura 29).

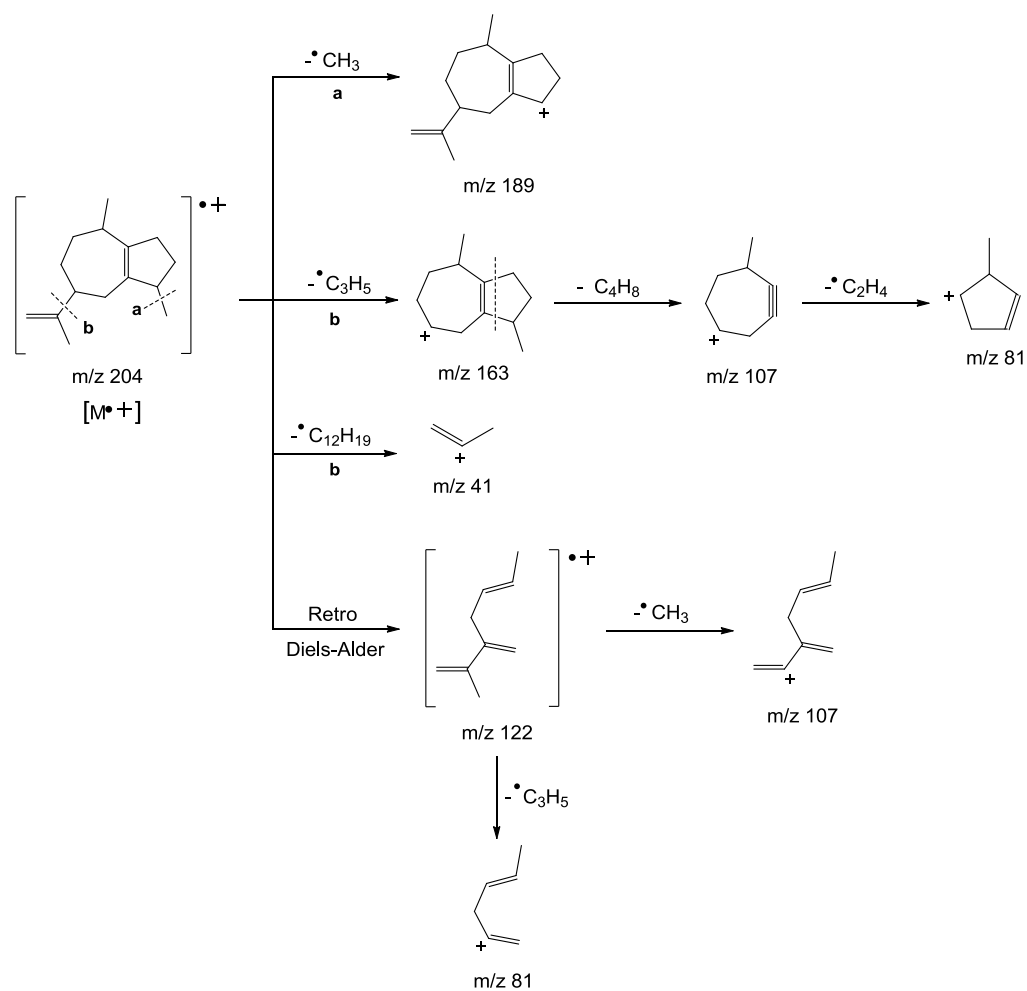


Figura 29. Fragmentación propuesta para el compuesto 2

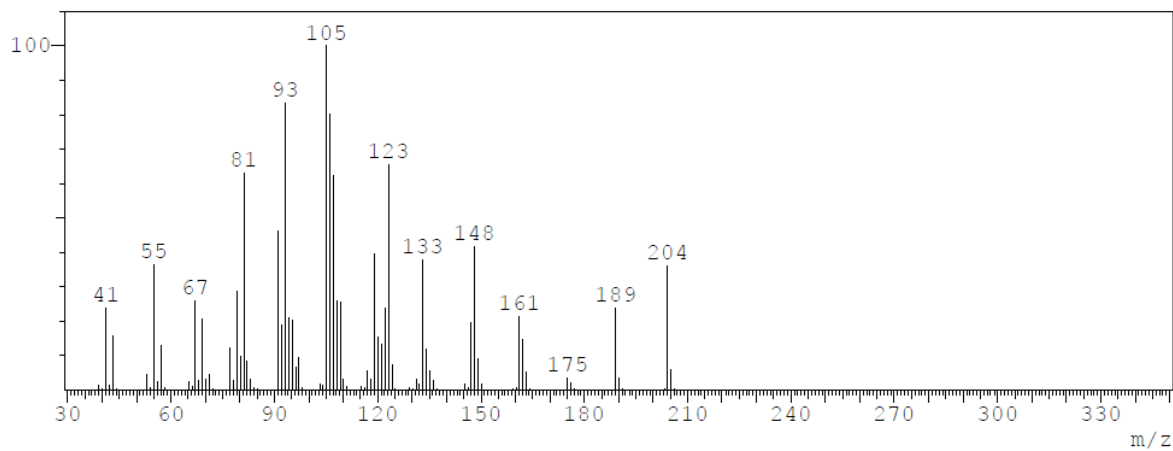


Figura 30. Espectro de masas del compuesto 2

5.5.3 Análisis de la fracción C1F7

El compuesto **3** fue obtenido como un sólido amorfo blanco. El perfil cromatográfico muestra un pico mayoritario con un tiempo de retención de 14.808 minutos y un porcentaje de área de 66.24 (Figura 31). En el espectro de masas por impacto electrónico (Figura 34) se observa un pico base a m/z 43 y el pico del ion molecular a m/z 222 que corresponde a la fórmula $C_{15}H_{26}O$.

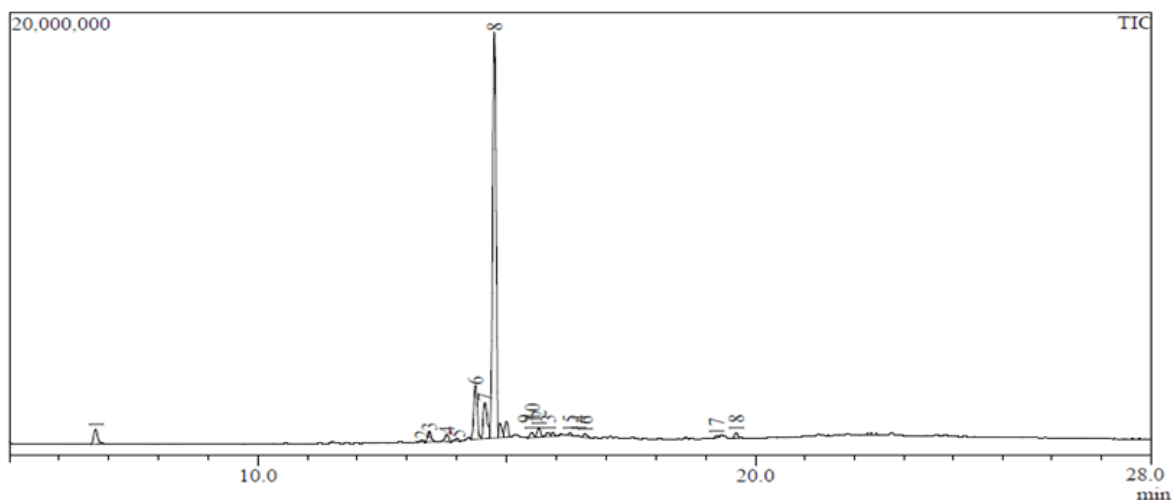


Figura 31. Perfil cromatográfico de la fracción C1F7

El compuesto sugerido por la base de datos del equipo y por comparación de su espectro con el de la base de datos NIST Chemistry WebBook corresponde al sesquiterpeno globulol (Figura 32).

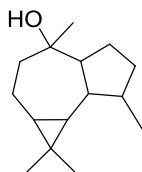


Figura 32. Estructura propuesta del compuesto **3**

Para el compuesto **3** se puede observar el ion molecular a m/z 222 (Figura 34) que El ion molecular a m/z 222 sufre la eliminación del radical $C_{12}H_{19}O$ para generar el catión isopropilo (m/z 43) que pierde hidrógeno y forma el catión alilo a m/z 41. También, puede perder un radical isopropilo dando lugar al fragmento a m/z 179 que sufre la pérdida del fragmento C_4H_8 y genera el pico a m/z 123. El ion molecular sufre la pérdida de una molécula de agua, originando un fragmento a

m/z 204, el cual es susceptible a diversas fragmentaciones originando los picos a m/z 122 (eliminación del fragmento C_6H_{10}), 135 (pérdida del fragmento C_5H_9), 148 (eliminación del fragmento C_4H_7), 162 (pérdida de isopropilo) y 189 (pérdida de un radical metilo). El ion a m/z 135 pierde el fragmento C_4H_7 originando el pico a m/z 80. El pico a m/z 189 sufre la pérdida del fragmento C_4H_8 y genera el pico a m/z 133 (Figura 33).

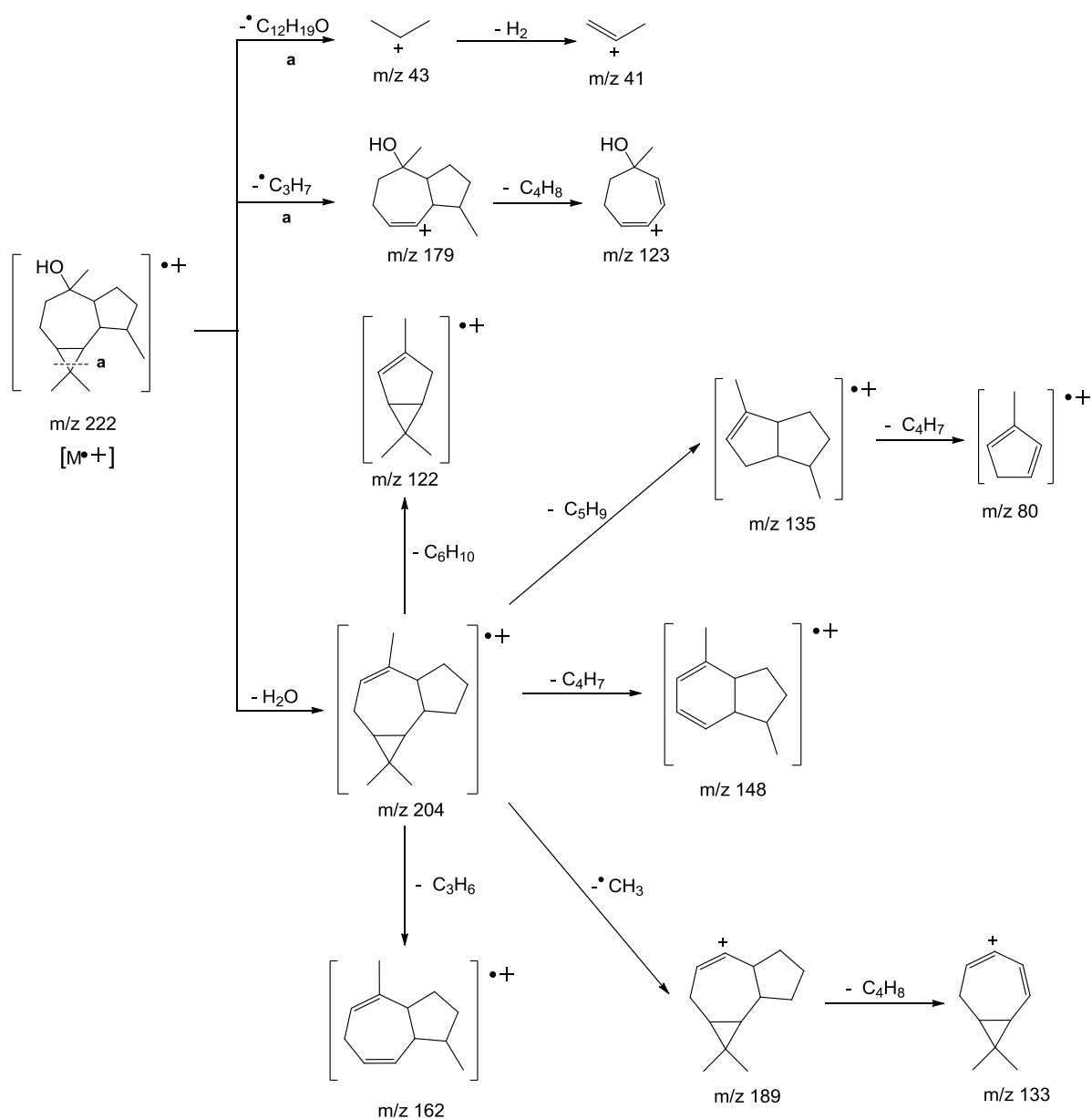


Figura 33. Fragmentación propuesta para el compuesto 3

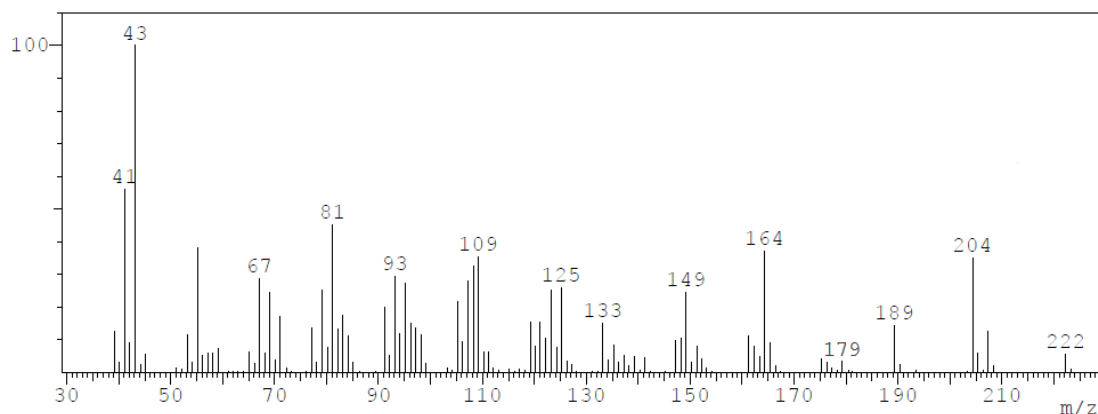


Figura 34. Espectro de masas del compuesto 3

5.6 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LA FRACCIÓN C1F12

Se realizó una separación cromatográfica de la fracción C1F12 que tuvo un rendimiento de 27.09 %. Para esta separación se emplearon 2.8851 g de muestra. Se obtuvieron 285 fracciones, las cuales de acuerdo al perfil por CCD se reunieron en 17 fracciones denominadas C2F19-28, C2F29-40, C2F41-46, C247-52, C253-66, C267-79, C280-82, C2F83-100, C2F101-119, C2F120-132, C2F133-142, C2F143-160, C2F161-200, C2F201-224, C2F225-239, C2F240-285. De las cuales se analizaron las fracciones C2F41-46, C2F47-52 y C2F67-79 mediante CG-EM. En la Tabla 8 se registran las fracciones obtenidas con cada fase móvil empleada, así como su agrupación según los resultados observados en CCD. El porcentaje de rendimiento de la extracción se representa en la Figura 35. Las fracciones colectadas se llevaron a sequedad registrando su peso exacto. Las fracciones 1 a 18 se evaporaron completamente.

Tabla 8. Fracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción C1F12

Solvente	Fracción	Peso (g) ±0.0001	Código asignado	Rendimiento (%)
Hexano:Acetato de etilo (15:1)	1 – 18	–	–	–
	19 - 28	0.0054	C2F19-28	0.97
	29 - 40	0.0029	C2F29-40	0.52
Hexano:Acetato de etilo (8.5:1.5)	41 – 46	0.1873	C2F41-46	33.77
	47 – 52	0,0563	C2F47-52	10.15
	53 - 66	0,0039	C2F53-66	0.70
	67 - 79	0,0814	C2F67-79	14.67
Hexano:Acetato de etilo (8:2)	80 - 82	0.0026	C2F80-82	0.47
	83 - 100	0.0224	C2F83-100	4.04
	101 - 119	0.0546	C2F101-119	9.84
Hexano:Acetato de etilo (7:3)	120 – 132	0.0073	C2F120-132	1.32
	133 – 142	0.0075	C2F133-142	1.35
	143 – 160	0.0233	C2F143-160	4.20
	161 - 200	0.0482	C2F161-200	8.69
	201 – 224	0.0266	C2F201-224	4.80
	225 – 239	0.0199	C2F225-239	3.59
	240 – 285	0.0500	C2F240-285	9.01

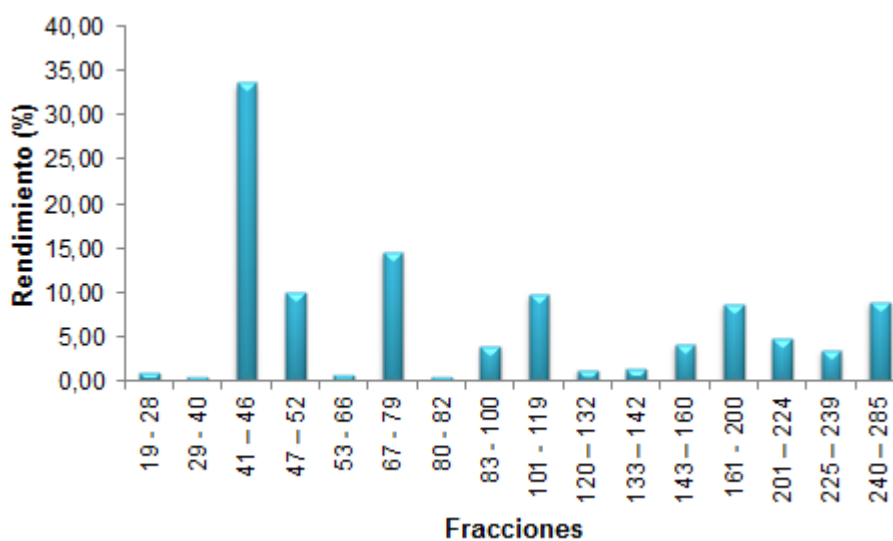


Figura 35. Rendimiento de las fracciones obtenidas por CC de la fracción C1F12

5.7 IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA FRACCIÓN C1F12

La caracterización de los metabolitos secundarios de la fracción C1F12 se realizó mediante CG-EM comparando los espectros de masas con los almacenados en las bases de datos NIST Chemistry WebBook y Wiley 7N2 del equipo. Se proponen los patrones de fragmentación para aquellos compuestos que tuvieron un porcentaje de área superior a 10.

5.7.1 Análisis de la fracción C2F41-46

El perfil cromatográfico para la fracción C2F41-46 se muestra en la Figura 36 indicando la presencia de 10 compuestos. En la Tabla 9 se registran los compuestos determinados, sus tiempos de retención y sus porcentajes de área.

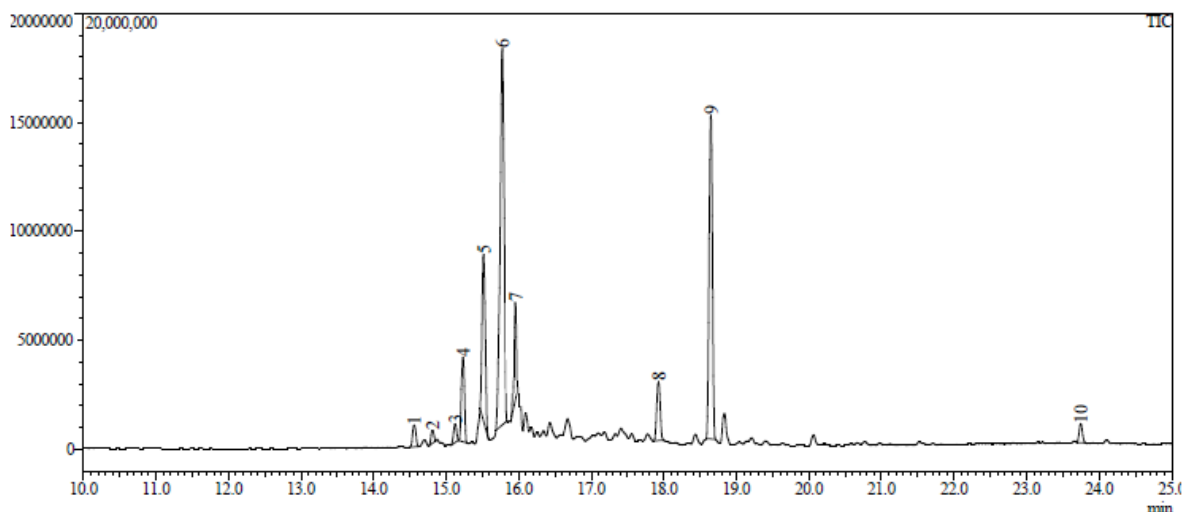


Figura 36. Perfil cromatográfico de la fracción C2F41-46

En el perfil cromatográfico se observan 10 picos, de los cuales fueron identificados 8 que corresponden al 80% de la fracción. Esta fracción está constituida principalmente por sesquiterpenos oxigenados que representan el 87.5%, de los cuales los componentes mayoritarios encontrados fueron isoespatulenol (**8**) (11.90%) y eudesm-7(11)-en-4-ol (**9**) (33.68%). En cuanto a los diterpenos representan solo el 12.5%, donde el único constituyente encontrado fue el isofitol (**11**) (23.88%). Los compuestos eudesm-7(11)-en-4-ol (**9**) e isofitol (**11**) se reportan

por primera vez para *Bixa orellana*. En la Figura 37 se muestran las estructuras propuestas para los compuestos presentes en la fracción C2F41-46.

Tabla 9. Compuestos identificados por CG-EM para la fracción C2F41-46

Pico	Tiempo de retención (min)	[M•+]	% Área	Nombre
1	14.559	222	1.62	Ledol 4
2	14.811	222	0.86	Elemol 5
3	15.123	220	1.31	Espatulanol 6
4	15.230	222	5.92	α -Eudesmol 7
5	15.514	220	11.90	Isoespatulanol 8
6	15.783	222	33.68	Eudesm-7(11)-en-4-ol 9
7	15.953	222	7.90	Guai-9-en-11-ol 10
8	17.925	–	4.51	Desconocido
9	18.650	296	23.88	Isofitol 11
10	23.746	–	1.41	Desconocido

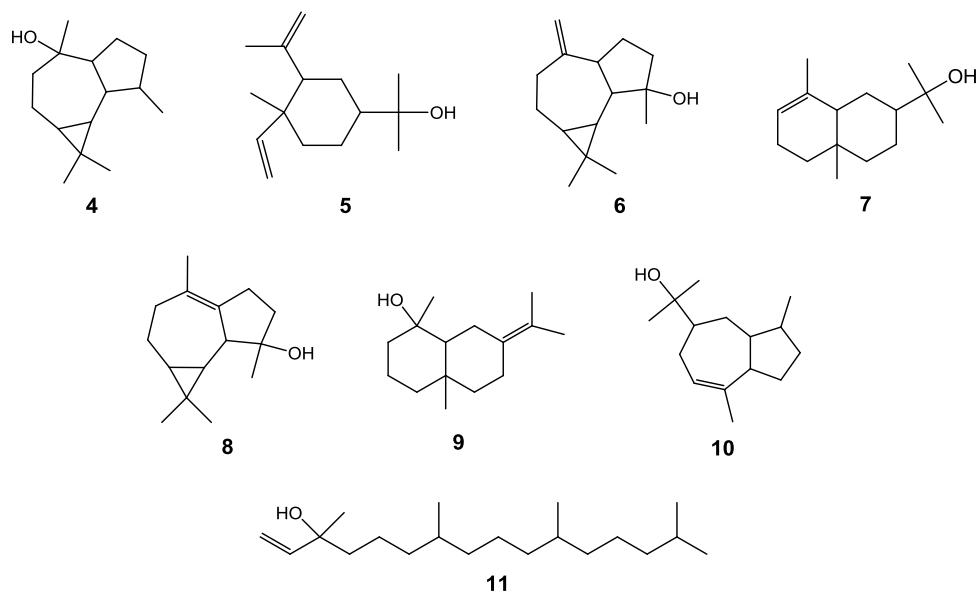


Figura 37. Estructuras propuestas para los compuestos de la fracción C2F41-46

A continuación se presenta el análisis de las posibles fragmentaciones de los compuestos mayoritarios **8**, **9** y **11** presentes en la fracción C2F41-46.

Para el compuesto **8** se puede observar el ion molecular a m/z 220 (Figura 39) que sufre la eliminación de un radical metilo originando un fragmento a m/z 205. Posteriormente, sufre la pérdida de una molécula de agua dando el fragmento a m/z 187. El ion molecular sufre una ruptura entre los carbonos 6-11 y 7-11 dando un fragmento a m/z 177, debido a la pérdida de un grupo isopropilo en forma de radical. El fragmento a m/z 177 pierde una molécula neutra (72 u.m.a.) dando origen al fragmento a m/z 107. El ion molecular a m/z 220 sufre una ruptura entre los carbonos 6-11 y 7-11 dando el fragmento a m/z 43, dicho fragmento pierde hidrógeno y origina el pico a m/z 41. El ion molecular sufre la pérdida de una molécula de agua dando el fragmento a m/z 202; este a su vez, pierde un radical isopropilo y da origen al fragmento con m/z 159. Luego, sufre la eliminación de etino, generando el fragmento a m/z 133. A su vez, se pierde un fragmento con 78 u.m.a. dando origen al pico a m/z 55 (Figura 38).

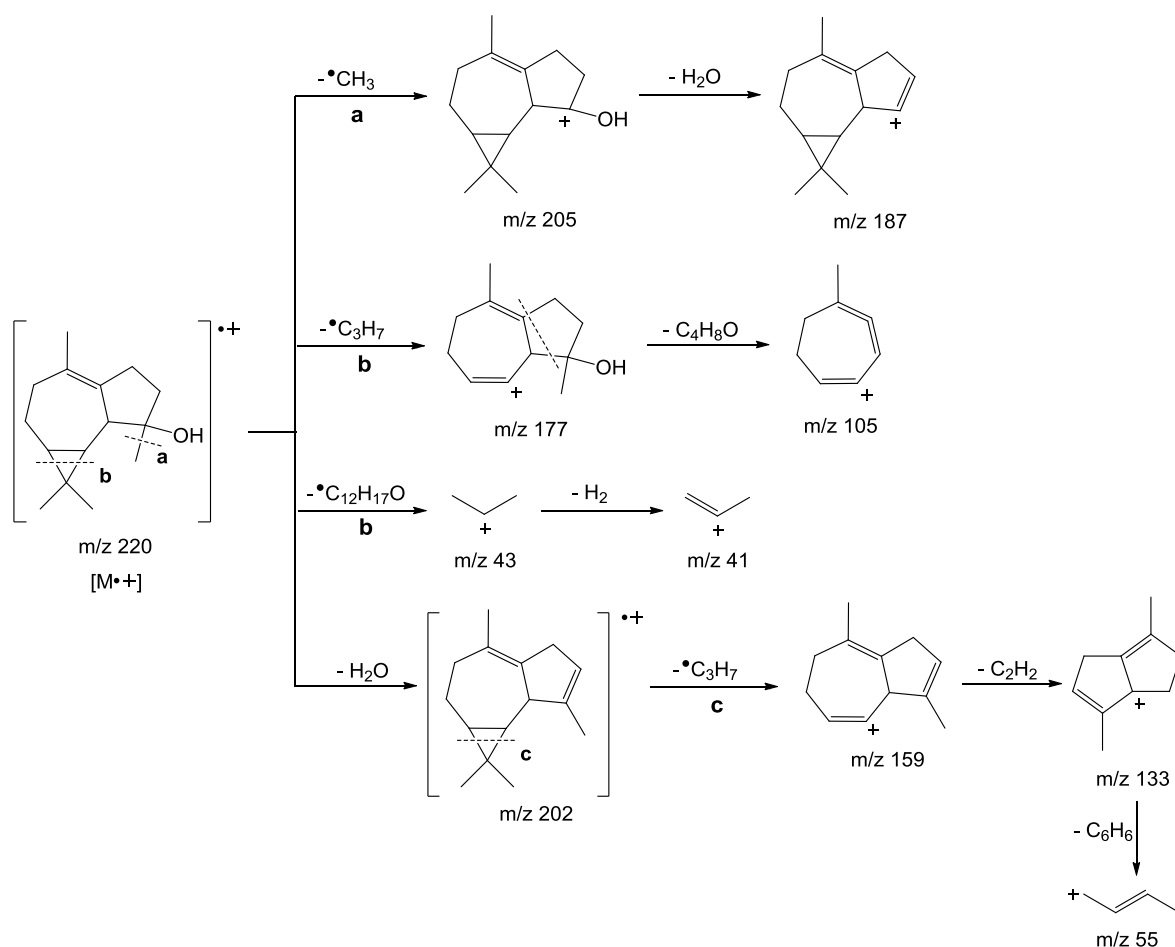


Figura 38. Fragmentación propuesta para el compuesto **8**

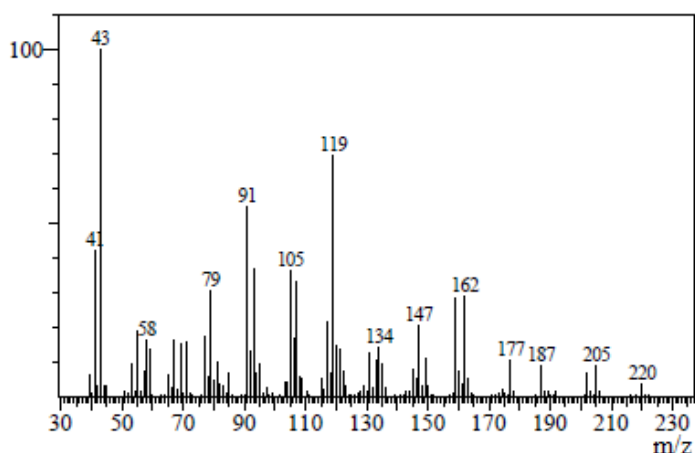


Figura 39. Espectro de masas del compuesto **8**

Para el compuesto **9** se observa el pico del ion molecular a m/z 222. (Figura 41). El ion molecular sufre una ruptura entre los carbonos 1-8a y 4-4a originando el fragmento a m/z 136. El ion molecular a m/z 222 sufre la pérdida de una molécula de agua, originando un catión radical a m/z 204. Posteriormente, sufre la pérdida de un radical metilo dando el fragmento a m/z 189, este a su vez se rompe entre los carbonos 1-8a y 4-4a formando el fragmento a m/z 121 que pierde una molécula de eteno y se forma el fragmento a m/z 93. El fragmento a m/z 204 sufre una ruptura entre los carbonos 4a-5 y 8-8a dando un fragmento a m/z 108 que pierde una molécula de acetileno y origina el fragmento a m/z 80. El ion molecular sufre ruptura entre los carbonos, que al perder una molécula de agua origina el fragmento a m/z 108. También, el ion molecular pierde un radical isopropilo, dando origen al fragmento con m/z 179 que pierde agua y forma el fragmento a m/z 161 (Figura 40).

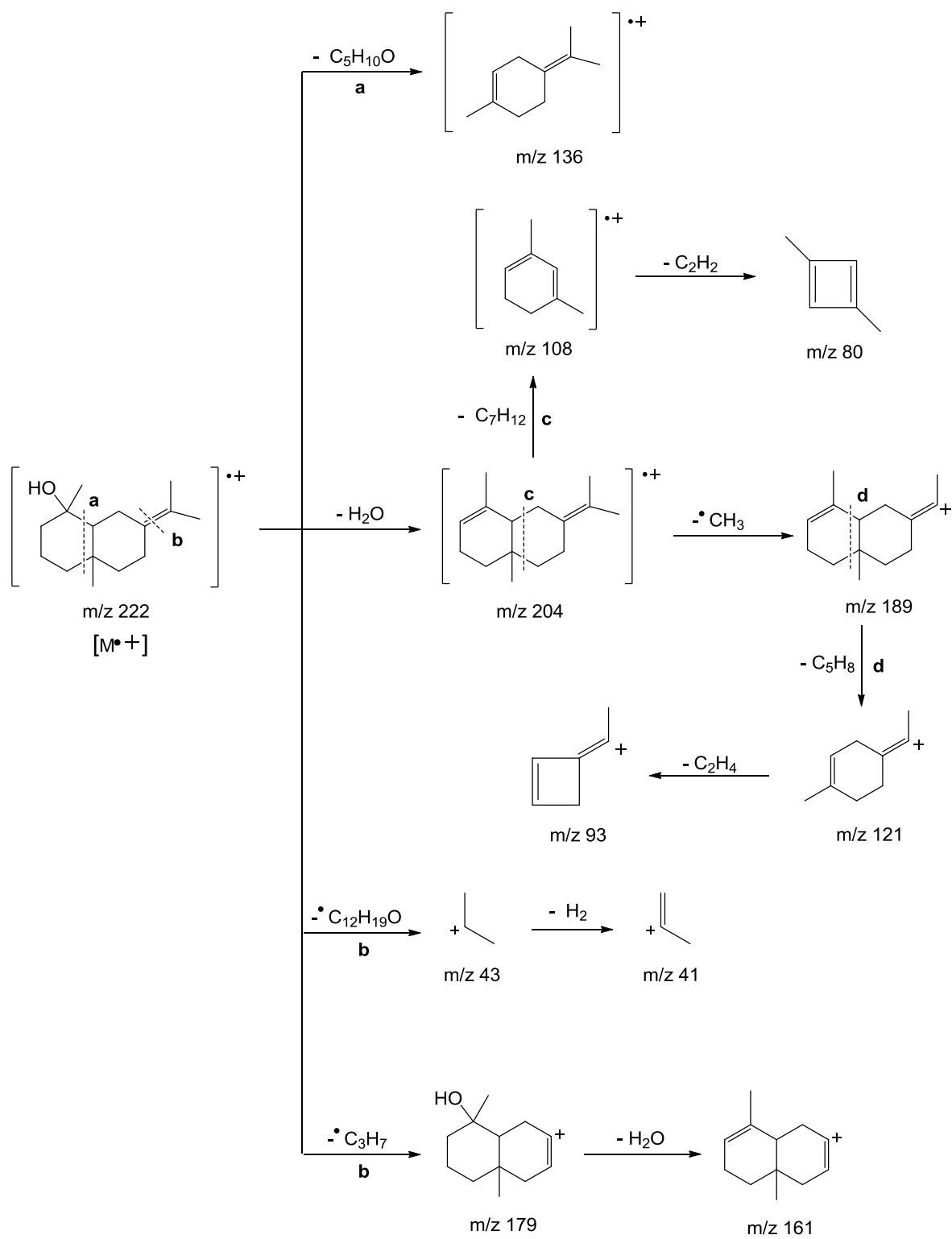


Figura 40. Fragmentación propuesta para el compuesto **9**

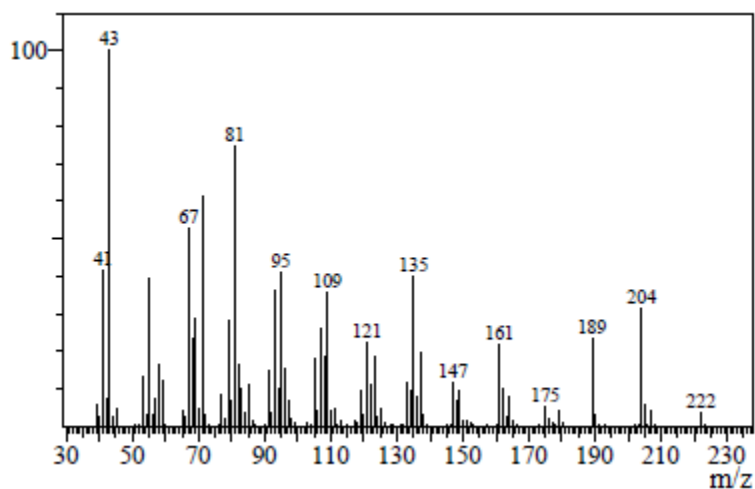


Figura 41. Espectro de masas del compuesto **9**

Para el compuesto **11** se observa el pico del ion molecular a m/z 296. (Figura 43). El ion molecular a m/z 296 experimenta una ruptura homolítica entre los carbonos 3 y 4, produciendo el pico base a m/z 71. De igual forma, el ion molecular sufre la pérdida de una molécula de agua originando un catión radical a m/z 278. Dicho fragmento puede sufrir diversas rupturas homolíticas que dan origen a los fragmentos a m/z 263 (pérdida de un radical metilo), 123 (ruptura entre los carbonos 7 y 8), 43 (pérdida de un radical propilo), 41 (pérdida de hidrógeno del fragmento con m/z 43) (Figura 42).

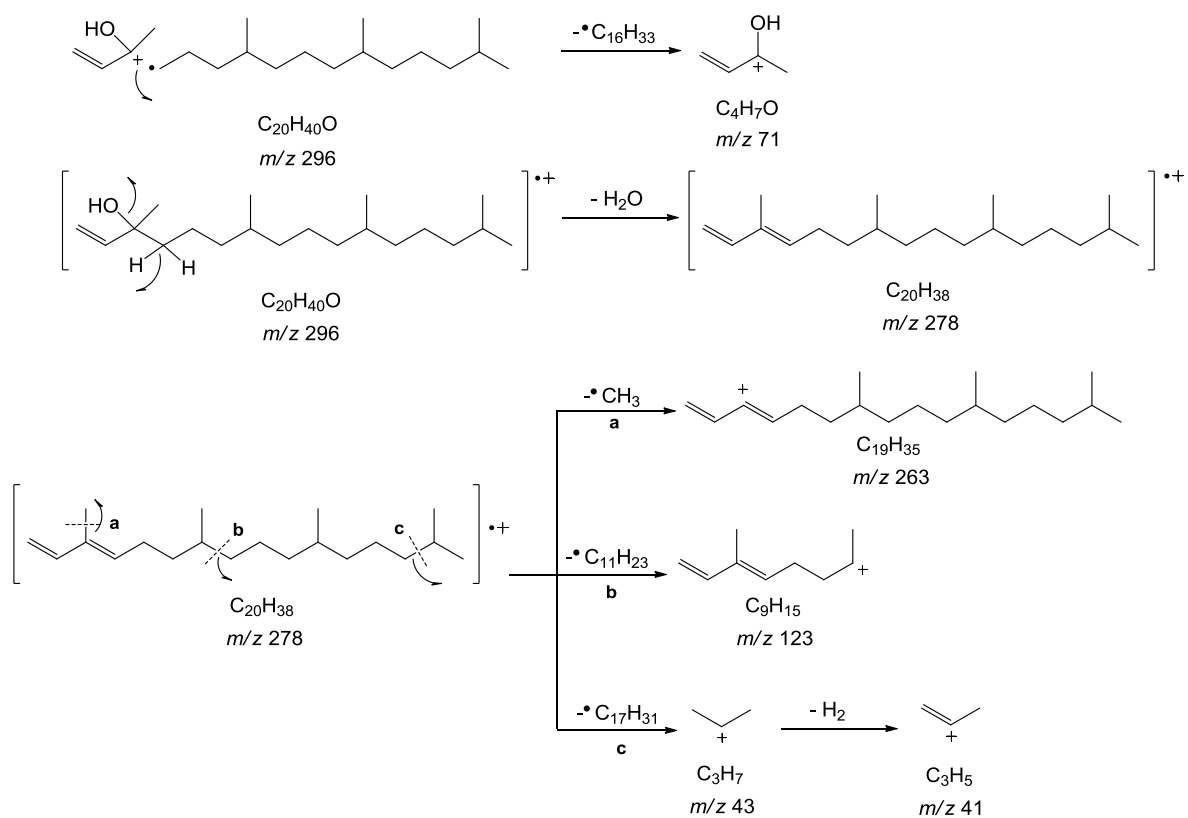


Figura 42. Fragmentación propuesta para el compuesto 11

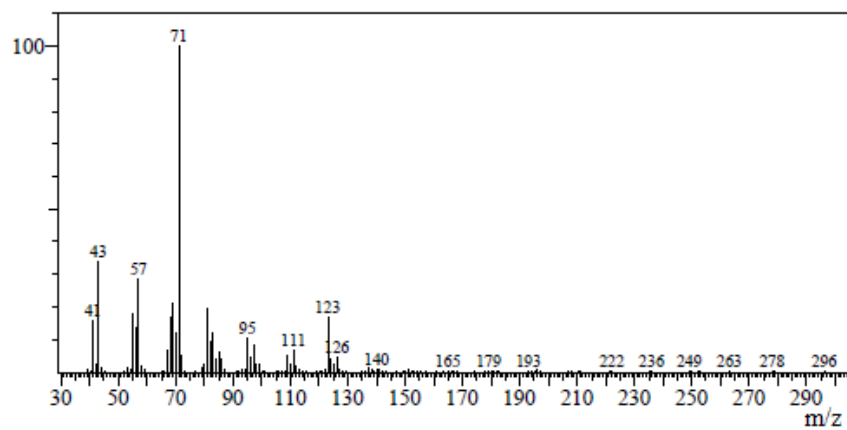


Figura 43. Espectro de masas del compuesto 11

5.7.2 Análisis de las fracciones C2F47-52

El perfil cromatográfico para la fracción C2F47-52 se muestra en la Figura 44 indicando la presencia de 10 compuestos. En la Tabla 10 se registran los compuestos determinados, sus tiempos de retención y sus porcentajes de área.

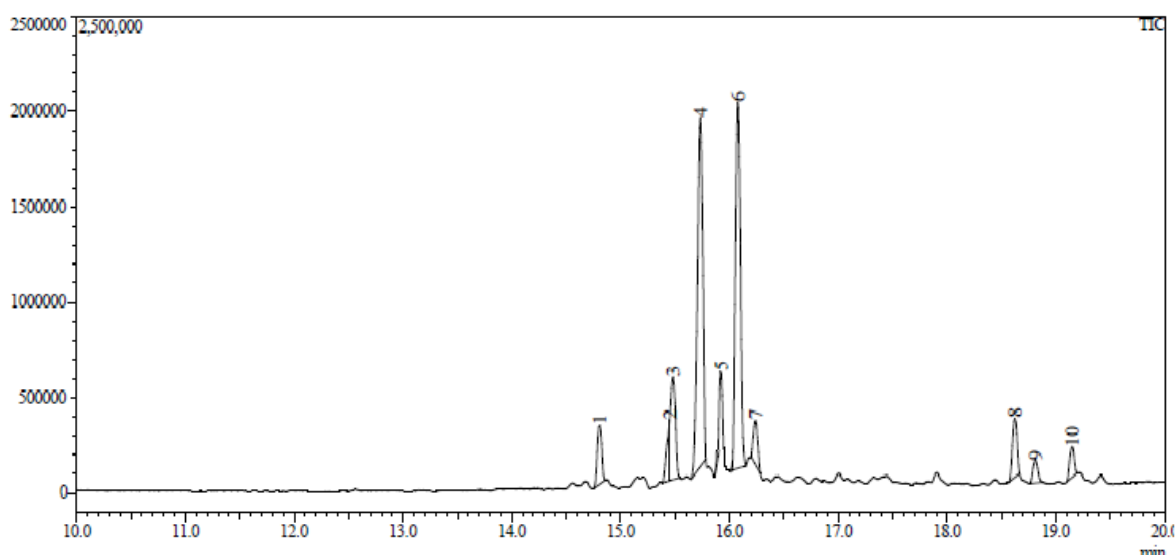


Figura 44. Perfil cromatográfico de la fracción C2F47-52

Tabla 10. Compuestos identificados por CG-EM para la fracción C2F47-52

Pico	Tiempo de retención (min)	[M•+]	% Área	Nombre
1	14.808	222	4.43	Elemol 5
2	15.442	222	3.11	Germacren D-4-ol 12
3	15.483	220	8.00	Isoespatulenol 8
4	15.742	222	31.03	Eudesm-7(11)-en-4-ol 9
5	15.917	222	7.90	Guai-9-en-11-ol 10
6	16.075	222	29.88	Junipercanfor 13
7	16.242	–	3.04	Desconocido
8	18.625	296	4.46	Isofitol 11
9	18.808	–	1.85	Desconocido
10	19.150	–	2.30	Desconocido

En el perfil cromatográfico se observan 10 picos, de los cuales fueron identificados 7 que corresponden al 70% de la fracción. Esta fracción está constituida principalmente por sesquiterpenos oxigenados que representan el 85.7%, de los cuales los componentes mayoritarios encontrados fueron eudesm-7(11)-en-4-ol (**9**) (31.03%) y junipercanfor (**13**) (29.88%). En cuanto a los diterpenos representan solo el 14.3%, donde el único constituyente encontrado fue isofitol (**11**) (4.46%). Los compuestos eudesm-7(11)-en-4-ol (**9**), isofitol (**11**) y junipercanfor (**13**) se reportan por primera vez para *Bixa orellana*. En la Figura 45 se muestran las estructuras propuestas para los compuestos presentes en la fracción C2F47-52.

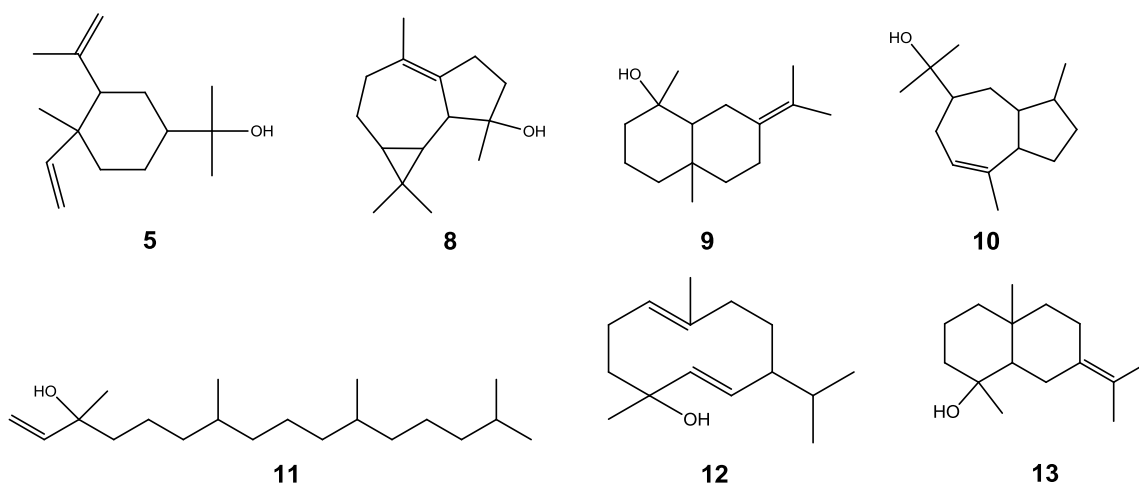


Figura 45. Estructuras propuestas para los compuestos de la fracción C2F47-52

5.7.3 Análisis de las fracciones C2F67-79

El perfil cromatográfico para la fracción C2F67-79 se muestra en la Figura 46 indicando la presencia de 10 compuestos. En la Tabla 11 se registran los compuestos determinados, sus tiempos de retención y sus porcentajes de área.

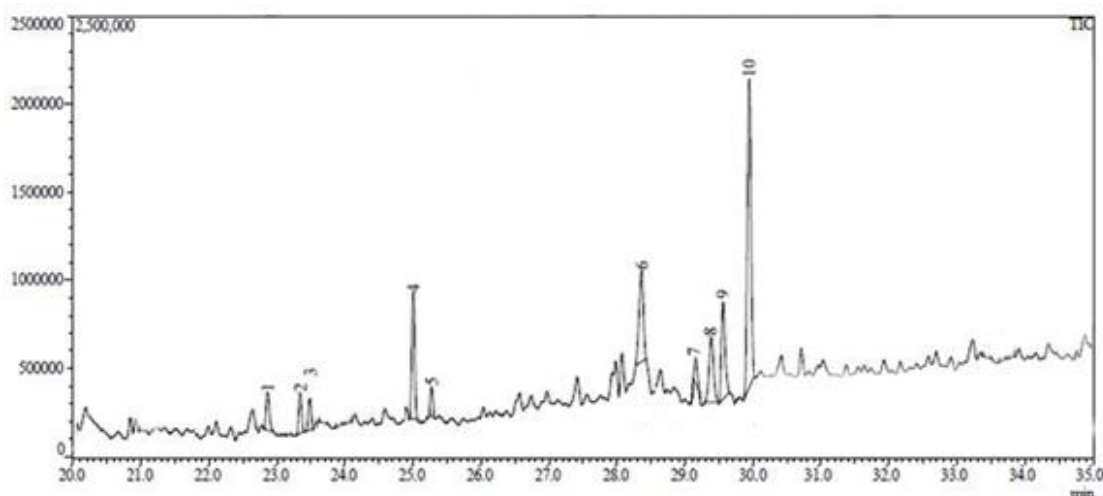


Figura 46. Perfil cromatográfico de la fracción C2F67-79

En el perfil cromatográfico se observan 10 picos, de los cuales fueron identificados 7 que corresponden al 70% de la fracción. Esta fracción está constituida por compuestos aromáticos que representan el 42.9%, de los cuales el componente mayoritario encontrado fue (2E)-5-fenil-2-pental (15) (12.23%). También se encontraron esteroides que representan el 57.1%, donde los constituyentes mayoritarios encontrados fueron el β -estigmasterol (19) (12.16%) y γ -sitosterol (20) (36.90%). Los compuestos (2E)-5-fenil-2-pental (15) y γ -sitosterol (20) se reportan por primera vez para *Bixa orellana*. En la Figura 47 se muestran las estructuras propuestas para los compuestos presentes en la fracción C2F67-79.

Tabla 11. Compuestos identificados por CG-EM para las fracciones C2F67-79

Pico	Tiempo de retención (min)	[M ^{•+}]	% Área	Nombre
1	22.867	–	4.08	Desconocido
2	23.300	232	3.97	1,1'-bibenzoindanilideno 14
3	23.349	–	3.03	Desconocido
4	24.966	160	12.23	5-fenil-2-pental 15
5	25.269	302	2.53	2,4-bis-(1-etilfenil)-fenol 16
6	28.436	–	12.85	Desconocido
7	29.036	412	2.48	Fucosterol 17
8	29.375	400	9.77	Campesterol 18
9	29.391	412	12.16	β -estigmasterol 19
10	29.940	414	36.90	γ -sitosterol 20

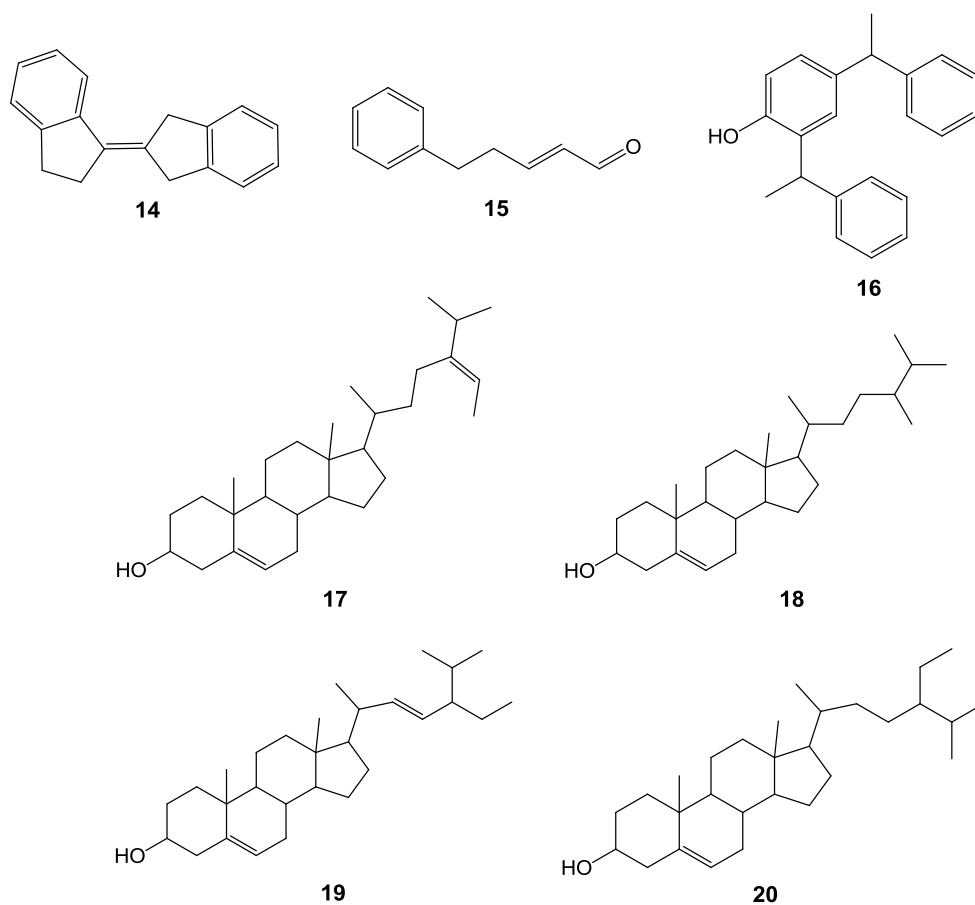


Figura 47. Estructuras propuestas para los compuestos de la fracción C2F67-79

A continuación se presenta el análisis de las posibles fragmentaciones de los compuestos mayoritarios **15**, **19** y **20** presentes en la fracción C2F67-79.

El espectro de masas del compuesto **15** se observa en la Figura 49. El ion molecular a m/z 160 sufre una ruptura bencílica dando origen al ion tropilio m/z 91 (pico base), a su vez va eliminando acetileno (C_2H_2) dando lugar a la secuencia característica de los compuestos aromáticos a m/z 65 y 39. Se observa un reordenamiento de MacLafferty gracias a la presencia de hidrógenos y en la cadena donde se encuentra el grupo aldehído produciendo el pico a m/z 117 (Figura 48).

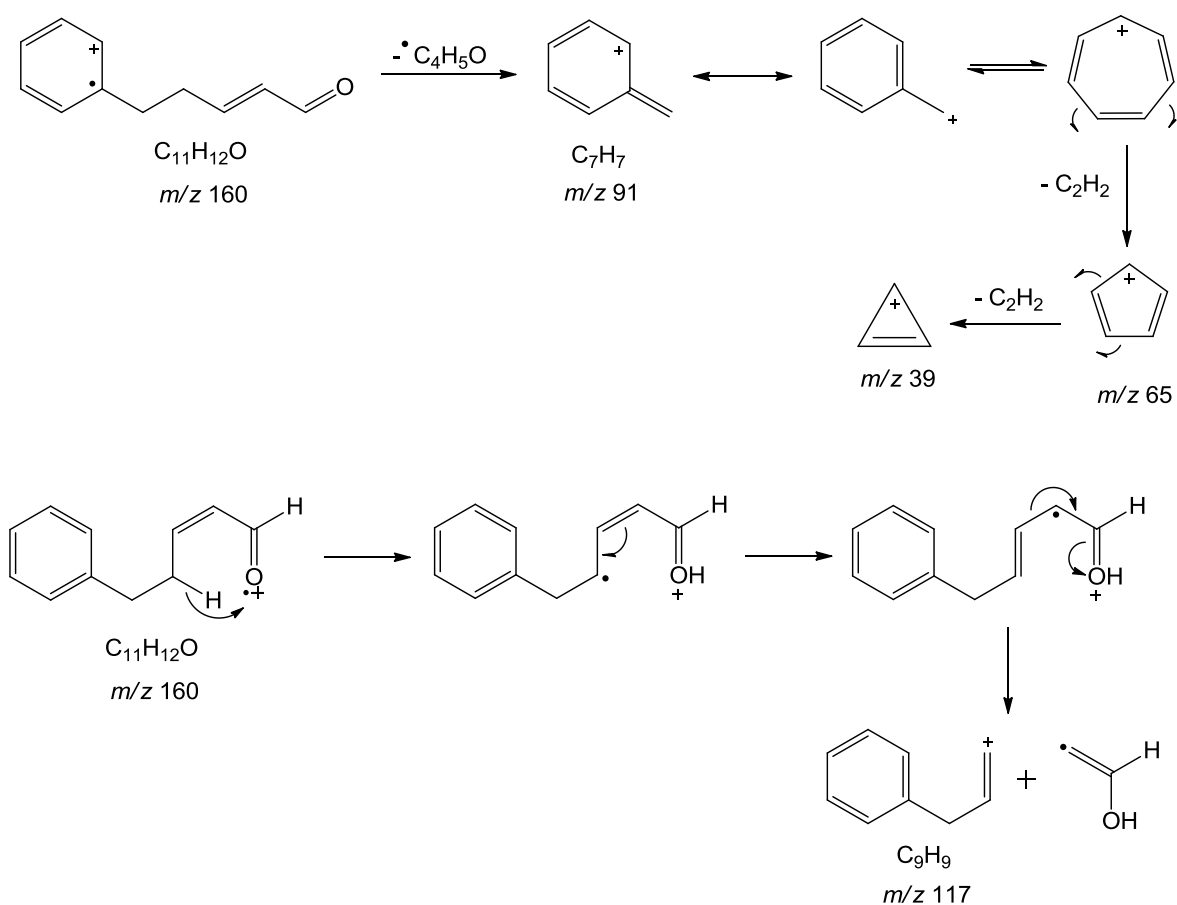


Figura 48. Fragmentación propuesta para el compuesto 15

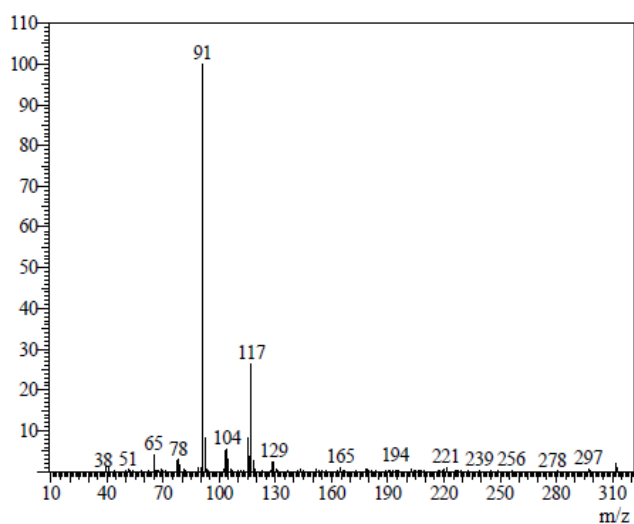


Figura 49. Espectro de masas del compuesto 15

El ion molecular sufre la pérdida de un ion isopropilo originando el pico a m/z 43, el

cual sufre una eliminación de hidrógeno y se genera el catión alilo a m/z 41. Luego, ocurre una ruptura en el carbono 17 y se observa el pico a m/z 273 que sufre la eliminación de una molécula de agua generando el pico a m/z 255. El ion molecular puede romperse entre los carbonos 13-17 y 14-15 para originar el ion a m/z 232. El ion molecular pierde un radical metilo y genera el fragmento a m/z 397 (Figura 65).

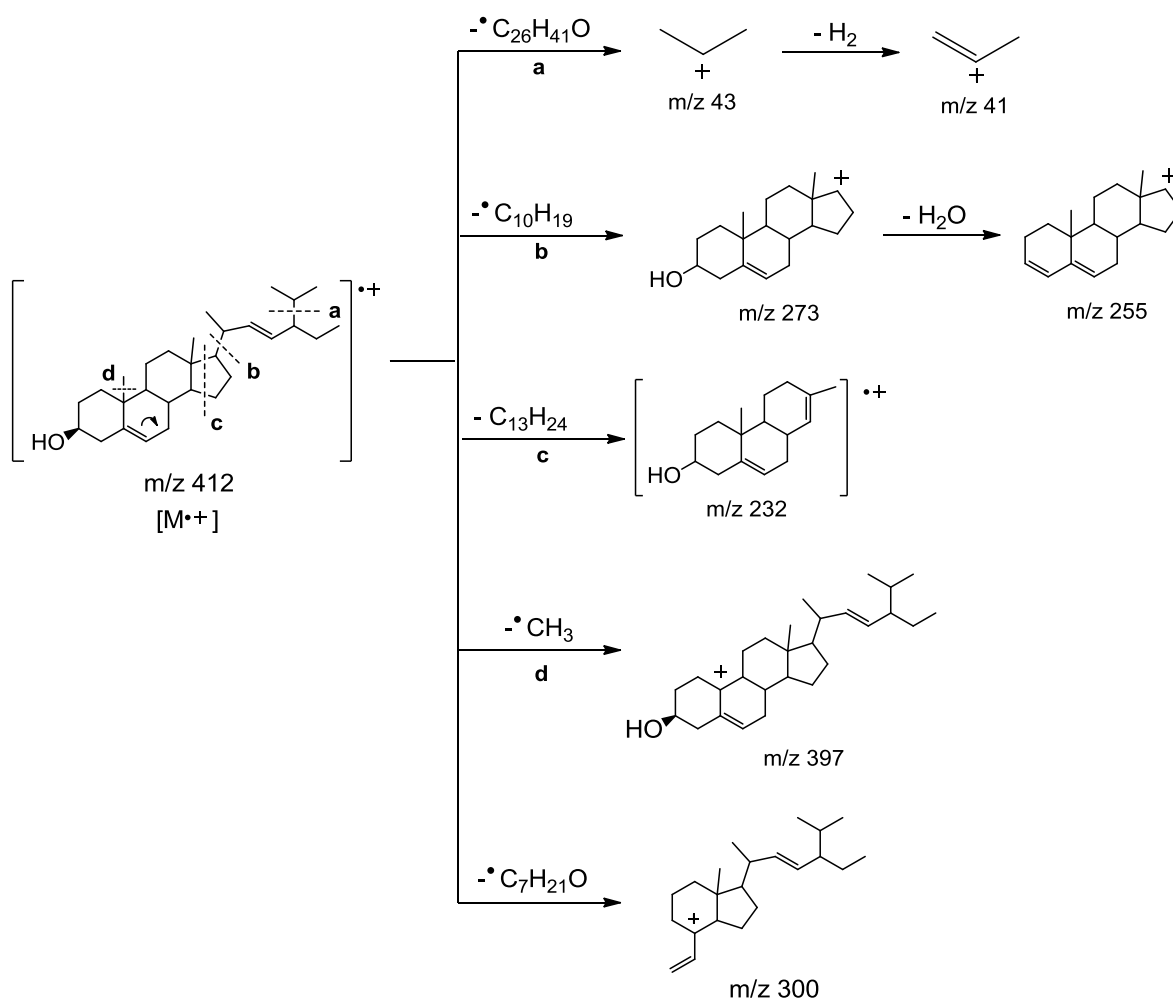


Figura 50. Fragmentación propuesta para el compuesto **19**

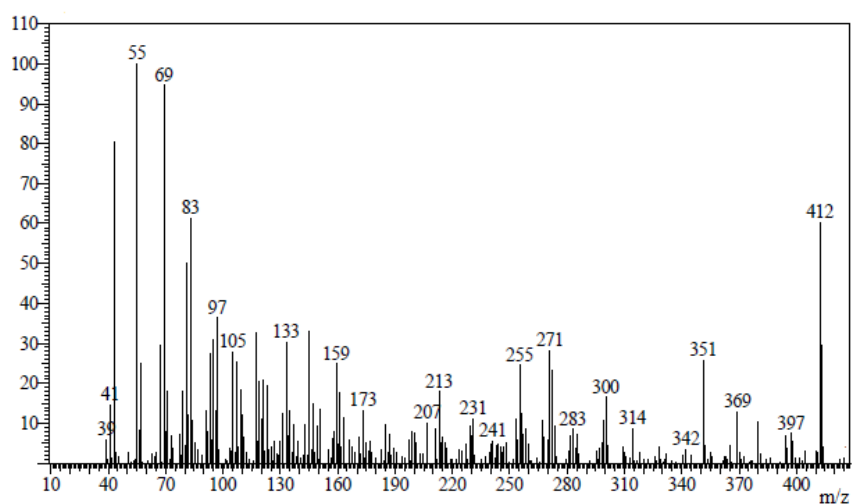


Figura 51. Espectro de masas del compuesto 19

En el espectro de masas se observa el pico del ion molecular a m/z 414 (Figura 53). Gracias a una ruptura homolítica, se forma el ion isopropilo a m/z 43; este a su vez pierde hidrógeno molecular formando el catión alilo a m/z 41. También, el ion molecular puede sufrir una ruptura homolítica en el carbono 17, perdiendo un radical $C_{10}H_{21}$, formando el pico a m/z 273 que sufre la eliminación de una molécula de agua generando el pico a m/z 255. Igualmente, el ion molecular puede perder una molécula de agua y generar un catión radical a m/z 396. Este fragmento pierde un radical metilo por ruptura homolítica y se forma el fragmento a m/z 381; este fragmento sufre una transposición de hidrógeno para posteriormente, romperse homolíticamente y generar el fragmento a m/z 213. A continuación se muestra el patrón de fragmentación propuesto para el compuesto 20 (Figura 68).

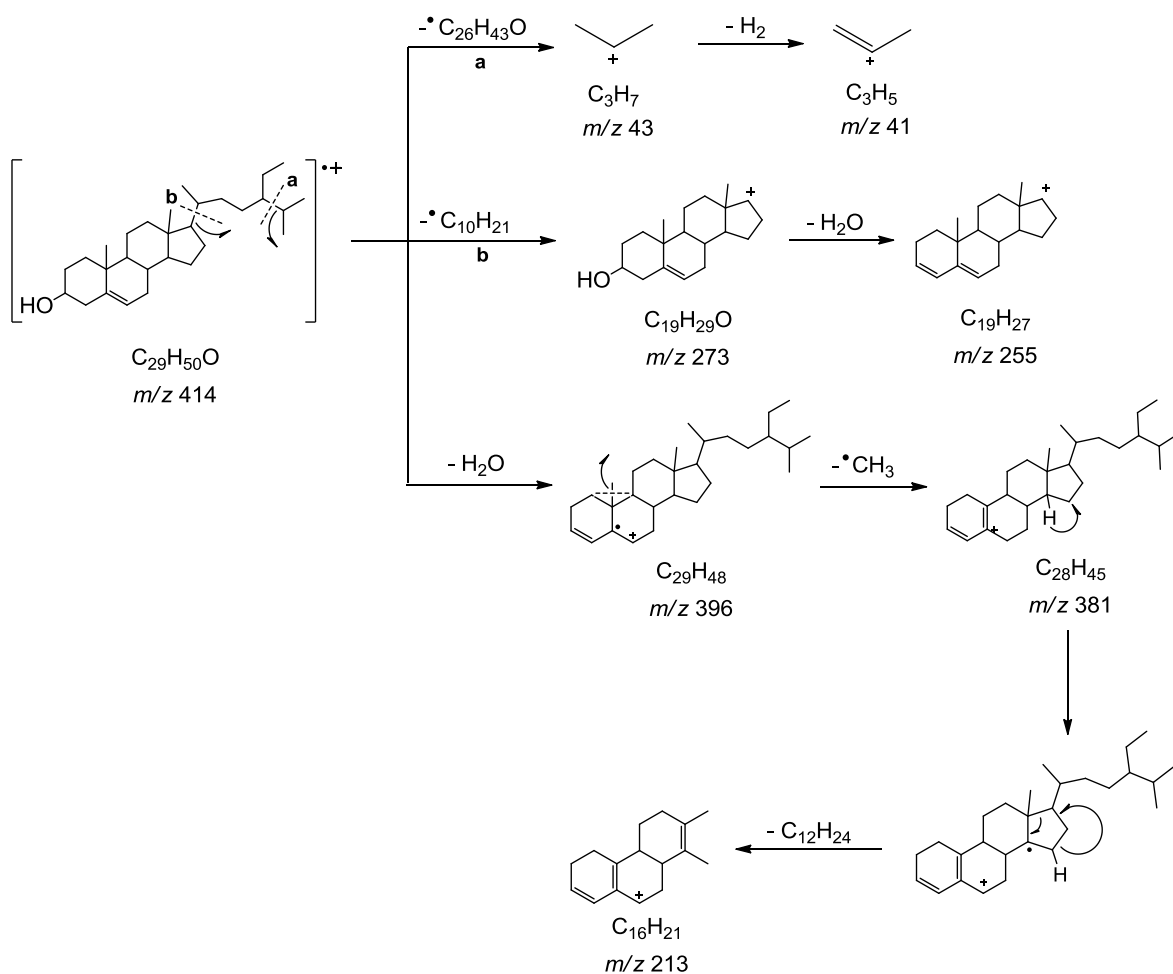


Figura 52. Fragmentación propuesta para el compuesto 20

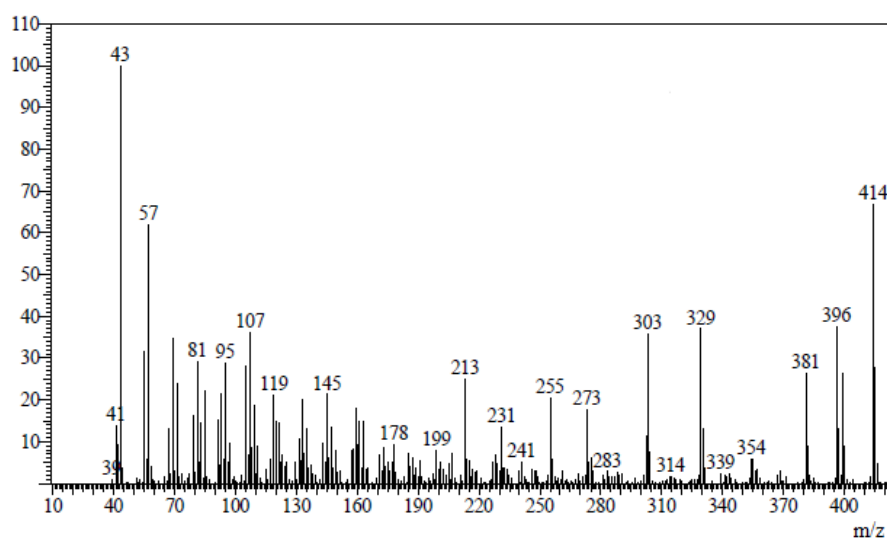


Figura 53. Espectro de masas del compuesto 20

5.8 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5.8.1 Método FRAP para determinar la capacidad antioxidante

5.8.1.1 Características de los extractos

Los extractos obtenidos a partir de las mezclas Metanol:Agua y Acetona:Agua fueron traslúcidos de color verde claro. Cuando se mezcló con el reactivo FRAP tomaron una coloración violeta traslúcida. Los extractos de metanol y acetona se rotularon como FRAPMeOH y FRAPAce, respectivamente.

5.8.1.2 Método FRAP

Para el análisis de los datos se empleó el programa STATGRAPHICS Centurión XVI.

La curva de calibración se realizó a partir de α -tocoferol. Los valores de las concentraciones empleadas y sus respectivas absorbancias se encuentran en la Tabla 12.

Tabla 12. Concentraciones de α -tocoferol y absorbancias a 593 nm

Concentración (μ M)	Absorbancia, 593 nm			Absorbancia promedio	Desviación estándar
	1	2	3		
97,5	0,165	0,171	0,183	0,173	0,009
260	0,330	0,418	0,374	0,374	0,044
283	0,411	0,387	0,360	0,386	0,026
399	0,589	0,637	0,500	0,575	0,070
478	0,657	0,650	0,642	0,650	0,008
492	0,681	0,663	0,609	0,651	0,037
604	0,839	0,883	0,791	0,838	0,046
836	1,257	1,060	1,036	1,118	0,121
994	1,418	1,266	1,322	1,335	0,077

A partir de los valores de concentración y absorbancia promedio para el α -tocoferol, se construyó la curva de calibración a 593 nm. La curva se representa en la Figura 54.

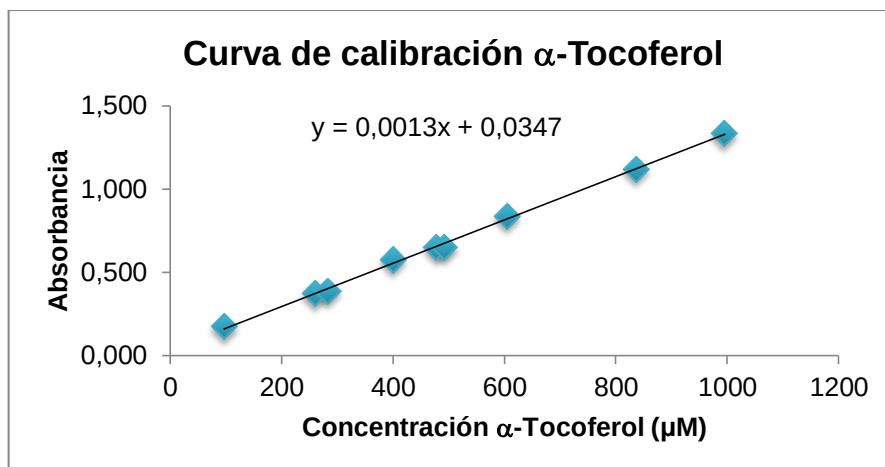


Figura 54. Curva de calibración para el α -tocoferol

Las absorbancias de los extractos FRAPMeOH y FRAPAce se registran en la Tabla 13.

Tabla 13. Absorbancia para los extractos FRAPMeOH y FRAPAce

Extracto	Absorbancia, 593 nm			Absorbancia promedio	Desviación estándar
	1	2	3		
FRAPMeOH 1	0,502	0,471	0,539	0,504	0,034
FRAPMeOH 2	0,474	0,507	0,512	0,498	0,021
FRAPMeOH 3	0,511	0,51	0,541	0,521	0,018
FRAPAce 1	0,165	0,176	0,177	0,173	0,007
FRAPAce 2	0,203	0,188	0,187	0,193	0,009
FRAPAce 3	0,24	0,154	0,222	0,205	0,045

Las concentraciones de los extractos se calcularon por interpolación en las curvas de calibración de α -tocoferol, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Donde:

x : Concentración equivalente de α -Tocoferol en μM

y : Absorbancia medida en el eje vertical

b : Intercepción de la recta

m : Pendiente de la recta

Los valores de las concentraciones de los extractos FRAPMeOH y FRAPAce se registran en la Tabla 14.

Tabla 14. Concentraciones para los extractos FRAPMeOH y FRAPAce

Extracto	Concentración (μM)			Concentración promedio (μM)	Desviación estándar
	1	2	3		
FRAPMeOH 1	359,46	335,62	387,92	361,00	26,188
FRAPMeOH 2	337,92	363,31	367,15	356,13	15,883
FRAPMeOH 3	366,38	365,62	389,46	373,82	13,551
FRAPAce 1	100,23	108,69	109,46	106,13	5,122
FRAPAce 2	129,46	117,92	117,15	121,51	6,895
FRAPAce 3	157,92	91,77	144,08	131,26	34,891

Los valores de FRAPAce 3 se descartaron porque son superiores al 10% de error con respecto al promedio.

La capacidad antioxidante de las hojas se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$CA = \frac{(x)(v)}{mms}$$

Donde:

CA: Capacidad antioxidante

x : Concentración equivalente de α -Tocoferol en μM

v : Volumen solución (reactivo FRAP + muestra + agua), 0.00148 L

mms : Masa muestra seca, 0.1009 g

La capacidad antioxidante calculada para los extractos FRAPMeOH y FRAPAce se registran en la Tabla 15.

Tabla 15. Capacidad antioxidante calculada (CA) para las concentraciones de los extractos FRAPMeOH y FRAPAce

Extracto	Concentración promedio (μM)	CA ($\mu\text{moles/g}$ muestra)
FRAPMeOH 1	361,00	264,8
FRAPMeOH 2	356,13	261,2
FRAPMeOH 3	373,82	274,2
FRAPAce 1	106,13	77,8
FRAPAce 2	121,51	89,1

La capacidad antioxidante de los extractos se expresa como Equivalentes de α -tocoferol: $\mu\text{mol } \alpha\text{-tocoferol/g}$ muestra. Los valores se registran en la Tabla 16.

Tabla 16. Capacidad antioxidante de los extractos FRAPMeOH y FRAPAce

Extracto	Capacidad antioxidante promedio ($\mu\text{moles/g}$ muestra)	Desviación estándar
FRAPMeOH	266,70	13.58
FRAPAce	83.47	7.35

De los dos extractos evaluados, el extracto obtenido a partir de la mezcla Metanol:Agua (50:50) fue el que presentó mayor actividad antioxidante. Esto significa que dicho extracto podría presentar varios compuestos con potencial antioxidante, sugiriendo que los compuestos con alta polaridad como flavonoides o polifenoles están involucrados en la actividad antioxidante de esta planta.

El intervalo de confianza determina la probabilidad de que el valor promedio de la Capacidad antioxidante de los extractos FRAPMeOH y FRAPAce se encuentre en el intervalo construido el 95,0% de las veces. Dicho intervalo se registra en la Tabla 17.

Tabla 17. Intervalo de confianza del 95% de la Capacidad antioxidante de los extractos FRAPMeOH y FRAPAce

Extracto	Capacidad antioxidante promedio (μM)
FRAPMeOH	266,70 $\pm$ 10.441
FRAPAce	83.47 $\pm$ 7.716

A partir del intervalo de confianza del 95% para la capacidad antioxidante de los extractos FRAPMeOH y FRAPAce se puede concluir que el valor promedio obtenido no se encuentra desviado hacia algún grupo de datos; por lo tanto, el promedio de la capacidad antioxidante es un buen referente para representar el conjunto de datos.

5.8.2 Estudios microbiológicos *In vitro*

Al examinar el rango de concentraciones correspondientes al panel de los extractos de hojas de *Bixa orellana* L. se pudo detectar y evaluar que los extractos tienen actividad antibacteriana efectiva en las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* serotipo O157:H7.

Después de examinar las pruebas de recuperación correspondientes al ExHBoHex se pudo determinar la concentración más baja y el rango completo de concentraciones del extracto que inhibieron totalmente el crecimiento bacteriano observable, los valores por triplicado obtenidos para las CMI en cada bacteria se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. CMI de ExHBoHex para el crecimiento bacteriano expresadas en mg de extracto/mL de caldo

Cepa bacteriana	Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), mg/mL			CMI promedio, mg/mL
	1	2	3	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.02	0.02	0.02	0.020 ± 0.000
<i>Salmonella entérica</i> serotipo Typhimurium	0.03	0.025	0.03	0.028 ± 0.002
<i>Escherichia coli</i>	0.045	0.045	0.030	0.040 ± 0.007
<i>Escherichia coli</i> serotipo O157:H7	0.045	0.045	0.035	0.042 ± 0.005

Una vez confirmado el desarrollo de las bacterias en el control del crecimiento o control positivo (90µL de caldo Mueller Hinton sin extracto), y en el control del diluyente (50µL de Tween 20 + 40µL de caldo Mueller Hinton), se pudo comprobar que las condiciones del medio de cultivo (pH, concentración de cationes, contenido de timidina) y el diluyente utilizado para solubilizar el extracto, no afectaron el buen crecimiento de las bacterias, además la ausencia de crecimiento en el control de esterilidad del extracto indicó que no estaba contaminado con microorganismos.

Se estableció que la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* con una CMI igual a 0.020 mg/mL y un rango de concentraciones inhibitorias con valores iguales a 0.025 mg/mL, 0.030 mg/mL, 0.035 mg/mL, 0.040 mg/mL, 0.045 mg/mL y 0.050 mg/mL fue la más sensible de todas al extracto de hexano de las hojas de *Bixa orellana* al compararse con los perfiles de crecimiento de las otras tres bacterias Gram negativas (Figura 55 y Tabla 18).

Analizando los perfiles de crecimiento con los resultados cuantitativos para la CMI y el rango completo de concentraciones inhibitorias únicamente en las bacterias Gram negativas se pudo confirmar que la *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium con una CIM igual 0.028 mg/mL y un rango de concentraciones inhibitorias con valores iguales a 0.035 mg/mL, 0.040 mg/mL, 0.045 mg/mL y 0.050 mg/mL; fue más sensible que la cepa ATCC de *Escherichia coli* y el aislamiento de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 con CIMS iguales a 0.040 mg/mL y 0.042 mg/mL respectivamente.

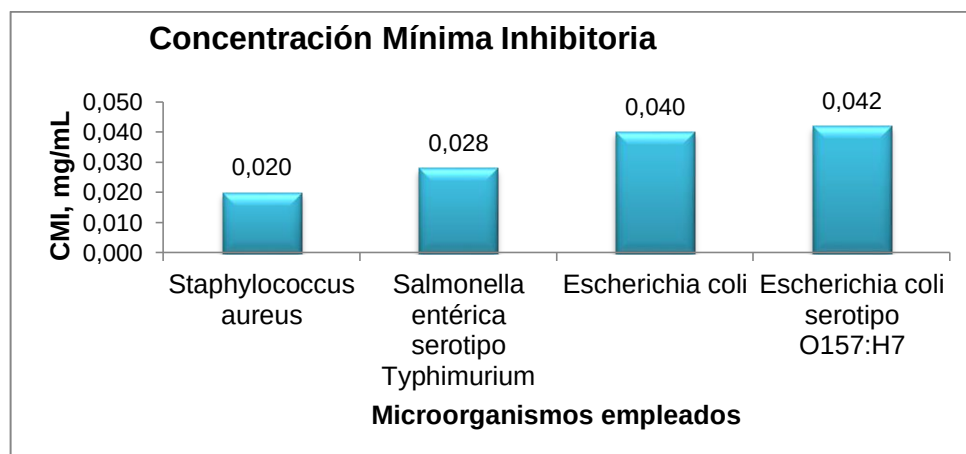


Figura 55. Resultados de la determinación de la CMI para los microorganismos empleados

6 CONCLUSIONES

- Las diferentes pruebas del análisis fitoquímico preliminar dieron positivas para taninos, flavonoides, alcaloides y terpenos, demostrando así la presencia de compuestos de interés biológico en las hojas de *Bixa orellana*.
- El análisis realizado por medio de RMN y CG-EM propone la estructura de un sesquiterpeno de fórmula $C_{15}H_{24}$ denominado α -Guaieno (**2**), el cual se reporta por primera vez para la *Bixa orellana*.
- En el análisis realizado mediante CG-EM de los extractos de hexano de las hojas de *Bixa orellana* se proponen 20 posibles compuestos, nueve de ellos son los componentes mayoritarios de las fracciones analizadas. Entre ellos se encuentran el aromático azuleno (**1**), el aldehído (2E)-5-fenil-2-pentenal (**15**), los sesquiterpenos oxigenados eudesm-7(11)-en-4-ol (**9**), globulol (**3**), isoespatulenol (**8**) y junipercanfor (**13**); el diterpeno isofitol (**11**) y los esteroides β -estigmasterol (**19**) y γ -sitosterol (**20**).
- De los componentes mayoritarios identificados en los extractos de hexano de hojas de *Bixa orellana* el azuleno (**1**), eudesm-7(11)-en-4-ol (**9**), isofitol (**11**), junipercanfor (**13**), (2E)-5-fenil-2-pentenal (**15**) y γ -sitosterol (**20**) se reportan por primera vez para la *Bixa orellana*.
- De los dos extractos evaluados por el método FRAP, el obtenido a partir de la mezcla Metanol:Agua fue el que presentó mayor actividad antioxidante. Sugiriendo que los compuestos con alta polaridad como flavonoides o polifenoles están involucrados en la actividad antioxidante de esta planta.
- El extracto de hexano de las hojas de *Bixa orellana* (ExHBoHex) en pequeñas concentraciones inhibió *In vitro* el crecimiento o la multiplicación de la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* y las bacterias Gram negativas *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* serotipo O157:H7.

- La bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* fue más sensible *In vitro* al extracto de hexano de las hojas de *Bixa orellana* con una CMI de 0.02 mg/mL, en comparación con las bacterias Gram negativas *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium con una CIM igual a 0.03mg/mL, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* serotipo O157:H7 con CIMs iguales a 0.045mg/mL.
- Entre las bacterias Gram negativas evaluadas *In vitro*, *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium fue más sensible al extracto de las hojas de *Bixa orellana* con una CMI igual a 0.03 mg/mL en comparación con las otras dos *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* serotipo O157:H7 con CMI iguales a 0.045mg/mL.

BIBLIOGRAFÍA

AIT-OUAZZOU, A.; LORÁN, S.; ARAKRAK, A.; LAGLAOUI, A.; ROTA, C.; HERRERA, A.; PAGÁN, R.; CONCHELLO, P. (2012). Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea* and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International*, 45, 313-319

ALONSO-CASTRO, A. J.; VILLARREAL, M. L.; SALAZAROLIVO, L. A.; GÓMEZ-SÁNCHEZ, M.; DOMÍNGUEZ, F.; GARCÍA-CARRANCA, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 945-972

ÁLVAREZ, L. A.; GÓMEZ, J. El achiote (*Bixa orellana* L.). En: Seminario de Agronomía: Medellín, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. 1990. 7-50 p.

APARNATHI, K.; LATA, R.; SHARMA, R. (1990). Annatto (*Bixa orellana* L.): Its cultivation preparation and usage. *International Journal of Tropical Agriculture*, 8, 80–88

BENZIE, I. F. F.; SZETO, Y. T.; TOMLINSON, B.; STRAIN J. J. (1999). Consumption of green tea causes rapid increase in plasma antioxidant power in humans. *Nutrition and Cancer*, 34, 83-87

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76

BIBEK, R.; ARUN, B. *Fundamentos de Microbiología de los Alimentos*. 4^a edición, México: Mc Graw-Hill, 2010. 352p.

BRAGA, F.; BOUZADA, M.L.; FABRI, R.L.; MATOS, M. DE O.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. (2007). Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 396–402

CASTELLO, M.C.; PHATAK, A.; CHANDRA, N.; SHARON, M. (2002). Antimicrobial Activity of Crude Extracts from Plant Parts and Corresponding Calli of *Bixa orellana* L. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40(12), 1378-1381

CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; GOMES, A.; FERNANDES, E.; FONTES DA COSTA LIMA, J. L.; BRAGAGNOLO, N. (2011). *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food chemistry*, 127 (2), 419-426

COUTINHO, I. D.; CARDOSO, C. A. L.; RÉ-POPPI, N.; MELO, A. M.; VIEIRA, M. C.; HONDA, N. K.; COHELO, R. G. (2009). Gas Chromatography-Mass Spectrometry (CG-EM) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(4), 767-776

DA SILVA, M. H. L.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; LUZ, A. I. R.; DA SILVA, J. D.; MAIA, J. G. S.(1999). The essential oils of *Lantana camara* L. occurring in North Brazil. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(4), 208-210

FLEISCHER, T. C.; AMEADE, E. P. K.; MENSAH, M. L. K.; SAWER, I.K. (2003). Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia*, 74, 136–138

FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S.L. *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. 2ª ed.; Editorial Universidad de Antioquia: Colombia, 2007, pp. 15-19

GALINDO-CUSPINERA, V.; LUBRAN, M. B.; RANKIN, S. A. (2002). Comparison of volatile compounds in water- and oil-soluble Annatto (*Bixa orellana* L.) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2010-2015

GAMAZO, C.; LÓPEZ-GOÑI, I. DÍAZ, R. Capítulo 2: Cultivo bacteriano. Manual práctico de microbiología. 3ª edición. Barcelona: Masson, 2005. p. 7-10

GIORGI, A.; DE MARINIS, P.; GRANELLI, G.; CHIESA, L. M.; PANSERI, S. (2013). Secondary metabolite profile, antioxidant capacity, and mosquito repellent activity of *Bixa orellana* from Brazilian Amazon region. *Journal of Chemistry*, ID 409826

GÓMEZ, G. C.; QUINTANA, J. C. ALARCÓN, J. C.; ZAPATA, J. E. (2012). Ethanolic extract from leaves of *Bixa orellana* L.: A potential natural food preservative. *Interciencia*, 37(7), 547-551

HUAMÁN, O.; ARNAO, I.; BÉJAR, E.; SANDOVAL, M. (2009). Efecto antiulceroso del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Bixa orellana* (Achiote) en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*; 70(2), 97-102

IDROBO, R. El Achiote: *Bixa orellana*. [En línea] http://www.cadenahortofruticola.org/admin/bibli/156el_achiote_bixa_orellana.pdf Octubre 2014.

JANICK, J. Annatto: Botany and Horticulture. En Horticultural reviews; John Wiley & Sons; New Jersey, USA. 2012; Volumen 39, pp. 389-419.

KIMATA, M.; INAGAKI, N.; NAGAI, H. (2000). Effects of luteolin and other flavonoids on IgE-mediated allergic reactions. *Planta medica*, 66, 25-29

KITE, G. C. (1995). The floral odour of *Arum maculatum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 23(4), 343-354

KNUDSEN, H., (2000). *Directorio de Colecciones de Germoplasma de América Latina y el Caribe*. 1ª edición. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Roma, Italia.

KORC, D. I.; BIDEGAIN, M.; MARTELL, M. (1995). Radicales libres: bioquímica y sistemas antioxidantes, implicancia en la patología neonatal. *Revista médica del Uruguay*, 11, 121-135

LINNEO, C. *Bixa orellana*. L. [En línea] <http://www.tropicos.org/Name/3800005>. Octubre 2014

LÓPEZ, L. Evaluación de la capacidad antioxidante y su relación con ácidos orgánicos, fenoles, carotenoides y azúcares en variedades *Musa paradisiaca* y *Musa acuminata*. Tesis. Santiago de Cali. Universidad del Valle, 2011, p. 104

MURILLO, E.; MÉNDEZ, J. Guía metodológica para la detección rápida de algunos núcleos secundarios y caracterización de una droga cruda. Universidad del Tolima: Facultad de Ciencias; 2008

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (NIST). Libro del Web de Química del NIST. [En línea] <http://webbook.nist.gov/chemistry/> Enero 2014

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO). Achiote: *Bixa orellana*. [En línea] <http://www.fao.org/docrep/V8879E/v8879e04.htm> Julio 2014

OSORIO, C. Efecto *In Vitro* del extracto de las semillas de achiote (*Bixa orellana* L.) en las bacterias fitopatógenas *Ralstonia Solanacearum* Biotipo II y *Erwinia sp.* Tesis. Santiago de Cali: Universidad del Valle; 2009; p. 106

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; JIMÉNEZ, S.L.; FONNEGRA, R.; OSORIO, R.G.; GARCÍA, M.E.; DÍAZ, A. (2000). Snakebites and Ethnobotany in the Northwest Region of Colombia: Part II: Neutralization of Lethal and Enzymatic Effects of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(3), 505-511

PATEL, D.; SHULKA, S.; GRUPTA, S. (2007). Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potencial and promise (review). *International Journal of Oncology*, 30(1), 233-245

RAGA, D. D.; ESPIRITU, R. A.; SHEN, C. C.; RAGASA, C. Y. (2011). A bioactive sesquiterpene from *Bixa orellana*. *Journal of Natural Medicines*, 65(1), 206-211

ROBLES, M.; GORINSTEIN, S. (2007). Frutos tropicales mínimamente procesados: Potencial antioxidante y su impacto en la salud. *Interciencia*, 32(4), 227-232.

ROJAS, J. J.; OCHOA V. J.; OCAMPO S. A.; MUÑOZ J. F. (2006). Screening for Antimicrobial Activity of Ten Medicinal Plants Used in Colombian Folkloric Medicine: A Possible Alternative in the Treatment of Non-nosocomial Infections. *BMC Complementary & Alternative Medicine*, 17, 6-2

RUSSELL, K. R.; MORRISON, E. Y.; RAGOOBIRSINGH, D. (2005). The effect of Annatto on Insulin Binding Properties in the Dog. *Phytotherapy research*, 19(5), 433-436

SALGADO, M. T. *Microbiología de los alimentos*. 1ª edición. Manizales (Colombia): Universidad de Caldas, 2006.300p.

SHPIGEL, N. Y.; ELAZAR, S.; ROSENSHINE, I. (2008). Mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 60-55

SHILPI, J.A.; TAUFIQ-UR-RAHMAN; UDDIN, S.J.; ALAM, S.; SADHU, S.K.; SEIDEL, V. (2006). Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(2), 264-271

SINGH BAIS, R. (2014). Antibacterial activity of the ethanolic leaves extract of *Bixa orellana*. *World Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 3(9), 389-394

SMILIN BELL ASEERVATHAM, G.; SHAMNA, R.; SANGEETHA, B.; SASIKUMAR, J. M. (2012). *In vivo* antioxidant activity of bark extract of *Bixa orellana* L. against acetaminophen- induced oxidative stress. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), S700-S705

SMITHSONIAN TROPICAL RESEARCH INSTITUTE. *Bixa orellana* L. [En línea] http://biogeodb.stri.si.edu/herbarium/species/15493/?search_key=bixa+orellana Julio 2014

SORIANO, J. M.; FONT, G.; MOLTÓ, C.; MAÑES, J. (2002) Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. *Food Science & Technology*, 13, 60-64

TAMIL SELVI, A.; DINESH, M. G.; SATYAN, R. S.; CHANDRASEKARAN, B.; ROSE, C. (2011). Leaf and seed extract of *Bixa orellana* L. exert antimicrobial activity against bacterial pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01(09), 116-120

TANAKA, T. (2006). Reproductive and neurobehavioural toxicity study of tartrazine administered to mice in the diet. *Food and Chemical Toxicology*, 44(2), 179-187

VENUGOPALAN, A.; GIRIDHAR, P. (2012). Bacterial growth inhibition potential of annatto plant parts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), S1879-S1882

VIUDA-MARTOS, M.; CIRO-GÓMEZ, G. L.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; ZAPATA-MONTOYA, J. E.; SENDRA, E.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. (2012). *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of extracts from annatto (*Bixa orellana* L.) leaves and seeds. *Journal of Food Safety*, 32, 399-406

YONG, Y. K.; ZACARIA, Z. A.; ARIFAH, A. K.; SOMCHIT, M. N.; CHENG LIAN, G. E.; AHMAD, Z. (2013). Chemical constituents and antihistamine activity of *Bixa orellana* leaf extract. *BMC Complementary & Alternative Medicine*, 13, 32 doi: 10.1186/1472-6882-13-32

YONG, Y. K.;SULAIMAN. N.; HAKIM, M. N.; LIAN, G. E.; ZACARIA, Z. A.; OTHMAN, F.; AHMAD, Z. (2013). Suppressions of Serotonin-Induced increased vascular permeability and leukocyte infiltration by *Bixa orellana* leaf extract. *BioMed Research International*, 2013 (ID 463145)

YOUSEF, A. E.; CARLSTROM, C. *Microbiología de los alimentos: Manual de laboratorio*. 1ª edición. Zaragoza (España): Acribia, 2006. 320p.

ZHAI, B.; CLARK, J.; LING, T.; CONNELLY, M.; MEDINA-BOLIVAR, F.; RIVAS, F. (2014). Antimalarial evaluation of the chemical constituents of hairy root culture of *Bixa orellana* L. *Molecules*, 19, 756-766