



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

**“Capacidad antioxidante y efecto hemolítico de metabolitos presentes
en extractos de *Justicia spicigera*”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:
FERNANDA LAILA GUZMÁN GALLARDO

Directora de Tesis
DRA. MARÍA DEL CARMEN VALADEZ VEGA

Codirector
DR. JOSÉ ROBERTO VILLAGÓMEZ IBARRA

San Agustín Tlaxiaca y Mineral de la reforma, Hgo.

Abril 2023



Mineral de la Reforma, Hgo., a 17 de abril de 2023

Número de control: ICBI-D/378/2023
 Asunto: Autorización de impresión.

**MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
 DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Con fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio le comunico que el Jurado asignado a la Pasante de la Licenciatura en Biología **Fernanda Laila Guzmán Gallardo**, quien presenta el trabajo de titulación "**Capacidad antioxidante y efecto hemolítico de metabolitos presentes en extractos de Justicia spicigera**", después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente Dra. Liliana Mireya Aguilar Castro

Secretario: Mtro. Manuel González Ledesma

Vocal 1: Dra. María del Carmen Valadez Vega

Vocal 2: Dr. José Roberto Villagómez Ibarra

Vocal 3: Mtra. María del Carmen González Rodríguez

Suplente 1: Dr. Jesús Martín Torres Valencia

Suplente 2: Dr. Raúl Velasco Azorsa

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
 "Amor, Orden y Progreso"

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval
 Director del ICBI



OAAS/YCC



Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
 Carboneras. Mineral de la Reforma, Hidalgo,
 México. C.P. 42184
 Teléfono: 771 71 720 00 ext. 2231 Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Licenciatura en Biología por haberme enseñado tanto de esta maravillosa vida, por modificar mi manera de pensar, y por hacerme una persona más consciente hacia nuestro increíble planeta, también por ayudarme a encontrar mis más grandes pasiones. Me siento afortunada de haber encontrado excelentes docentes, que fomentaron mi gusto hacia esta ciencia tan noble. Así mismo quiero agradecer a mi papá que siempre estuvo presente apoyándome, sé que le hubiera encantado verme llegar hasta este punto de mi vida., a mi mamá-abuela, a mis tías Alicia y Gabriela Guzmán por guiarme y brindarme un apoyo incondicional toda mi vida, agradezco a mi familia en general, porque gracias a las condiciones en las que crecí, se creó mi seguridad e hicieron que no le tuviera miedo a nada. Igualmente, al Dr. Roberto Villagómez por darme el consejo y brindarme las herramientas necesarias para realizar esta tesis, a la Dra. Carmen Valadez por haberme enseñado tanto, por su paciencia, por sus enojos, y por cada gesto que tuvo conmigo en el tiempo de la realización de este trabajo, a pesar de lo complejo que fue, mis ganas por ser investigadora aumentaron., al Dr. Raúl Velasco por brindarme muchos conocimientos en la parte química, y darme buenos consejos, sin duda fue una pieza clave para este trabajo, a la Mtra. Belinda Velázquez por enseñarme a trabajar en laboratorio y terminar siendo amigas., a la enfermera Paty por haberme ayudado tantas veces a sacar sangre para mis muestras, a mis amigos que estuvieron siempre apoyándome y motivándome, quiero agradecer a cada persona que estuvo presente en los días que hacía esta investigación, no importa si las acciones fueron pequeñitas, cada acción positiva, tuvo un impacto en esta investigación.

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	9
2	ANTECEDENTES.....	11
2.1	Muicle.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 1	Clasificación taxonómica de <i>Justicia spicigera</i> (Baqueiro y Guerrero, 2014).....	12
2.2	Género <i>Justicia</i>	12
2.3	Historia y usos tradicionales.....	¡Error! Marcador no definido.
2.4	Estudios biológicos del género <i>Justicia</i>	14
2.5	Compuestos antioxidantes.....	15
2.6	Compuestos fenólicos.....	16
Figura 1	Estructura química del fenol.....	16
Figura 2	Estructuras químicas de compuestos fenólicos simples.....	16
Tabla 2	Ácidos fenólicos.....	17
2.7	Flavonoides.....	17
Figura 3	Estructura básica de flavonoides.....	18
2.8	Taninos.....	18
2.9	Antocianinas.....	19
3	JUSTIFICACIÓN.....	20
4	HIPÓTESIS.....	21
5	OBJETIVOS.....	21
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1	Diseño y tipo de estudio.....	22
6.2	Material vegetal.....	22
6.2.1	Colecta.....	22
6.2.2	Deshidratación de las muestras.....	23
6.2.3	Trituración y pulverización.....	23
6.3	Obtención de los extractos.....	23
6.4	Cuantificación de metabolitos en los extractos.....	23
6.4.1	Taninos.....	23
6.4.2	Fenoles totales.....	24
6.4.3	Flavonoides.....	24
6.4.4	Antocianinas.....	25
6.4.5	Saponinas.....	26

6.5	Capacidad antioxidante	26
6.5.1	Método ABTS•+.....	26
6.5.2	Método DPPH•.....	27
Tabla 3	Concentraciones utilizadas en los ensayos de ABTS•+ y DPPH•.....	28
6.6	3.67.....	28
6.7	Estudio biológico.....	28
6.7.1	Capacidad hemolítica	28
Tabla 4	Concentraciones ocupadas en la prueba hemolítica	29
6.8	Purificación y caracterización de metabolitos secundarios.....	30
6.9	Análisis estadísticos	30
7	RESULTADOS.....	31
7.1	Taninos.....	31
7.2	Fenoles	31
7.3	Flavonoides	31
Tabla 5	Polifenoles en extractos de <i>Justicia spicigera</i>	32
7.4	Antocianinas.....	32
7.5	Saponinas	32
7.6	Capacidad antioxidante	32
Tabla 6	Capacidad antioxidante en extractos de <i>Justicia spicigera</i>	33
7.7	Capacidad hemolítica	33
Tabla 7	Dosis media hemolítica	34
Figura 4	Capacidad hemolítica de los extractos de metanol de <i>Justicia spicigera</i>	35
Figura 5	Capacidad hemolítica de los extractos de Acetato de etilo de <i>Justicia spicigera</i>	35
7.8	Compuesto aislado	36
Figura 6	Espectro de RMN de 1H (DMSO-d6) a 400 MHz de fracción 5	
Tabla 8	Datos de espectro de RMN y comparación con artículo	37
8	DISCUSIÓN	38
8.1	Análisis fitoquímico de los extractos de <i>Justicia spicigera</i>	38
8.2	Cuantificación de metabolitos en los extractos	38
8.2.1	Taninos.....	38
8.2.2	Fenoles totales	39
8.2.3	Flavonoides	40
8.2.4	Antocianinas.....	41

8.2.5	Saponinas	42
8.2.6	Capacidad antioxidante	43
8.3	Kaempferitrina aislada del extracto de <i>Justicia spicigera</i>	44
8.4	Estudio biológico.....	47
8.4.1	Capacidad hemolítica	47
9	CONCLUSIÓN	50
10	Referencias:.....	51
11	Anexos.....	58

Resumen:

La planta *Justicia spicigera* o mejor conocida como “Muicle”, ha sido utilizada en la medicina tradicional durante varios siglos; las personas a lo largo de la historia, lo han usado para curar padecimientos como cólicos menstruales, dolores de estómago, diarrea, “anemia”, fiebre y afecciones de la piel; aunado a lo anterior, estudios científicos han demostrado dichas propiedades medicinales además de demostrar regulación de los niveles de azúcar en sangre, actividad ansiolítica, citotóxica, antioxidante y antimicrobiana. Por otro lado, se ha reportado que diferentes especies del género *Justicia* tienen propiedades medicinales y esto se debe a la presencia de sus metabolitos secundarios. El objetivo de este trabajo fue cuantificar e identificar el contenido de familias de metabolitos secundarios de *Justicia spicigera* a partir de los extractos de hoja, flor y tallo, obtenidos en metanol (MeOH) y acetato de etilo (AcOEt), además la evaluación de su capacidad antioxidante, así como el efecto hemolítico de los extractos con la finalidad de conocer efectos en la membrana celular que permita relacionar o entender las actividades biológicas descritas. Se obtuvieron 6 extractos y se clasificaron de la siguiente manera: HM= Hoja-MeOH, FM= Flor-MeOH, TM= Tallo-MeOH, HA= Hoja-AcOEt, FA= Flor-AcOEt, TA= Tallo-AcOEt; con los que se identificaron y cuantificaron principalmente compuestos fenólicos, ya que estos comprenden en su mayoría los agentes antioxidantes; se realizaron las pruebas para taninos condensados, fenoles totales, flavonoides, antocianinas y una prueba cualitativa para saponinas. La prueba de taninos obtuvo los siguientes rangos: 0.02 ± 0.002 - 0.22 ± 0.002 mg EC/100 g, en flavonoides los resultados variaron entre 5.59 ± 1.52 y 47.45 ± 0.58 mg QRC/g, en la prueba de fenoles totales se presentaron valores entre 13.06 ± 0.42 y 65.66 ± 0.33 mg EAG/g, se cuantificaron pocas antocianinas en comparación a las reportadas en otras plantas, el rango fue de 0.003 ± 0.049 a 0.95 ± 0.41 mg / 100 g. La capacidad antioxidante fue medida por las pruebas ABTS y DPPH•, sus resultados fueron entre (18.78 y 80.76 mg ET/g) y (3.26 y 30.68 mg ET/g) respectivamente. En la prueba de hemólisis, la DH50 de los extractos estuvo en un rango entre 62.60 ± 2.38 y 468.07 ± 8.29 µg/mL, los extractos más tóxicos para los eritrocitos fueron los de AcOEt. A partir del extracto metanólico de hojas, se realizaron análisis cromatográficos en placa fina de fase normal, lo que evidenció la presencia de fracciones mayoritarias que fueron posteriormente separadas por cromatografía en columna y se aisló un compuesto el cual a través de RMN, se observó que la estructura correspondía a un flavonoide glicosilado, llamado kaempferitrina. Es importante el estudio fitoquímico de las plantas de uso tradicional como lo es *Justicia spicigera* a la que se le han atribuido efectos benéficos; sin embargo, es necesario realizar estudios con bases científicas que aseguren el uso de esta planta.

Abstract:

The *Justicia spicigera* plant or better known as 'Muicle', has been used in traditional medicine for several centuries; people throughout history have used it to cure diseases such as menstrual cramps, stomach pains, diarrhea, "anemia", fever and skin conditions; in addition to that, scientific studies have demonstrated such medicinal properties, on top of that demonstrating regulation of blood sugar levels, anxiolytic, cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activity. On the other hand, different species of the genus *Justicia* have been reported to have medicinal properties and this is due to the presence of their secondary metabolites. The objective of this work was to quantify and identify the content of families of secondary metabolites of *Justicia spicigera* from the leaf extracts, flower and stem, obtained in methanol (MeOH) and ethyl acetate (AcOEt), in addition to the evaluation of its antioxidant capacity, as well as the hemolytic effect of the extracts in order to know effects on the cell membrane that allows to relate or understand the biological activities described. 6 extracts were obtained and classified as follows: HM= Hoja-MeOH, FM= Flor-MeOH, TM= Tallo-MeOH, HA= Hoja-AcOEt, FA= Flor-AcOEt, TA= Tallo-AcOEt; with which phenolic compounds were identified and quantified, since these include mostly antioxidant agents; tests were performed for condensed tannins, total phenols, flavonoids, anthocyanins and a qualitative test for saponins. The tannin test obtained the following ranges; 0.02 0.002 - 0.22 0.002 mg EC/100 g, in flavonoids the results varied between 5.59 1.52 and 47.45 0.58 mg QRC/g, in the total phenol test values between 13.06 0.42 and 65.66 0.33 mg EAG/g were presented, few anthocyanins were quantified compared to those reported in other plants, the range was 0.003 0.049 and 0.95 0.41 mg / 100 g. The results of antioxidant capacity in the ABTS test were between 18.78 and 80.76 mg ET/g. While for DDPH, the range was 3.26 and 39.68 mg ET/g. Kaempferitrin was identified by means of normal phase fine plate chromatography analysis via RMN. This is a majority compound that comes from kaempferol glycolysis. There is ethnobiological information of medicinal plants such as *Justicia spicigera*, to which beneficial effects have been attributed, so it is necessary to do studies with scientific bases that ensure the proper use of this plant.

1 INTRODUCCIÓN.

Las plantas medicinales han sido utilizadas en diferentes culturas al rededor del mundo, México ocupa el segundo lugar a nivel global sobre conocimiento herbolario (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT, 2021). Según la Secretaría de Salud (2021), el 90% de la población mexicana ha llegado a utilizar mínimo una de las 4,500 plantas medicinales que tiene México registradas, y esto es debido al conocimiento ancestral que aún prevalece en algunas personas de ciertas zonas y comunidades indígenas de nuestro país.

El Instituto Médico Nacional (IMN) fue un centro de investigación que trabajó en México de 1888 a 1915 (Marcial, 2007) donde se centraron en estudiar plantas con propiedades medicinales. Se contaba con un archivo herbario de diez mil ejemplares, de los que se habían realizado análisis químicos en dos mil, en 1915 IMN pasó a formar parte de la Dirección de Estudios Biológicos (Cuevas-Cardona, 2010), esto delimitó el interés de las especies vegetales restantes.

En el último siglo se han realizado diversas investigaciones científicas en plantas, para evaluar la presencia de metabolitos secundarios que estas contienen; muchos de ellos han demostrado tener efectos biológicos en humanos, presentando funciones antibacterianas, antihepatotóxicas, antioxidantes, antivirales, antitumorales, fungicidas, inmunoestimulantes, entre otras (Pérez y Jiménez, 2011).

Se sabe que uno de los principales factores para el desarrollo de enfermedades es el estrés oxidativo, por lo cual, existe un creciente interés por investigar compuestos químicos con capacidad antioxidante, ya que pueden impedir la oxidación de moléculas mediante transferencia de electrones, previniendo patologías y ayudando a mantener la regulación del sistema nervioso, endocrino e inmunológico (Liguori et al, 2018).

El estrés oxidativo es promovido por radicales libres, estas moléculas son originadas por ruptura “homolítica” a causa de un aporte de energía química, luminosa o térmica, quedando un electrón desapareado en su último orbital, lo que les confiere una inestabilidad y capacidad de reacción muy elevada (Hajhashemi et al, 2010), se pueden formar a partir de diferentes moléculas, pero los derivados de la molécula del oxígeno son los de mayor importancia en patologías humanas (Valverde et al, 2000). El oxígeno es un elemento muy reactivo y al ser

utilizado constantemente en el metabolismo, sobre todo en la generación de ATP, se forman sus radicales libres, los cuales son eliminados naturalmente por los antioxidantes presentes en el organismo, cuando existe un desequilibrio en la producción de estos y no se eliminan adecuadamente, pueden ocasionar daños reversibles o irreversibles, conllevando a la aparición de diversas enfermedades (Cornelli, 2009).

Los compuestos fenólicos presentes en especies vegetales, constituyen un amplio grupo de sustancias químicas que pueden ser donantes de electrones por lo que se consideran antioxidantes, así mismo, juegan una serie de funciones metabólicas en las plantas, sobre todo, durante el crecimiento y reproducción; también las protegen contra el estrés y patógenos externos, como la radiación UV y los depredadores, además les contribuyen de diferentes maneras, como en la pigmentación, sabor y olor (Creus, 2004).

En investigaciones fitoquímicas, se analiza la capacidad antioxidante de las plantas a estudiar mediante diversas pruebas, con el fin de evaluar algún posible uso dentro de la medicina.

La infusión de hojas de Muicle tiene una pigmentación fucsia, esta coloración principalmente podría deberse a compuestos fenólicos presentes en la planta, su concentración puede variar dependiendo la parte morfológica en la que estos se encuentren debido a su función fisiológica; por lo que el presente trabajo analiza taninos, flavonoides y antocianinas presentes en extractos orgánicos de *J. spicigera*, ya que son metabolitos polifenólicos; se determinó la presencia de fenoles totales y saponinas, capacidad antioxidante, capacidad hemolítica y el aislamiento de un flavonoide glicosilado llamado kaempferitrina, ya que estos compuestos han sido asociado con propiedades antitumorales e inmunomoduladoras (Castro et al, 2012; Fernández et al, 2018), antidiabéticas (Ortiz et al, 2012), anticonvulsivo (González et al, 2017) y con actividad ansiolítica (García et al, 2019).

Actualmente, según datos del herbario del IMSS, de las aproximadamente 3,000 a 4,500 (estimadas) plantas medicinales que tiene registradas, solamente se le han hecho análisis farmacológico al 5% (SEMARNAT, 2021), por lo que es importante seguir analizando estos sorprendentes organismos, pues podrían encontrarse significativos descubrimientos para la medicina.

2 ANTECEDENTES

2.1 Muicle

Justicia spicigera, mostrada en la Figura 1, perteneciente al grupo de las angiospermas, incluye arbustos erectos a escandentes, comúnmente de 1 a 1.5 m, a veces hasta 5 m de alto; tiene hojas simples ovado-elípticas a elípticas; inflorescencias en forma de panículas de espigas, sus flores tubulares tienen corolas fuertemente zigomorfas, bilabiadas y anaranjadas; sus frutos son cápsulas con cuatro semillas lenticulares (Daniel y Acosta, 2003; Gibson 1974), sus principales polinizadores son colibríes, abejas y algunas mariposas. Se ha encontrado en áreas de vegetación perturbada, bosques tropicales, caducifolios y semi deciduos, es tolerante a leves sequías y puede llegar a tolerar temperaturas cercanas a 0°C. Es una planta endémica de Mesoamérica, que crece desde México hasta el sur de Colombia, en México se localiza en los estados de Campeche, Chiapas, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, Veracruz y Yucatán como aparece en la Figura 2. En la Tabla 1 se muestra su clasificación taxonómica, sin embargo, coloquialmente es conocida como Muicle, muitle, hierba tinta, añil de piedra, moyotli o moyotle dependiendo la zona en la que se encuentre (Agüero y Alba, 2010).



Figura 1 *Justicia spicigera*.

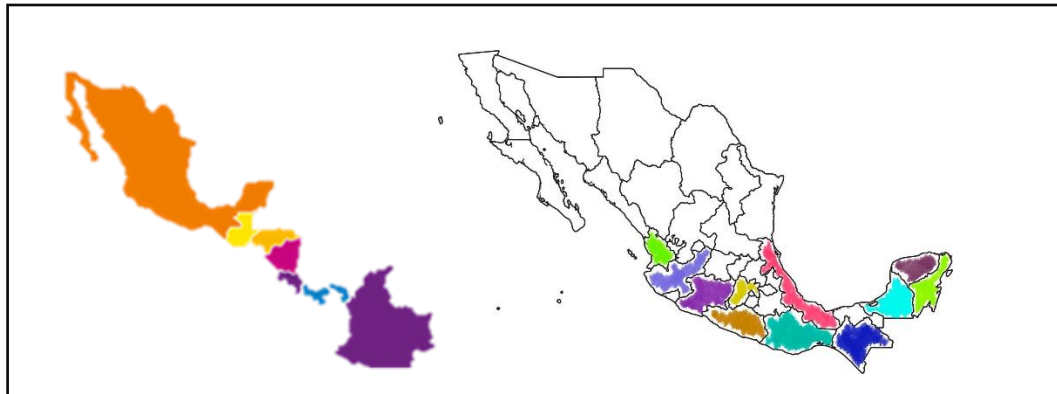


Figura 2 Distribución geográfica de *J. spicigera* en Latinoamérica y México.

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *Justicia spicigera* (Baqueiro y Guerrero, 2014)

Taxonomía	
Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Lamiales
Familia:	Acanthaceae
Subfamilia:	Acanthoideae
Género:	<i>Justicia</i>
Especie:	<i>Justicia spicigera</i>

2.2 Género *Justicia*

El género *Justicia* es cosmopolita, con cerca de 700 especies es el más grande y complejo de la familia Acanthaceae. Su mayor riqueza se presenta en los trópicos y subtrópicos del Nuevo Mundo (Villanueva-Espinoza y Condo, 2019), y este también el género más grande de la familia en México, donde se han registrado al menos 90 especies (Daniel y Acosta-Castellanos, 2003). Las características más destacadas del género son: corola bilabiada, labio superior rugulado, 2 estambres con anteras bitecas y sin estaminodios, una cápsula con cuatro

semillas, y presencia de cistolitos en las hojas (Daniel y Acosta-Castellanos, 2003; Villanueva-Espinoza R.M. y Condo, F.M. 2019).

Varias especies de *Justicia* son ampliamente utilizadas en medicina popular para el tratamiento de enfermedades respiratorias y gastrointestinales, así como inflamación. Las diferentes plantas de este género han sido utilizadas en diferentes regiones de Latinoamérica por sus efectos sobre el sistema nervioso central algunas como alucinógenos, agentes somníferos, sedantes, depresores, tratamientos para la epilepsia entre otros trastornos mentales (Mpiana y Kitadi 2019). Otras especies y entre ellas *Justicia spicigera* son popularmente utilizadas en el tratamiento del dolor de cabeza, fiebre, cáncer, diabetes, afecciones de la piel y VIH (Corrêa y Alcántara, 2012).

2.3 Antecedentes de la especie *Justicia spicigera*.

El uso de la planta *Justicia spicigera* es variado, los primeros registros datan en el siglo XVI cuando Francisco Hernández relató que se empleaba para tratar la disentería, gonorrea, escabiosis, temperatura y para las metrorragias. En el siglo XX, Maximino Martínez citó que la planta era utilizada para problemas gastrointestinales, epilepsia, escabiosis, para regular el sistema hormonal de la mujer, controlar la anemia y azúcar en la sangre (Agüero y Alba 2010). En el siglo XV en los pueblos indígenas de Oaxaca, algunas mujeres ya usaban el Muicle para teñir sus telas lo que resultó ser una parte importante para su economía (Agüero y Alba 2010). En la localidad de Zacualtipán Hidalgo, han usado esta planta para la anemia y para curar el “espanto” en infantes, también para tratar la “sarna” en perros (N. García, comunicación personal, marzo 2022).

Un estudio etnobiológico argumenta que una infusión de *J. spicigera* en combinación con *Arnica montana*, *Hippocratea excelsa*, *Amphipterygium adstringens* y *Tecoma stan*, se usa en la terapia alternativa/complementaria en pacientes ceropositivos al virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Vega, et al, 2012).

Por otro lado, según el conocimiento tradicional, su infusión es un potente regenerador de la sangre, si se bebe regularmente puede ayudar a eliminar la anemia; también la han usado para

combatir la diabetes y las diarreas de diferentes orígenes, ya que es desintoxicante, digestivo, antipirético y antibiótico (González, 2018).

Se tiene información de qué extractos hidroalcolicos del Muicle pueden actuar como agentes antimicrobianos, ya sea para enjuague bucal o desinfección de heridas, estimula el sistema inmunológico, sus hojas poseen propiedades fluidificantes que favorecen la secreción de mucosidad producida en el sistema respiratorio por bacterias o virus, y es sumamente efectivo para despejar las vías respiratorias mediante vaporizaciones (SEMARNAT, 2021).

Investigaciones del Centro Universitario de los Lagos Jalisco (García et al, 2019), describen que esta planta puede fungir como tratamiento contra la depresión y la ansiedad, debido a que en personas han disminuido emociones de tristeza, así como también síntomas emocionales asociados con la menopausia e irritabilidad.

2.4 Estudios biológicos del género *Justicia*

En estudios científicos de plantas del género *Justicia* (Corrêa y Alcântara, 2012), las propiedades del extracto etanólico de *Justicia nesii* Ramamoorthy, demostró capacidad anticancerígena contra el linfocítico P388 leucemia en ratones. El extracto metanólico de la planta de *Justicia procumbens* L. mostró inhibición significativa *in vivo* contra la leucemia linfocítica P-388 crecimiento y citotoxicidad *in vitro* en el 9-KB (humano carcinoma nasofaríngeo) ensayo de cultivo celular (Chen et al, 1995). Algunas especies como *Justicia ciliata* y *Justicia spicigera* también presentaron inhibición de líneas celulares de cáncer humano, principalmente hacia carcinomas del cuello uterino humano en líneas celulares T 47D y HeLa, así como también hubo un efecto benéfico por parte de *Justicia rhodoptera* sobre la línea celular de cáncer de ovario humano y la prevención del crecimiento de algunas células tumorales por parte de *Justicia patentiflora*. Hay estudios que describen la capacidad de *Justicia procumbens*, *Justicia nesii* y *Justicia specigera* como agentes anticancerígenos; sin embargo, las propiedades anticancerígenas de *Justicia adhatoda*, han aún no ha sido confirmadas farmacológicamente (Chen et al, 1995).

2.5 Compuestos antioxidantes

Los radicales libres son especies químicas derivadas de una ruptura homolítica, que a diferencia de otras especies químicas como los cationes y aniones (productos de ruptura heterolítica), son más reactivos e inducen reacciones en cadena que derivan en la oxidación. En los seres vivos los radicales libres son resultado de la adaptación de un mecanismo adaptativo creado a lo largo de la evolución para que las células pudieran utilizar el oxígeno, ya que este es un elemento altamente reactivo y a pesar de ser tóxico para muchos organismos, incluidos los humanos es indispensable (Buechter, 1988). Las especies reactivas de oxígeno (ROS), son un subconjunto de radicales libres que contienen oxígeno, se crean como consecuencia de la producción de trifosfato de adenosina (ATP) por parte de las mitocondrias, así como en la respuesta celular a xenobióticos, citocinas e invasión bacteriana (Ray et al, 2012); juegan un papel doble como compuestos tóxicos y beneficiosos. Su toxicidad comienza cuando sobrepasan el sistema de defensa antioxidante natural (Free radicals vs reactive oxygen species, 2021); pero, paradójicamente, evidencia científica indica que las ROS también regulan varias vías de señalización afectando varios procesos celulares, como la proliferación, el metabolismo, la diferenciación, supervivencia, antiinflamatoria, respuesta antioxidante y al daño del ADN (Ray et al, 2012). El delicado equilibrio entre sus dos efectos antagónicos es claramente un aspecto importante de la vida.

Las células están protegidas contra el estrés oxidativo por una red interactiva de enzimas antioxidantes, estas moléculas son estables, tienen bajo peso molecular, lo que les confiere de manera segura poder donar un electrón a las ROS y neutralizarlas para así reducir su capacidad de daño hacia moléculas vitales, además estimulan el sistema inmunológico y suelen tener efecto sinérgico (Lobo et al, 2010). Los antioxidantes pueden ejercer su efecto sobre los sistemas biológicos mediante diferentes mecanismos, como la quelación de iones metálicos, la donación de electrones o la regulación de la expresión génica (Krinsky, 1992). Existen dos tipos de antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos; los primeros se producen durante el metabolismo celular de manera natural (Shi et al, 1999); mientras que los no enzimáticos se les encuentra en diversos alimentos, como verduras, frutas, legumbres, tubérculos, semillas, algunas carnes, entre otros, su aporte es suficiente si se consumen con frecuencia (Carlsen et al, 2010).

2.6 Compuestos fenólicos

Para comprender la estructura química de los compuestos fenólicos es importante comenzar explicando que el fenol es una molécula que se compone de un anillo aromático (fenil) unido a un grupo hidroxilo (OH) (Figura 3).

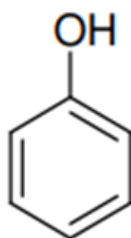


Figura 3 Estructura química del fenol.

Los fenoles simples son compuestos que tienen dos (en las posiciones 1,2, 1,3 o 1,4) o tres (en las posiciones 1,3,5 o 1,2,3) grupos hidroxilo en el anillo aromático, existen diferentes tipos como se muestra en la figura 4.

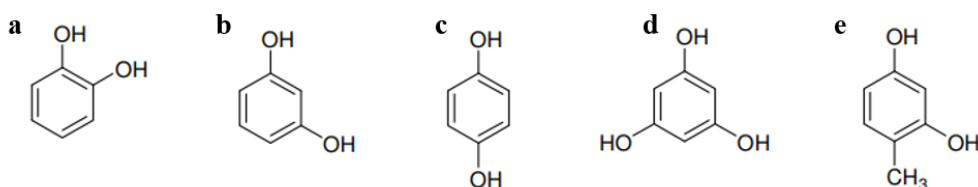
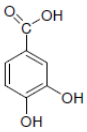
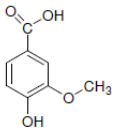
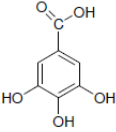
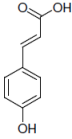
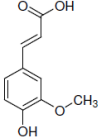
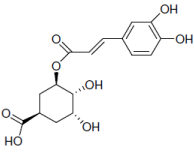


Figura 4 Estructuras químicas de compuestos fenólicos simples.

a) catecol b) resorcinol c) hidroquinona d) phloroglucinol e) 4-methylresorcinol

Los ácidos fenólicos consisten en dos grupos (Tabla 2): Ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos; los hidroxibenzoicos son compuestos que presentan un grupo carboxílico (grupo ácido) y uno o más grupos hidroxilo en un anillo aromático, mientras que los hidroxicinámicos son ácidos fenólicos que se caracterizan por la presencia del grupo $\text{CH} = \text{CH}-\text{COOH}$ en remplazo del grupo COOH presente en los ácidos hidroxibenzoico. El doble enlace carbono ($\text{C} = \text{C}$) de la cadena aumenta la resonancia química, por lo que aumentan la capacidad antioxidante de la molécula, debido a la deslocalización de los electrones en los enlaces que estabilizan los radicales libres, además han mostrado actividad antígenotóxica y antiproliferativa en células.

Tabla 2 Ácidos fenólicos.

Ácidos hidroxibenzoicos			Ácidos hidroxicinámicos		
a	b	c	x	y	z
					

a) ácido protocatéquico, b) ácido vainílico, c) ácido gálico, x) ácido p-cumárico, y) ácido ferúlico, z) ácido clorogénico

2.7 Flavonoides

Los flavonoides son un tipo de polifenoles presentes en plantas, y son los compuestos responsables del color de las flores y frutas, de hecho, el término flavonoide viene del latín "flavus", que significa amarillo, ya que muchos flavonoides purificados son de color amarillo (Peñarrieta et al, 2014).

La estructura química básica de los flavonoides (figura 5) consiste en un esqueleto carbonado C6-C3-C6, donde los componentes C6 son anillos aromáticos unidos por tres átomos de carbono que pueden formar o no un tercer anillo pirano o pirona (anillos A-C) (Castro, 2003). Las distintas clases de flavonoides se diferencian en la concentración de saturación en los sustituyentes de los anillos A, B y C, así se han llegado a encontrar alrededor de 9000 flavonoides naturales, los cuales se dividen en varios grupos según sus diferencias estructurales, por lo que se han clasificado en antocianinas, flavonas, flavonoles, flavanonas, chalconas, auronas, flavanos y proantocianidinas (Martínez et al, 2002). La actividad antioxidante depende de la estructura química del flavonoide, de la posición y número de sustituciones en el núcleo del flavonoide y en el anillo (Pietta, 2000).

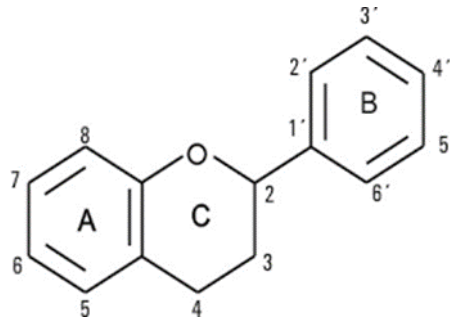


Figura 5 Estructura básica de flavonoides

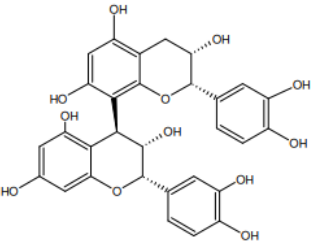
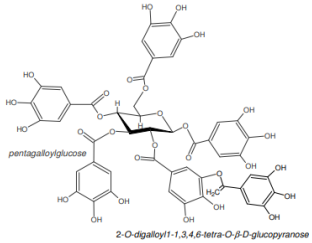
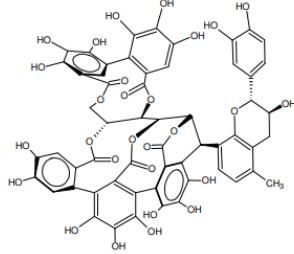
2.8 Taninos

Los taninos son compuestos fenólicos que poseen al menos un grupo hidroxilo (-OH) en uno o más anillos fenólicos, tienen la particularidad de que se unen a las proteínas mediante fuerzas covalentes y no covalentes (Peñarrieta et al, 2014).

Según Quideau et al, (2003), se clasifican en tres grupos de acuerdo a su estructura química (Tabla 3):

- **Taninos condensados:** son derivados de flavan-3-ol se encuentran como monómeros, así como unidades estructurales en las cadenas que van desde proantocianidina catequina y / o dímeros derivados de catequina a polímeros de mayor tamaño.
- **Taninos hidrolizables:** Los taninos hidrolizables consisten principalmente en elagitaninos no conjugados, galotaninos y ácido elágico, o formas conjugadas del ácido gálico.
- **Taninos complejos:** Contienen unidades de catequina unidas a galotaninos o elagitaninos, se ha comprobado que los productos del añejamiento en el vino tinto se deben a la reacción entre catequinas de las uvas y galotaninos, formando estos taninos complejos. Estos compuestos han demostrado inhibir el crecimiento de células cancerígenas, y es considerado un posible precursor para el desarrollo de nuevos medicamentos.

Tabla 3 Ejemplos estructurales de los diferentes tipos de taninos.

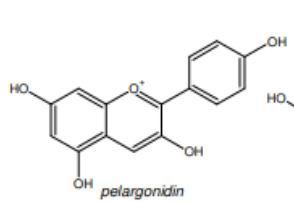
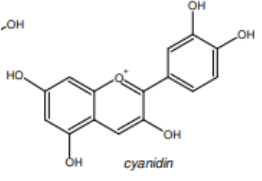
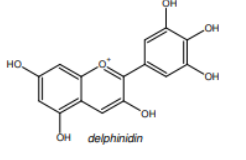
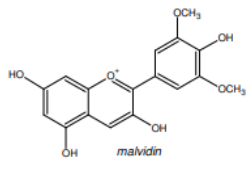
Taninos condensados	Taninos hidrolizables	Taninos complejos
<p style="text-align: center;">a)</p> 	<p style="text-align: center;">b)</p>  <p style="text-align: center;">pentagalloylglucose 2-O digalloyl-1,3,4,6-tetra-O-β-D-glucopyranose</p>	<p style="text-align: center;">c)</p> 

a) procyanidina B2, b) galotanino, c) acutissimina A

2.9 Antocianinas

Pertencen al grupo de los flavonoides y su estructura básica es un núcleo de flavón, el cual consta de dos anillos aromáticos unidos por una unidad de tres carbonos. El nivel de hidroxilación y metilación en el anillo “B” de la molécula determina el tipo de antocianidina, que es la aglicona de la antocianina. Las más comunes en plantas son: Pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina y malvidina como se muestran en la Tabla 4. Las tres primeras son más frecuentes en frutos, y el resto lo son en flores (Aguilera et al, 2011).

Tabla 4 Tipos de antocianinas

a	b	c	d
 <p style="text-align: center;">pelargonidin</p>	 <p style="text-align: center;">cyanidin</p>	 <p style="text-align: center;">delphinidin</p>	 <p style="text-align: center;">malvidin</p>

a) pelargonidina, b) cianidina, c) delfinidina, peonidina, d) malvidina

3 JUSTIFICACIÓN

Muchas plantas son utilizadas para el tratamiento de ciertos padecimientos, esto es posible debido a los metabolitos secundarios presentes en sus diferentes órganos; sus funciones en células, van a depender de su concentración y familia a la que pertenezcan, mostrando efectos benéficos o citotóxicos. Debido a lo anterior, es importante analizar la composición fitoquímica de las plantas de uso tradicional como lo es *Justicia spicigera* que se ha utilizado en la medicina alternativa, ya que se le han atribuido efectos benéficos; sin embargo, es necesario realizar estudios con bases científicas que aseguren el uso de esta planta.

4 HIPÓTESIS

Los extractos orgánicos de *Justicia spicigera* contienen metabolitos secundarios con capacidad antioxidante y efecto citotóxico hacia células humanas.

5 OBJETIVOS

Objetivo general

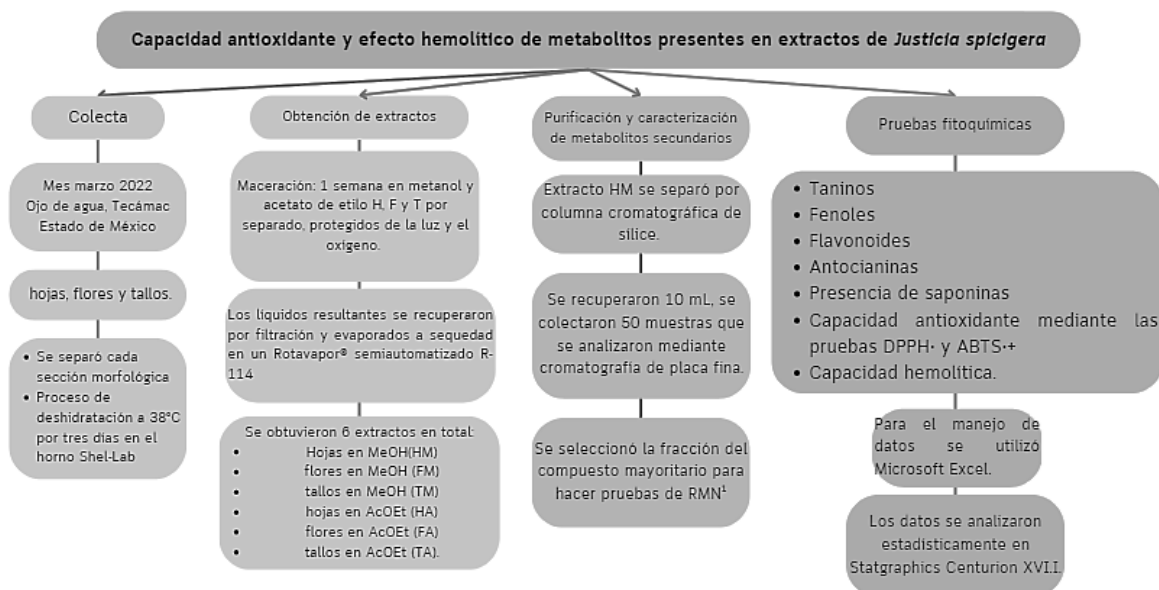
- Cuantificar la presencia de algunas familias de metabolitos, capacidad antioxidante y efecto hemolítico de extractos de *Justicia spicigera*

Objetivos específicos

- Preparar extractos con Acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH) de hoja, flor y tallo de *Justicia spicigera*.
- Cuantificar la presencia de taninos, flavonoides, fenoles, saponinas y antocianinas en los extractos de *Justicia spicigera*.
- Evaluar capacidad antioxidante de los extractos de *Justicia spicigera* mediante las pruebas DPPH• y ABTS•+.
- Evaluar el efecto hemolítico de los extractos de *Justicia spicigera* a través de la prueba hemólisis.
- Identificar el extracto con mayor efecto citotóxico hacia eritrocitos.
- Evaluar estadísticamente la correlación entre metabolitos, capacidad antioxidante y actividad hemolítica.
- Aislar, purificar y caracterizar estructuralmente al menos un metabolito secundario del extracto hojas en metanol de *Justicia spicigera*.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Toxicología del Área Académica de Medicina del Instituto de ciencias de la salud (ICSa) y en el Laboratorio 5 del Área Académica de Química del Instituto de ciencias básicas e ingeniería (ICBi) ambos pertenecientes a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), durante el periodo abril-noviembre del 2022.



6.1 Diseño y tipo de estudio

Estudio experimental longitudinal.

6.2 Material vegetal

6.2.1 Colecta

La planta *Justicia spicigera* fue recolectada en el mes de marzo del 2022, en la localidad de Ojo de agua, Tecámac Estado de México; con las coordenadas 19.678924465617854, -99.03296149485094. Se colectaron las hojas, flores y tallos en tiempo de floración.

6.2.2 Deshidratación de las muestras

Una vez recolectada la planta se separó cada sección morfológica para someterla a un proceso de deshidratación a 38°C por tres días en el horno Shel-Lab (EX6 ZZMFG Sheldon Manufacturing, INC, USA).

6.2.3 Trituración y pulverización

Después de la deshidratación de las secciones morfológicas de la planta, se dividió el gramaje para realizar los extractos; una parte fue triturada en un molino manual (Grano Cuerpo Hierro Estañado Wolfox Wf2541, México) y otra parte pulverizada en un molino eléctrico (Analytical mill, 4301-00, Cole Palmer. IL USA), posteriormente fue almacenada en bolsas herméticas a temperatura ambiente.

6.3 Obtención de los extractos

Para los extractos, se realizó una maceración de cada parte de la planta (hoja flor y tallo) en metanol y acetato de etilo por separado, durante una semana agitándolos esporádicamente, protegidos de la luz y el oxígeno. Transcurrido el tiempo, todos los líquidos resultantes fueron recuperados por filtración con papel filtro cualitativo grado 601 (Ahlstrom, Finlandia) y evaporados a sequedad en un Rotavapor® semiautomatizado R-114 equipado con un baño calefactor B-480 (Marshall-scientific, USA) a 65°C obteniendo los siguientes extractos: Hojas en metanol (HM), flores en metanol (FM), tallos en metanol (TM), hojas en acetato de etilo (HA), flores en acetato de etilo (FA) y tallos en acetato de etilo (TA).

6.4 Cuantificación de metabolitos en los extractos

6.4.1 Taninos

Los taninos condensados (TC) se determinaron por el método espectrofotométrico descrito por Valadez-Vega et al 2019. Para la extracción de TC a partir de los extractos metanólicos y de acetato de etilo, se pesaron 9 mg de cada uno, se añadió 2.25 ml de metanol, se agitaron una hora y a continuación se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos.

De cada extracto se tomaron 250 μ L de los sobrenadantes de las extracciones, se les añadió 1.25 mL de vainillina al 0.5 % en metanol acidificado al 8 % y se dejaron reaccionar por 45 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 500 nm en el lector de microplacas Epoch (BioTek). Se preparó una curva de calibración con +catequina (Sigma-Aldrich, USA) como estándar, a las concentraciones de 0, 0.08, 0.16, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 mg/mL. Los resultados se reportaron como miligramos equivalentes de catequina por 100 gramos de muestra (mg EC/100 g), el ensayo se realizó por triplicado.

6.4.2 Fenoles totales

El contenido de fenoles totales fue determinado por el método Folin-Ciocalteu, cuyo principio es la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu por parte del grupo de compuestos fenólicos (Figuroa et al, 2018). Se preparó una curva de calibración utilizando ácido gálico (Sigma-Aldrich) como estándar en agua desionizada a las concentraciones 0, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 μ g/mL. Los extractos se prepararon disolviendo para cada muestra 200 mg en 5 mL de etanol. Para la cuantificación, se mezclaron 100 μ L de cada concentración de la curva o de los extractos con 500 μ L de una solución de Folin-Ciocalteu (1:10, Sigma-Aldrich) y 400 μ L de una solución de carbonato de sodio al 7.5% (Sigma-Aldrich). Se dejaron reposar por 30 min en oscuridad y se realizaron las lecturas de la absorbancia a 765 nm. Los resultados fueron expresados como miligramos de equivalentes a ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g). El ensayo se realizó por triplicado.

6.4.3 Flavonoides

La prueba de flavonoides se basó en la metodología de Chang et al, (2002). Se realizó una curva de calibración para la cuantificación de flavonoides empleando quercitina como estándar a las concentraciones 0, 0.5, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/g.

Para la extracción de flavonoides de las muestras, se colocaron 20 mg de cada extracto en tubos eppendorf, se añadieron 150 μ L de etanol al 80% y se agitó 1 h. Se tomaron alícuotas de 50 μ L y se le añadieron 150 μ L de etanol al 80%, 10 μ L de $AlCl_3$ al 10% en agua, 10 μ L de acetato de potasio 1M y 280 μ L de agua destilada. Se dejaron reposar 30 minutos en

oscuridad, y se midió la absorbancia a 415 nm en el lector de microplacas Epoch (BioTek), el ensayo se hizo por triplicado.

6.4.4 Antocianinas

El contenido total de antocianinas monoméricas se cuantificó utilizando el método de pH diferencial propuesto por Wrolstad et al, (2005).

Se pesaron 10 mg de los extractos y se añadieron 1.75 mL de solución etanol-HCl al 0.2 %, las muestras se dejaron 24 h en oscuridad.

Se prepararon dos soluciones Buffer; KCl/HCl pH1 (0.025 M) y Acetato Na/HCl pH 4.5 (0.4 M). Se prepararon dos tubos con 100 µL del extracto de antocianinas, a cada uno se le añadió 3 mL de buffer, uno de pH 1 y otro de pH 4.5, se dejaron reposar 50 min en oscuridad. Posteriormente, se realizó la lectura de absorbancias a 510 nm y 700 nm en el lector de microplacas Epoch (BioTek). El ensayo se realizó por triplicado. La absorbancia final se calculó de acuerdo con la ecuación número 1:

Ecuación 1.

$$A = (A_{520\text{ nm}} - A_{700\text{ nm}})_{\text{pH1}} - (A_{520\text{ nm}} - A_{700\text{ nm}})_{\text{pH4.5}}$$

A= Absorbancia final

Para calcular el contenido de antocianinas monoméricas se utilizó la ecuación número 2.

Ecuación 2.

$$\text{Antocianina monomérica (mg/100 g)} = (A * PM * FD * 100) / (\epsilon * l)$$

Donde A es la absorbancia final, PM es el peso molecular de la antocianina mayoritaria (Peonidina 301.27 g/mol), DF es el factor de dilución y ϵ es el coeficiente de extensión molar (26 000).

6.4.5 Saponinas

Se empleó la técnica descrita por Girón en 1992, la cual se fundamenta en la lisis de glóbulos rojos; se ocupó sangre humana fresca tipo O+ de un donante sano femenino, quien firmó consentimiento informado (Anexo 1). Se emplearon 4 mL de sangre en un tubo con EDTA como anticoagulante, se mezcló con cuidado para no lisar los eritrocitos y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min. Los eritrocitos, fueron lavados y diluidos al 4 % con NaCl al 0.9 %, y se reservaron para su uso posterior.

Las saponinas presentes en los extractos de *Justicia spicigera* en metanol y acetato de etilo, se extrajeron a partir de 5 mg de cada extracto, se añadieron 500 μ L de metanol y se llevaron a un agitador orbital por 30 min, posteriormente se extrajo el sobrenadante por centrifugación, el disolvente se evaporó a sequedad en baño María y los compuestos extraídos se disolvieron en 250 μ L de NaCl 0.9%.

La identificación y cuantificación de las saponinas, se realizó en microplaca de 96 pozos de fondo “U”. En cada pozo de la microplaca se colocaron 50 μ L de NaCl (0.9 %); al primer pozo se agregaron 50 μ L de saponinas extraídas previamente y se realizaron diluciones seriadas en orden de dos en los pozos siguientes, posteriormente se adicionaron 50 μ L de la suspensión de eritrocitos y se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se prosiguió a la observación para determinar la máxima dilución que presentó hemólisis. El ensayo se realizó por triplicado.

6.5 Capacidad antioxidante

6.5.1 Método ABTS•+

Se midió la capacidad antioxidante de los extractos de *J. spicigera* por el método ABTS•+, el cual evalúa la actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), se basa en la reducción de la coloración verde/azul producida por la reacción del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS•+) con el antioxidante presente en la muestra (Zenil Lugo et al, 2018). El ABTS•+ se preparó a una concentración de 3.6 mg/mL con 6 mg de persulfato de potasio (Potassium persulfate-ACS reagent, \geq 99.0% Sigma-Aldrich Merck, USA) en 1 mL de agua desionizada, se dejó reposar durante 24 h a temperatura ambiente y

en oscuridad. Posteriormente el ABTS•+ se diluyó en etanol hasta llevarlo a una absorbancia de 0.70 ± 0.02 con una longitud de onda de 734 nm en el espectrofotómetro para microplacas Epoch™ de BioTek (USA) controlado por el Gen5™ Data Analysis Software.

Para la cuantificación, se tomaron alícuotas de 100 µL de cada extracto se le añadieron 900 µL de la solución de ABTS•+, se dejó reposar en oscuridad por 5 min y se realizó la lectura en el lector de microplacas a 734 nm. Los resultados se reportaron como miligramos equivalentes de trolox por gramo de muestra (mg ET/g). El ensayo se realizó por triplicado.

Los extractos de metanol y acetato de etilo se diluyeron en etanol para obtener las concentraciones que se muestran en la Tabla 5.

6.5.2 Método DPPH•

Este método consiste en la captación de radicales libres DPPH•, y es muy usado para determinar la capacidad antioxidante de algún organismo especialmente plantas. Su fundamento se basa en la aceptación de un electrón o átomo de hidrógeno por la molécula 1,1-difenil-2-picrilhidrazina, que en solución en metanol es de color violeta intenso (Ruiz, 2020).

Los extractos de metanol y acetato de etilo se diluyeron en etanol como se indica en la Tabla 5, se tomaron alícuotas de 100 µL de cada extracto, se le agregaron 900 µL de la solución de DPPH• al 7.5 % en etanol, se dejaron reposar 60 min en oscuridad y se realizó la lectura de absorbancia a 520 nm el lector de microplacas Epoch (BioTek).

Se preparó una curva de calibración empleando trolox como estándar. Los resultados se reportaron como miligramos equivalentes de trolox por gramo de muestra (mg ET/g). El ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 5 Concentraciones utilizadas en los ensayos de ABTS•+ y DPPH•

Extracto	Peso (mg)	Volumen de etanol (mL)	Diluciones		Concentración (mg/mL)
			Muestra (µL)	Etanol (µL)	
HM	51	10	400	1600	1.02
FM	54	10	400	1600	1.08
TM	51	10	1500	500	3.82
HA	51	10	500	1500	1.2
FA	42	11.5	500	1500	0.9
TA	49	10	1500	500	6.6 3.67

HM= Hoja en metanol, FM= Flor en metanol, TM= Tallo en metanol, HA= Hoja en acetato de etilo, FA= Flor en acetato de etilo, TA= Tallo en acetato de etilo.

6.7 Estudio biológico

6.7.1 Capacidad hemolítica

Se llevó a cabo la evaluación de la capacidad hemolítica de los extractos a través del método de hemólisis, el cual se basa en la detección por espectrofotometría de la hemoglobina que se libera de los eritrocitos, derivada del rompimiento de las membranas por acción de los compuestos tóxicos (Tramer et al, 2012).

- Preparación de eritrocitos

Se emplearon 4 mL de sangre humana fresca tipo O+ de un donante sano femenino, quien firmó consentimiento informado (Anexo 1). La sangre se depositó en un tubo con EDTA como anticoagulante, se mezcló cuidadosamente para no lizar los eritrocitos, y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min; una vez separados los eritrocitos, fueron lavados con NaCl y diluidos al 4% con un buffer de fosfatos 50 mM pH 7.4 y se reservaron para su uso en refrigeración.

- Preparación de los extractos para la prueba biológica

Para la preparación de la muestra, se pesaron 8 mg de cada extracto de metanol y acetato de etilo, se le añadieron 134 μL de dimetil sulfóxido (DMSO) y se aforó a 8 mL con NaCl al 0.9%. A partir de estas disoluciones iniciales (1 mg/mL) se prepararon las diluciones experimentales en NaCl al 0.9%, a las concentraciones que se muestran en la Tabla 6.

- Prueba de hemólisis

Se emplearon tubos Eppendorf en los que se agregaron 20 μL de suspensión de eritrocitos, los cuales fueron tratados con 1 mL de los extractos; se incubaron durante 30 min a 37°C; posteriormente, los eritrocitos se centrifugaron a 500 rpm durante 5 min. 200 μL del sobrenadante se transfirieron a una microplaca de 96 pozos fondo plano y se midió la absorbancia en un lector de microplacas Epoch (BioTek, USA) a 540 nm. Se empleó como control positivo eritrocitos tratados con Triton-X 100 al 20 %, el cual fue considerado como el 100% de hemólisis, y a partir de este se calculó el porcentaje de hemólisis de cada dilución. Los resultados se expresaron como porcentaje de hemólisis (% hemólisis). El ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 6 Concentraciones ocupadas en la prueba hemolítica

Extractos Metanólicos	Concentraciones $\mu\text{g/mL}$	Extractos Acetato de etilo	Concentraciones $\mu\text{g/mL}$
HM	0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600	HA	0, 25, 50, 100, 125, 150, 175, 200
FM	0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600	FA	0, 12.5, 25, 50, 75, 100, 250, 300
TM	0, 50, 100, 150, 200, 225, 250, 300	TA	0, 12.5, 25, 50, 75, 100, 125, 150

HM= Hoja en metanol, FM= Flor en metanol, TM= Tallo en metanol, HA= Hoja en acetato de etilo, FA= Flor en acetato de etilo, TA= Tallo en acetato de etilo, μg = Microgramos equivalentes al extracto. mL= Mililitros equivalentes a NaCl

6.8 Purificación y caracterización de metabolitos secundarios

Este procedimiento se realizó sólo en las hojas de *Justicia spicigera* debido a que esta parte morfológica en solventes polares tiene mayor pigmentación; se separó por columna cromatográfica de sílice (fase normal) de 6 pulgadas de largo por 2 pulgadas de ancho y como fase móvil 200 mL de acetato de etilo/metanol (1:3), y 200 mL de metanol 100% y 200 mL de metanol con ácido fórmico 0.01%. El volumen recuperado en la cromatografía fue de 10 mL por vial, y se colectaron hasta 50 muestras, que fueron analizadas mediante cromatografía en placa fina y reveladas con cloruro de cobalto/ácido sulfúrico y quemados en parrilla. A partir de este procedimiento, se seleccionó la fracción en la que se encuentra el compuesto mayoritario para ser analizado mediante pruebas de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-¹H) en un equipo Bruker DRX-400 (400 MHz, USA), en DMSO-d₆ (Dimetilsulfóxido deuterado).

El FID (Free induction decae) obtenido fue analizado en el programa MestreNova versión 1.0; los desplazamientos químicos (δ) se reportaron en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

6.9 Análisis estadísticos

Para el manejo de datos se utilizó el programa Microsoft Excel (Microsoft Office, USA). Los datos se analizaron estadísticamente mediante el programa Statgraphics Centurion XVI.I, en donde se llevaron pruebas ANOVA de una vía, seguido de pruebas de post hoc de Tukey, las diferencias se consideraron significativas a una $p < 0.05$; así mismo, se empleó la prueba estadística de Durbin-Watson para establecer el nivel de correlación entre los parámetros analizados.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y fueron reportados como como la media \pm desviación estándar de la media (DE).

7 RESULTADOS

Determinación cuantitativa de metabolitos en los extractos:

7.1 Taninos

Los resultados del contenido de taninos de los extractos se muestran en la Tabla 7; donde se observa que los extractos de acetato de etilo fueron más eficientes para el análisis de estos compuestos. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre todos los extractos ($p < 0.05$), siendo FA el que presentó la concentración más alta; caso contrario fue TM mostrando 90.9% menos de concentración que FA, posicionándose así en el último lugar de las muestras. Los tallos en ambos extractos fueron los que presentaron menor cantidad de estos compuestos.

7.2 Fenoles

En la Tabla 7, se pueden apreciar los valores resultantes; el extracto que presentó mayor cantidad de este compuesto fue TA, sin embargo, a pesar de ser la misma parte morfológica, TM fue el extracto que contenía menos fenoles, con una diferencia del 81.11% respecto a TA, no obstante, el análisis estadístico demostró que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre todos los extractos.

7.3 Flavonoides

Los resultados de esta prueba se encuentran en la Tabla 7, indicando que los extractos metanólicos fueron más eficientes para la extracción de este compuesto, las hojas y tallos presentaron altos índices de flavonoides en comparación con los extractos restantes; TM cuantificó mayor cantidad de este metabolito, con una diferencia del 26.59% respecto a HM que obtuvo segundo lugar. El análisis estadístico demostró que existe diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre todos los extractos.

En los extractos de acetato de etilo, la mayor concentración fue en las flores (FA), sin embargo, existe una diferencia del 43% respecto al más alto (TM), no obstante, el extracto de flores en metanol presentó el menor índice de flavonoides de todas las muestras, con una diferencia del 88.21% ante TM.

Tabla 7 Polifenoles en extractos de *Justicia spicigera*

MUESTRA	Flavonoides (mg QRC/g)	Taninos (mg EC/100 g)	Fenoles totales (mg EAG/g)	Antocianinas (mg/100 g)
HM	34.83±0.66 ^b	0.13±0.001 ^d	55.76±0.54 ^c	0.15±0.038 ^d
FM	5.59±1.52 ^f	0.07±0.001 ^e	57.08±0.68 ^b	0.22±0.027 ^b
TM	47.45±0.58 ^a	0.02±0.002 ^f	13.06±0.42 ^f	0.003±0.049 ^e
HA	12.14±1.52 ^e	0.21±0.001 ^b	25.06±0.494 ^e	0
FA	27.01±1.52 ^c	0.22±0.002 ^a	32.10±0.89 ^d	0.16±0.19 ^c
TA	15.43±0.63 ^d	0.12±0.001 ^c	65.66±0.33 ^a	0.95±0.41 ^a

Extractos; HM= Hoja en metanol, FM= Flor en metanol, TM= Tallo en metanol, HA= Hoja en acetato de etilo, FA= Flor en acetato de etilo, TA= Tallo en acetato de etilo. Las letras a, b, c, d, e, f corresponden a las diferencias estadísticamente significativas entre extractos para cada tipo de compuestos halladas en las pruebas post hoc de Tukey ($p < 0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes \pm desviación estándar (DE).

mg QRC/g= miligramos equivalentes a quercetina por gramo de muestra, mg EAG/g = miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra, mg EC/100 g = miligramos equivalentes de catequina por 100 gramos de muestra, $\mu\text{g/g}$ = microgramos por gramo de muestra.

7.4 Antocianinas

Los resultados de la cuantificación de antocianinas se muestran en la Tabla 7. En todos los extractos se presentaron concentraciones bajas. El extracto TA presentó el valor más alto de estos compuestos, mientras que en TM fue el de menor concentración, y en HA estuvieron ausentes. Se mostraron diferencias estadísticamente significativas entre muestras ($p < 0.05$).

7.5 Saponinas

De acuerdo a la metodología empleada no se detectó la presencia de estos metabolitos en los extractos de *Justicia spicigera*.

7.6 Capacidad antioxidante

Los resultados de la capacidad antioxidante por el método ABTS•+, en extractos se encuentran en la Tabla 8, observándose que todas las muestras presentaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

Los extractos metanólicos obtuvieron mayor efecto antioxidante, siendo HM y FM los que presentaron valores más altos de las seis muestras; contrariamente, TM fue el que presentó menor capacidad antioxidante, siendo 76.74% menor que HM. En caso de los extractos en acetato de etilo, quién obtuvo el primer lugar de capacidad antioxidante fue TA, quedando en última posición FA con una diferencia del 41.17% ante el primero. En la prueba de DPPH•, cuyos resultados se encuentran en la Tabla 8, se observa que HM tiene la capacidad antioxidante más elevada de todas las muestras, presentando diferencia estadísticamente significativa ante las restantes. Estadísticamente se identificaron dos grupos diferentes; el primer grupo conformado por TM, HA y FA y el segundo grupo fue FM y TA; en ambos grupos no hay diferencias estadísticas significativas entre ellas.

Tabla 8 Capacidad antioxidante en extractos de *Justicia spicigera*.

Muestra	ABTS•+ (mg ET/g)	DPPH• (mg ET/g)
HM	$_{w}80.76 \pm 0.211^a$	$_{x}30.68 \pm 1.61^a$
FM	$_{w}77.74 \pm 0.115^b$	$_{x}11.21 \pm 3.34^c$
TM	$_{w}18.78 \pm 0.08^f$	$_{x}3.65 \pm 1.64^e$
HA	$_{w}23.23 \pm 0.41^d$	$_{x}3.72 \pm 3.13^d$
FA	$_{w}22.42 \pm 0.22^e$	$_{x}3.26 \pm 0.81^f$
TA	$_{w}38.11 \pm 0.25^c$	$_{x}11.66 \pm 1.91^b$

Extractos; HM= Hoja en metanol, FM= Flor en metanol, TM= Tallo en metanol, HA= Hoja en acetato de etilo, FA= Flor en acetato de etilo, TA= Tallo en acetato de etilo. mg ET/g = miligramos equivalentes de trolox por gramo de muestra. Las letras a, b, c, d, e, f, g en superíndice corresponden a las diferencias estadísticamente significativas entre extractos halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p < 0.05$). Las letras x, w en subíndice corresponden a las diferencias estadísticamente significativas al comparar entre métodos de actividad antioxidante halladas en t de Student ($p < 0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes \pm desviación estándar (DE).

7.7 Capacidad hemolítica

En la Figura 6 y 7 se muestran los resultados de la capacidad hemolítica de los extractos de *Justicia spicigera*, observándose un efecto dosis-dependiente en cada uno.

Los extractos en acetato de etilo presentaron elevados efectos citotóxicos a bajas concentraciones, mientras que los extractos metanólicos requirieron concentraciones más altas para alcanzar el 100% de hemólisis, como se puede ver en la Tabla 9. En los extractos de acetato de etilo, FA obtuvo el mayor efecto tóxico en los eritrocitos, ocupándose concentraciones menores para ocasionar la ruptura de la membrana de los eritrocitos, determinando la dosis hemolítica media (DH₅₀) en 62.60 µg/mL. No se observaron diferencias significativas a concentraciones bajas; pero sí a concentraciones más altas. TA obtuvo el menor efecto tóxico de los extractos en acetato de etilo, su DH₅₀ fue de 92.58 µg/mL seguido de HA cuyo DH₅₀ fue de 86.53 µg/mL; en ambos casos se necesitaron concentraciones mayores para acercarse el 100% de hemólisis, en comparación con FA. En HM y FM para causar el 100% de hemólisis, se utilizaron concentraciones de hasta 600 µg/mL; sin embargo, el efecto citotóxico fue mayor en HM, ya que su DH₅₀ fue de 183.86 µg/mL, mientras que el de FM fue de 468.07 µg/mL; TM fue el menos tóxico determinando su DH₅₀ a 175.54 µg/mL. Todas las concentraciones fueron estadísticamente diferentes (p<0.05).

Tabla 9 Dosis media hemolítica

Extracto	DH₅₀ hemolítica (µg/mL)
HM	183.86±10.75 ^b
FM	468.07±8.29 ^a
TM	175.54±3.18 ^b
HA	86.53±2.91 ^d
FA	62.60±2.38 ^e
TA	92.58±2.46 ^c

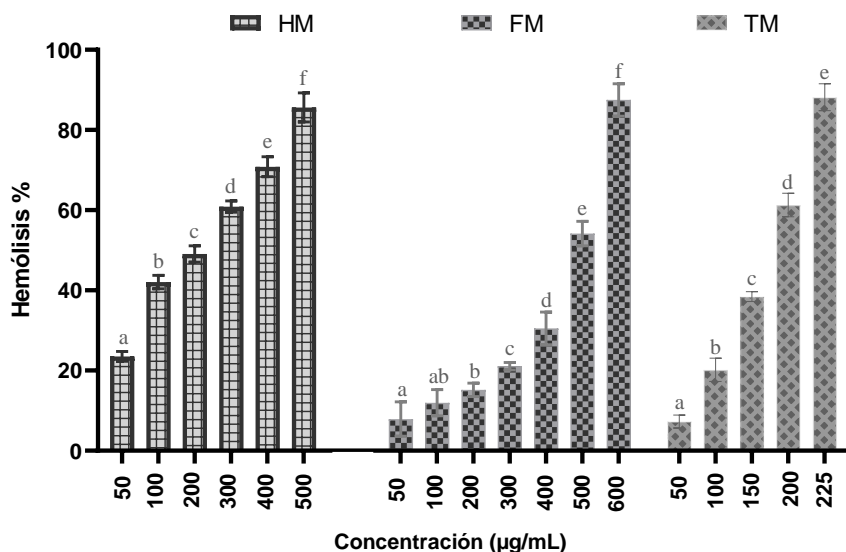


Figura 6 Capacidad hemolítica de los extractos de metanol de *Justicia spicigera*.

HM= Hoja en metanol, FM= Flor en metanol, TM= Tallo en metanol. Las letras a, b, c, d, e, f corresponden a las diferencias estadísticamente significativas entre extractos para cada tipo de compuestos halladas en las pruebas post hoc de Tukey ($p < 0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes \pm desviación estándar (DE).

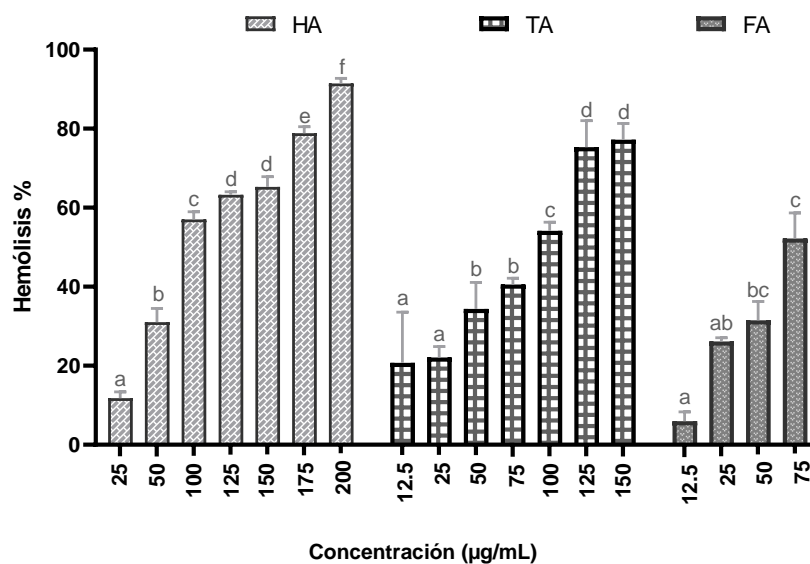


Figura 7 Capacidad hemolítica de los extractos de Acetato de etilo de *Justicia spicigera*.

HA= Hoja acetato de etilo, FA= Flor acetato de etilo, TA= Tallo acetato de etilo. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones para cada extracto ($p < 0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes \pm desviación estándar (DE).

7.8 Compuesto aislado

En la fracción 5 se observó un compuesto mayoritario, por medio de análisis en cromatografía de placa fina de fase normal (Sílice), esto motivó a llevar a cabo la separación de los compuestos de dicha fracción, a través de una cromatografía en columna, donde se obtuvo un sólido que fue lavado con acetona y se analizó mediante RMN de ^1H , con DMSO- d_6 ; los desplazamientos (δ) y constantes de acoplamiento (J), fueron calculados y recuperados en el programa MestreNova 2.0, los datos adquiridos indicaron la presencia de un compuesto fenólico glicosilado, cuyas señales fueron comparados con estudios reportados y se llegó a concluir que el compuesto obtenido de la fracción 5, corresponde a 3,7-diramnósido kaempferol (Kaempferitrina) (Figura 8) (Tabla 10).

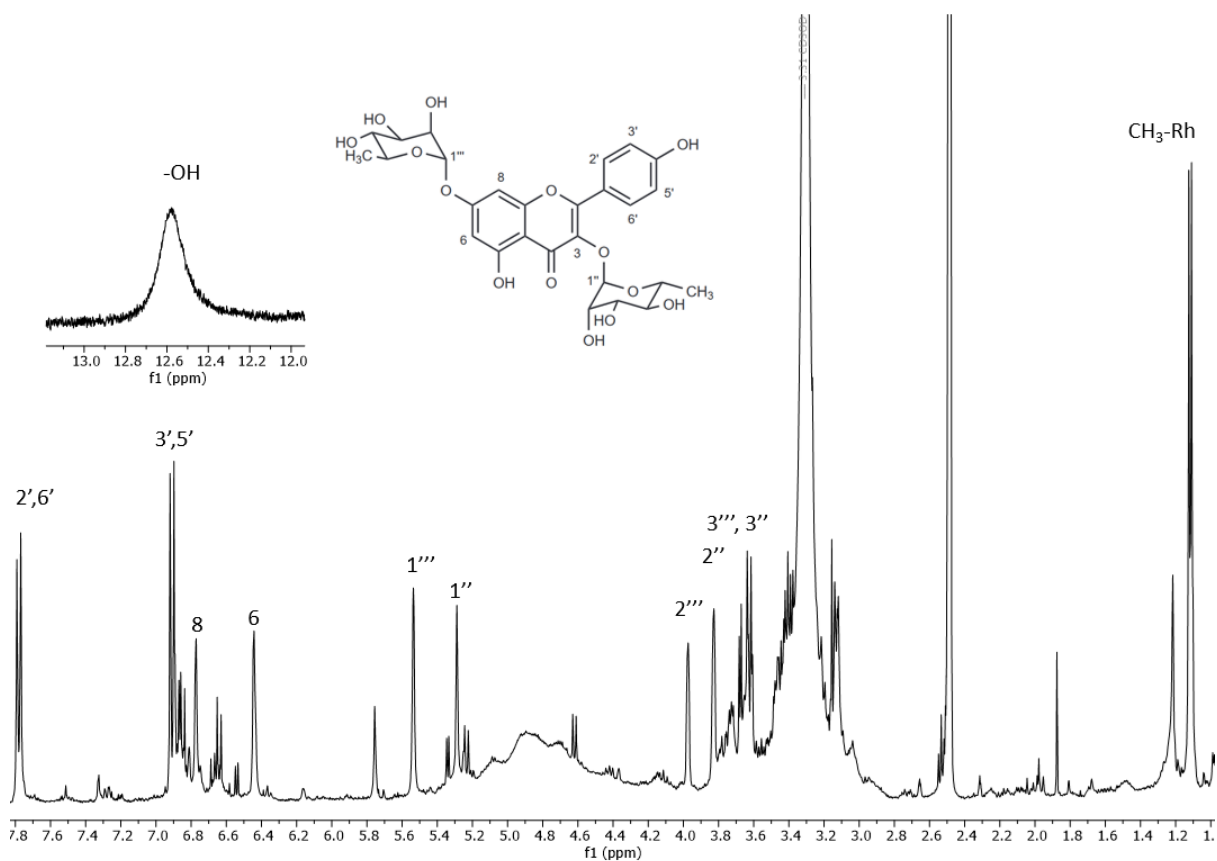


Figura 8 Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) a 400 MHz de fracción 5

Tabla 10 Datos de espectro de RMN y comparación con artículo

H	Datos experimentales DMSO-d6 (400 MHz) δ (ppm), J (Hz)	Referencia Valente et al, 2009 DMSO-d6 (400 MHz) δ (ppm), J (Hz)
6	6.44 (<i>d</i> , 2.3, 1H)	6.46 (<i>d</i> , 2.4)
8	6.77 (<i>d</i> , 2.3,1H)	6.79 (<i>d</i> , 2.0)
OH-5	12.58 (<i>s</i> , 1H)	nr
2'	7.78 (<i>d</i> , 8.8, 2H)	7.8 (<i>d</i> , 8.8)
3'	6.91 (<i>d</i> , 8.8, 2H)	6.93 (<i>d</i> , 8.8)
5'	6.91 (<i>d</i> , 8.8, 2H)	6.93 (<i>d</i> , 8.8)
6'	7.78 (<i>d</i> , 8.8, 2H)	7.8 (<i>d</i> , 8.8)
1''	5.29 (<i>d</i> , 1.6 Hz, 1H),	5.30 (<i>d</i> , 1.6)
2''	3.84 – 3.81 (<i>m</i> , 1H),	3.99 (<i>d</i> , 3.2)
3''	*	*
4''	*	*
5''	*	*
1'''	5.54 (<i>s br</i> , 1H)	*
2'''	3.97 (<i>d</i> , 1.7, 1H)	3.84 (<i>d</i> , 3.4)
3'''	*	3.64 (<i>d</i> , 9.2)
4'''	*	3.31 (<i>d</i> , 9.2)
5'''	*	*
CH ₃ -Rh	1.11 (<i>d</i> , 6.2, 3H)	*
CH ₃ -Rh	1.11 (<i>d</i> , 6.2, 3H)	*

(δ) = desplazamientos, (J) constantes de acoplamiento. (*) No observados, (nr), no reportado.

8 DISCUSIÓN

8.1 Análisis fitoquímico de los extractos de *Justicia spicigera*

Los metabolitos secundarios son sustancias fabricadas por las plantas que les ayudan a ser competitivas en su propio entorno, además, ejercen gran variedad de efectos fisiológicos en ellas y en otros organismos (Teoh, 2016). En comparación con los animales, las plantas sintetizan un espectro más amplio de metabolitos debido a la inmovilidad y la imposibilidad de escapar de depredadores, su proceso evolutivo las llevó a crear sus propias defensas químicas (Lattanzio et al, 2005). La cantidad de estas biomoléculas presentes en plantas varían dependiendo su función fisiológica, por ello es que se analizaron, tallos, hojas y flores de *Justicia spicigera*, teniendo más enfoque en los compuestos fenólicos debido a sus características físicas y químicas que posee.

8.2 Cuantificación de metabolitos en los extractos

8.2.1 Taninos

Existen dos grupos que abarcan este metabolito, los primeros son los taninos condensados, que estructuralmente son complejos oligómeros y polímeros de unidades flavonoides (flavan-3-ol, flavan-3,4-diol y biflavanes) unidos mediante enlace carbono-carbono, y no son susceptibles a degradación enzimática anaeróbica, son solubles en agua, alcoholes, acetona (Pizzi, 2014) pero son incapaces de hidrolizarse. Por otro lado, tenemos a los taninos hidrolizados, estos son más susceptibles a hidrólisis en condición fisiológica, permitiendo la liberación gradual de sus componentes primarios (Kolekar et al, 2008).

En este trabajo se cuantificaron taninos condensados, los resultados de todos los extractos del Muicle utilizados para la prueba, presentaron concentraciones bajas. Esto concuerda con los resultados de otro estudio donde utilizaron hojas secas de esta planta, en una disolución de agua:etanol (30:70%), reportaron 0.23 mg EC/100 g, valor muy cercano a los datos obtenidos en el extracto de hojas en acetato de etilo, con una diferencia del 9.5% (Castro et al, 2021).

El tipo de disolvente empleado juega un papel importante para la extracción de compuestos; en una investigación se comparó la eficacia de mezclas acuosas de acetona y etanol para la

extracción de TC en pieles de uva Shiraz, observando que los rendimientos de extracción en taninos cambiaban con el tipo de disolvente o mezclas; siendo más eficiente la extracción de TC en etanol puro (Downey y Hanlin, 2010).

8.2.2 Fenoles totales

El contenido total de fenoles fue variado entre extractos, mostrando concentraciones diferentes a las reportadas en investigaciones anteriores, debido al tipo de extracción de los compuestos, ya que en este trabajo se realizaron las pruebas en extractos de metanol y acetato de etilo y en las investigaciones que se mencionan a continuación fueron extractos directamente de los polvos de la planta.

En una investigación donde prepararon un extracto etanólico al 60% de hojas de *J. spicigera*, se obtuvo una concentración de 27.05 mg EAG/g (Castro et al, 2021), mientras que en el presente trabajo la concentración del extracto metanólico de hojas fue superior por un 51.4 %; sin embargo, el resultado obtenido en el estudio de Baqueiro y Guerrero (2017) de hojas de Muicle en extractos agua:etanol (30:70), fue de 78.3 mg/g, siendo 28% superior con respecto a los extractos de HM del presente estudio.

Por otra parte, TA mostró mayor concentración de fenoles de todos los extractos; esto coincide con el estudio de *Justicia adhatoda*, donde ocuparon extractos metanólicos al 8 % de los tallos y hojas, e indicaron que la mayor concentración de los compuestos fenólicos se encontraba en tallos, presentando una concentración de 5.13 mg/GAE g, con una diferencia del 34 % con respecto a las hojas. Los solventes como el acetato de etilo, tiene una polaridad relativamente intermedia y pueden solubilizar fenoles con una polaridad similar.

De acuerdo a los datos estadísticos, existe una correlación relativamente débil entre fenoles y taninos condensados de los extractos (Anexo 2), esto se podría deber principalmente a que las concentraciones de dichos metabolitos no fueron tan representativas en la planta.

La acumulación y concentración de compuestos fenólicos en diferentes partes de las plantas pueden variar debido su función, ya que protegen de radiaciones ultravioleta a las plantas, también intervienen como reguladores de interacciones con otros organismos y son los

responsables de la pigmentación durante el ciclo de vida de las plantas y sus diferentes fases de crecimiento (Martínez et al, 2001).

8.2.3 Flavonoides

De acuerdo a los resultados de los extractos metanólicos, el que presentó mayor cantidad de este compuesto fue TM, y en segundo lugar HM, con una diferencia del 26.59 % entre estos. En los extractos de acetato de etilo, la flor fue quién mostró mayor concentración de flavonoides, esto indica que la cantidad de estos metabolitos pueden variar en órganos, tejidos o células, pues son los responsables de conformar la pigmentación de los pétalos de las flores para atraer polinizadores, otra de sus funciones es generar una colorimetría azul para la captación de ciertas longitudes de onda, permitiendo a la planta reconocer el fotoperiodo. Algunos flavonoides se pueden sintetizar en más cantidades en las raíces, para establecer simbiosis principalmente con hongos y así evitar las infecciones por estos y otros parásitos (Cartaya y Reynaldo, 2001).

Conforme a los análisis estadísticos (Anexo 2), los flavonoides mostraron una relación moderadamente fuerte con taninos, esto se puede deber a que estos últimos son derivados del flavonoide flavan-3-ol (Peñarrieta et al, 2014); mientras que con fenoles se obtuvo una relación relativamente débil, probablemente porque los flavonoides a pesar de tener estructuras fenólicas en su base, la reacción se basa en la modificación de la estructura del grupo cetona en el C-4 y el grupo hidroxilo en el C-3 o C-5, provocada por $AlCl_3$, creando complejos ácidos estables con grupos cetonas (Anexo 2).

En el análisis de *J. adhatoda* (Chanu y Sarangthem, 2014) se preparó un extracto en etanol al 50 % de hojas y flores para la cuantificación de flavonoides, las hojas tuvieron una concentración de 37.9 mg/g, presentando una diferencia del 8.1 % respecto a los resultados que obtuvo HM en el presente estudio; mientras que las flores tuvieron una concentración de 29.2 mg/g difiriendo 7.5 % con respecto a FA de *J. spicigera*.

En una investigación sobre *Ruellia tuberosa*, planta perteneciente a la familia Acanthaceae, los tallos presentaron mayor concentración de compuestos fenólicos (Afzal et al, 2015), lo

cual señala que, así como *J. spicigera* la mayoría de estos compuestos pueden ser abundantes en las hojas y en tallos.

8.2.4 Antocianinas

Las antocianinas son pigmentos de tipo fenólico, pertenecen a la familia de los flavonoides y son responsables de los colores rojos y azules en plantas, flores y frutos (Hurtado y Pérez, 2014).

El estudio de Mora et al, (2016) sobre *J. spicigera* identificó a través de fracciones de acetato de etilo con HPLC, la antocianina mayoritaria, la cual fue peonidina con un pico de 64.30%, por ello es que, en la ecuación para la cuantificación de antocianinas, se ocupó el peso molecular de esta antocianina.

Los resultados obtenidos con la metodología empleada presentaron concentraciones entre 0-0.95 mg/100g, no detectándose estos compuestos en HA, esto concuerda con el estudio de Baqueiro (2017) en la cuantificación de antocianinas de extractos etanol-agua de *Justicia spicigera*, no encontrando estos compuestos con la metodología empleada de pH diferencial, sin embargo, estos compuestos si se han reportado en plantas a partir de una extracción directa de las partes morfológicas, mostrando resultados mayores a los obtenidos en el presente trabajo; por ejemplo, en la determinación de metabolitos de otro estudio de *J. spicigera*, a partir de la planta pulverizada se realizaron extractos de etanol acidificado, modificando el pH de la muestra y con esta metodología obtuvieron un resultado de 1.684 mg/100 g.

Los datos estadísticos indican una relación relativamente débil con taninos y flavonoides, esto se pudo deber a la interferencia de diferentes factores, como la probable degradación de las antocianinas antes de su cuantificación, pues son susceptibles a los cambios en sus estructuras químicas por factores físicos como la luz, temperatura, y sobre todo pH (Giusti y Wrolstad, 2001). Esta técnica ha sido mayormente empleada en zumos de frutos, los cuales tienen naturalmente un pH más ácido, por consecuente cuando se requiere extraer antocianinas en plantas, preferentemente se hace con la planta seca utilizando solventes hidroalcohólicos acidificados, como en el estudio de *Ruellia simplex* (Acanthaceae), donde

se utilizaron pétalos de la planta y se maceraron en metanol con ácido acético durante 30 min, esto con el fin de modificar su pH, haciendo más eficiente la extracción de antocianinas (Freyre et al, 2015), donde obtuvieron una concentración de 10.8 mg/g; una diferencia del 91 % respecto a TA, que fue la muestra con la concentración más alta.

Los métodos comunes de extracción de antocianinas suelen ir acompañados en presencia de compuestos contaminantes, por ello es que existen metodologías como el sistema bifásico acuoso (ATPS), para extraer y purificar las antocianinas en los extractos utilizados; este método se ocupó en una investigación de *Peristrophe bivalvis* (Le et al, 2021), planta perteneciente a la familia Acanthaceae y reconocida por su alto contenido de este compuesto, se logró captar el 80 % de antocianina en la hoja, mientras eliminó el 80 % de compuestos contaminantes.

8.2.5 Saponinas

El poder hemolítico es característico de las saponinas triterpénicas, no obstante, no hubo detección de este metabolito en los seis extractos de *J. spicigera* con la metodología empleada, puesto que su fundamento abarca el efecto hemolizante a través de la interacción con los esteroides de la membrana eritrocitaria, que induce un aumento de la permeabilidad de la membrana y un flujo de iones, haciendo explotar la membrana, permitiendo de este modo la salida de la hemoglobina (Bruneton, 2001); probablemente con la técnica no hubo la interacción suficiente entre las saponinas presentes en la planta y los eritrocitos o sus concentraciones fueron bajas.

Sin embargo, en otro estudio fitoquímico del Muicle utilizando la parte aérea de la planta, fue posible la cuantificación de saponinas por métodos espectrofotométricos empleando el reactivo de Lieberman-Burchard, obteniendo un resultado de 153.58 mg/100g (Chávez, 2021). Existen reportes de otras plantas pertenecientes al mismo género, que a través de métodos cualitativos detectaron la presencia de saponinas, como por ejemplo en *Justicia adathoda*, *Justicia gendarussa*, *Justicia neesii* y *Justicia tranquebariensis* (Basit et al, 2022; Nibalvos et al, 2019; Akilandeswari et al, 2001).

No obstante, las saponinas esteroídicas se dan preferentemente en las familias de monocotiledóneas, como por ejemplo en Liliaceae y Dioscoreaceae, mientras que las saponinas triterpénicas son abundantes en muchas familias de dicotiledóneas, como en: Cariophyllaceae, Polygalaceae, Fabaceae, Apiaceae y Araliaceae, entre otras (Luengo M, 2001).

8.2.6 Capacidad antioxidante

A través de investigaciones se ha demostrado que las diferentes partes morfológicas de las plantas presentan distintos tipos y cantidades de metabolitos secundarios con capacidad antioxidante, además este factor guarda relación con la polaridad de la solución de los extractos, siendo el metanol el disolvente puro más eficiente para la extracción de este tipo de compuestos (Boeing et al, 2014).

Existe una gran diferencia entre antirradical y antioxidante, según Tirzitis y Bartosz (2010) la actividad antirradical caracteriza la capacidad de los compuestos para reaccionar con los radicales libres, pero la capacidad antioxidante representa la inhibición del proceso de oxidación.

En las pruebas de ABTS^{•+} y DPPH[•] la capacidad antioxidante fue variada según la parte morfológica de la planta; en los extractos metanólicos de las hojas y flores indicaron una mayor capacidad antioxidante, mientras que, en los extractos de acetato de etilo, debido a su polaridad media, mostraron una capacidad antioxidante inferior.

Los factores que intervienen con la diferencia de los resultados entre estos dos métodos, se explican por el tiempo de exposición, ya que en el caso de DPPH[•] los extractos reaccionaron por 60 min en la oscuridad con el radical, mientras que en ABTS^{•+} el radical alcanzó su estado estacionario en 5 min. En el método ABTS^{•+} se puede medir la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos, mientras que en DPPH[•] sólo puede disolverse en medios orgánicos, por lo que mide preferentemente la capacidad antioxidante de compuestos pocos polares (Mercado et al, 2011).

Ambas técnicas mostraron una relación directa en los resultados, manteniendo el mismo orden referente a la capacidad antioxidante en los extractos metanólicos HM>FM>TM; mientras que, en los extractos de acetato de etilo, TA fue el mayor para ambas metodologías demostrando que podría haber mayor cantidad de compuestos antioxidantes de polaridad intermedia en esta parte morfológica de la planta.

Los resultados de las pruebas DPPH• y ABTS•+ evidenciaron que el extracto con mayor capacidad antioxidante fue el de hojas metanol (ABTS•+: 80.76 mgET/g, DPPH•: 30.68 mg ET/g); sin embargo, en el estudio de Baqueiro y Guerrero (2017), donde ocuparon las hojas deshidratadas de *Justicia spicigera* en extractos de etanol-agua (30/70), mostraron valores inferiores a los del presente estudio con una diferencia del 50.66 % en ABTS•+ y 25.28 % para DPPH•.

Los análisis de correlación de la capacidad antioxidante de ABTS•+ mostraron una relación relativamente débil con antocianinas; quizás se pudo deber a la técnica implicada para la cuantificación de estos metabolitos; con taninos también tuvo una relación relativamente débil, probablemente influyó la concentración baja que presentaron los extractos para este compuesto; con flavonoides la relación fue relativamente débil, su baja contribución en la actividad antioxidante medida por ABTS•+ sugiere que deben existir otros compuestos que impacten de manera más significativa.

ABTS•+ y DPPH• presentaron una relación moderadamente fuerte con fenoles, lo que indica que la capacidad antioxidante esta mayoritariamente influenciada por estos compuestos. La correlación entre DPPH• con taninos, flavonoides, antocianinas fue relativamente débil, indicando que no hay un impacto significativo en la capacidad antioxidante por estos tipos de metabolitos.

8.3 Kaempferitrina aislada del extracto de *Justicia spicigera*

La kaempferitrina proviene de la ruta metabólica de los flavonoides de las plantas, se le han realizado estudios en la salud humana donde funge como agente de preservación de la densidad ósea, agente hipoglucemiante, inmunomodulador, agente antiinflamatorio, agente antineoplásico, inductor de apoptosis y antidepresivo (Periferakis et al, 2022). Estudios

fitoquímicos han confirmado la presencia de este compuesto aislado sobre todo en las partes aéreas de las plantas, en *Justicia spicigera* se ha detectado en extractos hidroalcohólicos y acuosos de hojas (Girón, 2015, González et al, 2017).

Los flavonoides constituyen un grupo de compuestos fenólicos procedentes del metabolismo secundario; son pigmentos hidrosolubles que se encuentran en las vacuolas y membranas vegetales, se presentan tanto en estado libre como unidos a azúcares; y son responsables de la gama de colores amarillo, naranja, rojo, blanco y violeta de las flores. A los flavonoides que se encuentran libres se le llaman agliconas flavonoides y como glicósidos que pueden estar unidos a una o varias cadenas de carbohidratos (Delgado y Romo, 2015), el compuesto aislado, el aglicón flavonoide es el kaempferol y glicosilado es la kaempferitrina que está unida a dos unidades de rhamnosa en las posiciones 7,3. Por otro lado, según la literatura, los glicósidos pueden ser de dos clases, O-glicósidos, de carbohidratos ligados a través de los átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) o a través de los enlaces carbono-carbono C-glicósidos (Delgado y Romo, 2015). Bajo esta definición el compuesto aislado es un O-glicósido ya que está unido al flavonoide kaempferol por enlaces de oxígenos de los azucars de la posición 1 de la ramnosa. Otra característica de los flavonoides es que sus propiedades físicas dependen de la forma en el que se encuentre (libre o glicosilado) además la solubilidad de estos dependen del número o la clase de sustituyentes, por lo tanto los glicósidos y antocianinas son los más solubles en agua y alcohol, esto fue observado por el proceso de extracción, donde se observó que la mayor cantidad de compuestos fenólicos se entraron en metanol y como consecuencia se observó mayor actividad antioxidante en esos extractos.

A nivel de la fisiología vegetal, se sabe que los flavonoides se sintetizan en todas las plantas del taxón en briofitas y algunas algas, aunque comparten la vía biosintética central, poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales, y los mecanismos de regulación de su biosíntesis, por lo tanto, la composición y concentración de flavonoides es muy variable entre especies y en respuesta al ambiente.

Dicha síntesis se lleva a cabo en el citoplasma y luego migran a las vacuolas celulares, sus funciones más importantes de estos en las plantas son (Schilbert et al, 2021, Aguilar-Laurents, 2015):

- Protección ante la luz UV 280 y 315 nm
- Defensa ante herbívoros
- Atracción de polinizadores
- Atracción de presas (en plantas carnívoras)
- Estimulación de bacterias *Rhizodum*, y reabsorción de nutrientes minerales en hojas en envejecimiento.

En el caso puntual de la kaempferitrina, su acumulación está ligada a la vía biosintética de fenilpropanoide y puede variar en los diferentes órganos de la planta, por ejemplo, en un estudio donde se analizó el almacenamiento de este flavonoide en las distintas partes morfológicas de *Hibiscus cannabinus*, los genes investigados se expresaron en niveles muy bajos en las raíces, mientras que cada gen mostró diferentes patrones de expresión en diferentes órganos, a partir de un análisis de compuestos, observaron que las hojas son quienes contienen grandes cantidades de kaempferitrina (Zhao et al, 2014). Las enzimas implicadas en la biosíntesis de algunos otros glucósidos de kaempferol son de naturaleza más restringida y, por lo tanto, estos glucósidos sólo serán sintetizados por especies vegetales con la información genética necesaria para codificar dichas enzimas. El aglicón kaempferol es muy común, por lo que se ha identificado en las divisiones Pteridophyta, Pinophyta y Magnoliophyta, esta última es la división que abarca las plantas con flores, y dentro de este grupo se ha identificado kaempferol tanto en Magnoliopsida (Dicotiledóneas) y Liliopsida (Monocotiledóneas) (Calderon et al, 2011), así como también en varias especies de plantas con propiedades medicinales (Yang et al, 2008). Algunas propiedades biológicas que se le atribuyen a la kaempferitrina, son antioxidantes, antiinflamatorias, anticonvulsivas, antiosteoporóticas, antidepresivas, antihelmínticas, inmunoestimuladoras y natriuréticas, así como también inhibe la proliferación celular y la apoptosis (Patel, 2021).

8.4 Estudio biológico

8.4.1 Capacidad hemolítica

El eritrocito fue elegido como modelo *in vitro*, la ausencia de orgánulos internos hace que sean el modelo celular más simple disponible, por lo cual, son el sistema de membrana celular más popular para verificar sus posibles interacciones y se consideran representativos de la membrana plasmática en general (Magalhães et al., 2009, Svetina et al., 2004). Los lípidos que la componen son la primera entidad celular que entra en contacto con otras células, así como con moléculas y materia extracelular (Vahedi et al., 2020), se encuentran de manera asimétrica estratégicamente, debido a que tienen implicaciones importantes para la función celular, además de intervenir en una variedad de procesos, incluida la apoptosis, la división celular y la coagulación de la sangre.

En los resultados de la capacidad hemolítica se puede apreciar que los extractos con mayor toxicidad para los eritrocitos fueron en acetato de etilo, pues se ocuparon concentraciones más bajas que las utilizadas en los extractos metanólicos. Esto podría indicar que existe la probabilidad de que en este disolvente se encuentren más metabolitos que no fueron identificados, pues la incorporación de estos extractos en la suspensión con eritrocitos pudo causar alteraciones conformacionales en las proteínas o lípidos del citoesqueleto de membrana, así como también cambios en la viscosidad interna de las células provocando su hemólisis (He et al., 2009).

Diversas investigaciones han corroborado efectos benéficos que desempeñan los polifenoles en el organismo o en pruebas *in vitro*; sin embargo, muy pocos estudios hablan sobre el abuso de estos componentes, que podrían provocar efectos adversos en células, como la acción prooxidativa generada por una dosis elevada de los componentes concentrados en el extracto empleado (Herrera., 2020), esto podría ocasionar alteraciones en las membranas de los eritrocitos.

De todas las muestras, TA fue quién presentó mayor toxicidad para los eritrocitos, también fue quién exhibió mayores concentraciones de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, lo cual podría indicar que los tallos en acetato de etilo, contienen más

compuestos de polaridad media, como compuestos derivados de los isoprenoides (Yam, 2013) que pudieron influir en la lisis de los eritrocitos.

En estudios de extractos de *J. spicigera* donde se identificó la kaempferitrina, se demostró que este flavonoide posee efectos citotóxicos contra las células HeLa (IC₅₀ 445 mM) (Castro et al, 2013); se ha comprobado que la kaempferitrina posee efectos sinérgicos junto con otros flavonoides (Campbell et al, 2006), su actividad antiproliferativa y otros efectos son más potentes en extractos crudos que en los compuestos aislados (Gilbert y Alves, 2003). La presencia de este compuesto pudo haber influido para el rompimiento de la membrana del eritrocito, debido a que se encontró su presencia en el extracto de hojas en metanol a través de RNM; de acuerdo a diferentes estudios en plantas, se ha demostrado que la kaempferitrina puede estar presente en hojas, flores y tallos (Zhao et al, 2014), incluso podría estar presente en los extractos de acetato de etilo, por las características que tiene este disolvente.

A pesar de que no se encontró presencia de saponinas con la metodología empleada, no significa que no pueda estar presente en los extractos, pues como anteriormente se mencionó, en otros estudios de *J. spicigera* se ha encontrado presente este metabolito, razón por la cual pudieron haber contribuido en la lisis de la célula, porque las saponinas interactúan con los esteroides de la membrana celular, originando un incremento en la permeabilidad y eventualmente en la formación de poros originando el escape de los contenidos celulares (Alkazar, 2016).

Investigaciones confirman que *J. spicigera* contiene antocianinas, (Baqueiro 2017), estas prefieren solventes polares, por lo que probablemente se encuentren más en los extractos metanólicos, los cuales expresaron menor efecto hemolítico, esto concuerda con el estudio de la planta *Trema orientalis* donde se utilizó un extracto rico en antocianinas que manifestó un efecto antihemolítico (Mpiana et al, 2011).

La evaluación del potencial de toxicidad de nuevas moléculas y formulaciones para uso humano es fundamental, por lo que se ha vuelto importante establecer nuevos enfoques para la detección temprana de posibles candidatos a productos cosméticos y farmacéuticos (Ahuja y Sharma, 2014).

La correlación entre hemólisis y flavonoides es relativamente débil, varios estudios han reportado que algunos tipos de flavonoides hidrofóbicos, actúan inhibiendo el efecto hemolítico, tienen efectos beneficiosos en la prevención del daño oxidativo de las membranas celulares (Asgary et al, 2005). Se realizó una investigación donde se comprobó que los fenoles tuvieron efectos citotóxicos en una línea celular de leucemia murina (Fujisawa y Kadoma, 2012) sin embargo, en el estudio estadístico, la correlación con fenoles y antocianinas fue relativamente débil, lo que puede indicar que estos compuestos no contribuyeron en la ruptura de los eritrocitos de manera significativa.

Por otro lado, la correlación entre hemólisis y ABTS•+ fue moderadamente fuerte, indicando que tal vez algunos compuestos antioxidantes de naturaleza lipofílica e hidrofílica influyeron en el efecto hemolítico; mientras que la correlación con DPPH• fue relativamente débil, lo que se podría deber que los compuestos de media polaridad no influyeron tanto en el efecto citotóxico del eritrocito. Con respecto a los taninos, mostró una relación inversa moderadamente fuerte, indicando que a mayor concentración de taninos menor ruptura de eritrocitos habrá; no obstante, aún no existen los suficientes estudios que corroboren si los taninos tienen efecto hemolítico o algún efecto citotóxico (Ortega et al, 2016) (anexos 2).

9 CONCLUSIÓN

- En los extractos metanólicos y de acetato de etilo se pudieron identificar taninos, flavonoides, fenoles, antocianinas, capacidad antioxidante y actividad hemolítica.
- Todos los extractos presentaron taninos condensados en bajas cantidades, siendo FA quién mostró mayor concentración.
- Se encontraron flavonoides en cada extracto, siendo TM quién tuvo el valor más alto.
- Los extractos de *Justicia spicigera* presentaron compuestos fenólicos, cuya concentración dependió de la parte morfológica y el disolvente utilizado.
- Los extractos presentaron bajas cantidades de antocianinas.
- No se detectaron saponinas en ninguno de los extractos con la metodología empleada.
- Todos los extractos mostraron capacidad antioxidante, siendo la técnica ABTS•+ la que presentó los valores más altos, donde el extracto HM fue superior a todos los demás.
- Los extractos de acetato de etilo fueron más tóxicos para los eritrocitos que los extractos metanólicos; siendo FA el que presentó mayor efecto hemolítico.
- Los extractos de *Justicia spicigera* mostraron efecto citotóxico dosis dependiente sobre eritrocitos.
- La kaempferitina estuvo presente en la fracción 5 del extracto metanólico de hojas.
- Se presentó correlación moderadamente fuerte entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales.
- Se encontró una correlación moderadamente fuerte entre fenoles y hemólisis.

10 Referencias:

- Afzal, K., Uzair, M., Chaudhary, B. Al., Ahmad, A., Afzal, S., y Saadullah, M. (2015). Genus *Ruellia*: Pharmacological and phytochemical importance in ethnopharmacology. *Acta Pol. Pharm.*, 72(5), 821.
- Alcázar, E. (2016). Caracterización de saponinas de *Agave durangensis* y *Agave salmiana*, y su efecto en la pared y membrana celular de *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* (Doctoral dissertation, Tesis doctoral). Obtenido de [https://www. Google. Com/url](https://www.Google.Com/url).
- Aldred, E. M. (2008). *Pharmacology: a handbook for complementary healthcare professionals*. Elsevier sci.
- Agüero B., y Alba, M. R., (2010) Usos y aplicaciones del Muicle (*Justicia Spicigera*) tlahuiedu AC. Trabajo de investigación para el diplomado de Medicina Tradicional Mexicana.
- Aguilera M., Reza M., Chew, R. G., y Meza J. A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biocencia*, 13(2), 16.
- Akilandeswari, S., Mainmaran, S., Valarmathi, R., Kumara, S. K., y Loganathan, S., (2001). Phytochemical observation on leaf of *Justicia tranquebariensis*. *Lf. Anc. Sci. Life*, 20(3), 60-61
- Asgary, S., Naderi, G. H., y Askari, N. (2005). Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Exp Clin Cardiol*, 10(2), 88-90.
- Baqueiro-Peña, I., y Guerrero-Beltrán, J. Á. (2013). Antioxidant and Coloring Characteristics of Muicle (*Justicia spicigera*). In *Proceedings of a Conference: International Food Technology*, At Chicago, Illinois, USA (Vol. 13).
- Baqueiro-Peña, I., y Guerrero-Beltrán, J. Á. (2017). Physicochemical and antioxidant characterization of *Justicia spicigera*. *Food chemistry*, 218, 305-312.
- Boeing, J. S., Barizão, É. O., e Silva, B. C., Montanher, P. F., de Cinque Almeida, V., & Visentainer, J. V. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chem. Cent. J.*, 8(48), 1-9.
- Calderon J., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., y López-Lázaro, M. (2011). A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem*, 11(4), 298-344.
- Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bøhn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willett, W. C., Phillips, K. M., Jacobs, D. R., & Blomhoff, R. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr. J.*, 9(1), 1-11.
- Campbell, J. K., King, J. L., Harmston, M., Lila, M. A., y Erdman Jr, J. W. (2006). Synergistic effects of flavonoids on cell proliferation in Hepa-1c1c7 and Incap cancer cell lines., *J. Food Sci.* 71(4), S358-S363.

- Carvajal Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100.
- Castro A. J., Ortiz E., García A., Ruiz G., Núñez J. M., González I., y García A. (2013). Kaempferitrin induces apoptosis via intrinsic pathway in hela cells and exerts antitumor effects. *J. Ethnopharmacol.*, 145(2), 476-489.
- Chanu, W. S., y Sarangthem, K. (2014). Phytochemical constituents of *Justicia adhatoda* linn. Found in Manipur. *Indian J Plant Sci*, 3(2), 2319-3824.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complimentary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 10:178–182
- Cornelli, U. (2009). Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin Dermatol*, 27(2), 217-224.
- Corrêa, M.; Alcântara, Antônio F. De C. (2012). Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia*: a review. *Revista Rev. Bras. Farmacogn*, 22(1), 220–238.
- Chen CC, Lin CF, Huang YL, Ko FN, Teng CM (1995). Bioactive constituents from the flower buds and peduncles of *Lindera megaphylla*. *J Nat Prod* 58(9), 1423-1425.
- Cuevas-Cardona, C. (2010). Estudios geográficos y naturalistas en el Instituto Médico Nacional (1888-1915). *Geografía e Historia Natural: hacia una historia comparada*. F.E.P.A.I. Argentina. Pp: 215-234.
- Curtis, H., y Schnek, A. (2008). Curtis. *Biología*. Ed. Médica Panamericana.
- Daniel, T. y Acosta, S. (2003). Acanthaceae. *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*. Fascículo 117. Instituto de Ecología A.C. /Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología / Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán.
- Delgado, G., y Romo de Vivar, A. (2015). *Temas selectos de química de productos naturales*. Instituto de Química, UNAM: México, DF.
- Downey, M. O., y Hanlin, R. L. (2010). Comparison of ethanol and acetone mixtures for extraction of condensed tannin from grape skin. *SAJEV*, 31(2), 54–159
- Ezzat, S. M., El Bishbishy, M. H., El Kersh, D. M., Zayed, A., Salem, M. A., y Salama, M. M. (2021). Herbal cosmeticology. In *Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders* (pp. 129-168). Academic Press.
- Ezcurra, C. (2002). El Genero *Justicia* (Acanthaceae) en Sudamerica Austral. *Ann. Missouri Bot. Gard*, 89(2), 225-280.
- Fernández-López, J. A., Fernández-Lledó, V., y Angosto, J. M. (2020). New insights into red plant pigments: More than just natural colorants. *RSC advances*, 10(41), 24669-24682.
- Fernández-Pomares, C., Juárez-Aguilar, E., Domínguez-Ortiz, M. A., Gallegos-Estudillo, J., Herrera-Covarrubias, D., Sánchez-Medina, A., Aranda G., Hernández M., (2018). Hydroalcoholic extract of the widely used Mexican plant *Justicia spicigera* Schltld. Exerts a cytostatic effect on Incap prostate cancer cells. *J. Herb. Med*, 12, 6–72.
- Ferrer R., Gonçalves, R., Rivas-Gonzalo, J. C., Escribano-Bailón, M. T., y de Freitas, V. (2012). Interaction of phenolic compounds with bovine serum albumin (BSA) and α -

amylase and their relationship to astringency perception. Food chemistry, 135(2), 651-658.

- Free radicals vs reactive oxygen species. (2021). Cell Syst. <https://www.cellgs.com/blog/free-radicals-vs-reactive-oxygen-species-whats-the-difference.html>
- Freyre, R., Uzdevenes, C., Gu, L., y Quesenberry, K. H. (2015). Genetics and anthocyanin analysis of flower color in mexican petunia. J. Am. Soc. Hortic., 140(1), 45-49.
- Fujisawa, S., y Kadoma, Y. (2012). Relationship between phenol-induced cytotoxicity and experimental inhibition rate constant or a theoretical parameter. Mini Rev Med Chem., 12(6), 477-490.
- García R. I., Mora A., González D., de Jesús Carpio R., Soria C. (2019). Anxiolytic-like effect of the aqueous extract of *Justicia spicigera* leaves on female rats: A comparison to diazepam. Phytomedicine., 55(1), 9-13.
- Graham, V. (1988). Delimitation and infra-generic classification of *Justicia* (Acanthaceae). Kew Bull., 43(4), 551-624.
- Gibson, D., (1974). Acanthaceae. Standley, Flora of Guatemala. Fieldiana (Botany) 24 (10):328-461.
- Gilbert B., Alves L. (2003). Synergy in plant medicines. Curr Med Chem 10(1), 13-20
- Girón, N. (2015). Evaluación de la actividad antidiabética y antioxidante *in vitro* de extractos polares de *Justicia spicigera* y elucidación estructural de los compuestos fenólicos mayoritarios (Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos). Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajuapán de León, Oaxaca.
- Giusti, M. M., y Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. Curr. protoc. food anal. chem., 00(1), F1.2.1-F1.2.13.
- González M. E., Dominguez, F., Perez-Ortega, G., Aguillon, M., Martinez-Vargas, D., Almazan-Alvarado, S., y Martínez, A. (2017). *Justicia spicigera* Schltld. And kaempferitrin as potential anticonvulsant natural products. Biomed. Pharmacother, 92(1), 240-248.
- Hajhashemi, V., Vaseghi, G., Pourfarzam, M., y Abdollahi, A. (2010). Are antioxidants helpful for disease prevention?. Res Pharm Sci, 5(1), 1-8.
- He, J., Lin, J., Li, J., Zhang, J. H., Sun, X. M., & Zeng, C. M. (2009). Dual effects of Ginkgo biloba leaf extract on human red blood cells. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 104(2), 138-144.
- Hernández S., Quiroz-Reyes, C. N., Ramírez-Ortiz, M. E., Ronquillo-de-Jesús, E., y Aguilar-Méndez, M. Á. (2020). Optimización del proceso de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de *Justicia spicigera* Schltld. Mediante la metodología de superficie de respuesta. TIP. rev. espec. cienc. quím.-biol., (23).

- Herrera, Z. S. (2021). Evaluación de la toxicidad aguda y subaguda en la administración de un extracto hidroalcohólico de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*) in vivo. (Tesis para obtener el título de Maestro en ciencias de nutrición humana, Universidad autónoma de Querétaro).
- Hurtado, N. H., y Pérez, M. (2014). Identificación, estabilidad y actividad antioxidante de las antocianinas aisladas de la cáscara del fruto de capulí (*Prunus serotina* spp capulí (Cav) Mc. Vaug Cav). Inf. Tecnol., 25(4), 131-140.
- Iwashina, T. (2013). Flavonoid properties of five families newly incorporated into the order Caryophyllales. Bull Natl Mus Nat Sci, 39, 25-51.
- Kolečkar, V., Kubikova, K., Rehakova, Z., Kuca, K., Jun, D., Jahodar, L., y Opletal, L. (2008). Condensed and Hydrolysable Tannins as Antioxidants Influencing the Health. Mini Rev Med Chem, 8(5), 436-447.
- Krinsky, N. I. (1992). Mechanism of Action of Biological Antioxidants. Exp. Biol. Med., 200(2), 248-254
- Le, P., Dao, D. T., Huynh, T., Tran, T. H., & Nguyen, V. T. (2021). Extraction and purification of anthocyanins from *Peristrophe bivalvis* (L.) Merr. leaf (Acanthaceae) using aqueous two-phase systems. Nat. Prod. 37(1), 154-158.
- Lattanzio V., Cardinali, A., y Imperato, F. (2005). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. Res. J. Phytochem, 661(2), 23-67.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., y Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. Clin Interv Aging, 00(13), 757-772.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., y Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacogn Rev, 4(8), 118-119.
- Luengo, M. T. L. (2001). Fitoterapia: Saponósidos. Offarm: farmacia y sociedad, 20(6), 124-128.
- Marcial, A. (2007). Antecedentes del Instituto Médico Nacional y los primeros años de trabajo se la Sección 3 de Fisiología. Boletín Mexicano de Historia y Filosofía de la Medicina 10(1), 21-27.
- Martínez S., González J., Culebras, J. M., y Tuñón, J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr Hosp, 17(6), 271-278.
- Mora, T., Delgado, S., Padilla, N., Sumaya, M., Calixto, G., GC, A. R., y García, M. (2016). Propiedades hipoglucemiantes de la especie *Justicia spicigera Schlechtendal* (Scrophulariales: Acanthaceae). MES, 11(1), 24-33.
- Mosco, A. (2012). Tissue localization of betacyanins in cactus stems. Rev. Mex. Biodivers., 83(2), 413-420.
- Mpiana, P. T., y Kitadi, J. M. (2019). *Justicia secunda* Vahl species : Phytochemistry, Pharmacology and Future Directions : a mini-review. Disc. Phytomedicine, 6(4), 157-171.

- Mpiana, P. T., Ngbolua, K. N., Mudogo, V., Tshibangu, D. S. T., Atibu, E. K., Tshilanda, D. D., y Misengabu, N. M. (2011). Antisickle erythrocytes haemolysis properties and inhibitory effect of anthocyanins extracts of *Trema orientalis* (ULMACEAE) on the aggregation of human deoxyhemoglobin S *in vitro*. *J. Med. Sci.*, 11(3), 129-137.
- Ortega, Y. H., Diogo, N. M., y Mosquera, D. M. G. (2006). Estudio de la actividad hemolítica de los posibles taninos extraídos a partir de la *Boldoa purpurascens* Cav. *REDVET. Rev. Electron. Vet*, 7(10), 1-5.
- Ortiz R., Cabañas A., Arana V. E., Alonso A. J., Zapata R., Salazar A., Domínguez, F., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C. Y García-Carrancá, A. (2012). Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schltld. (Acanthaceae). *J. Ethnopharmacol.*, 143(2), 455–462.
- Patel D., (2021). Pharmacological Activities and Therapeutic Potential of Kaempferitrin in Medicine for the Treatment of Human Disorders: A Review of Medicinal Importance and Health Benefits. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.*, 21(2), 104-114.
- Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., y Bravo, J. A. (2014). Phenolic compounds in food. *Rev. boliv. quim.*, 31(2), 68-81.
- Nipunika, M. M., Abeysinghe, D. C., y Dharmadasa, R. M. (2022). Distribution of Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Different Parts of *Justicia adhatoda* L.(Acanthaceae). *World J. Agric. Res*, 10(2), 60-63.
- Pérez N., y Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnol. Veg.*, 11(4), 195-211.
- Periferakis, A., Periferakis, K., Badarau, I. A., Petran, E. M., Popa, D. C., Caruntu, A., Costache, R. S., Scheau, C., Caruntu, C., & Costache, D. O. (2022). Kaempferol: Antimicrobial Properties, Sources, Clinical, and Traditional Applications. *Int. J. Mol. Sci.*, 23(23), 15054.
- Pham-Huy, L. A., He, H., y Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.*, 4(2), 89-90.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63(7), 1035-1042.
- Pizzi, A. (2014). Types, processing and properties of bioadhesives for wood and fibers. In *Advances in Biorefineries* (pp. 736-770). Woodhead Publishing.
- Quideau, S., Jourdes, M., Saucier, C., Glories, Y., Pardon, P., y Baudry, C. (2003). DNA Topoisomerase Inhibitor Acutissimin A and Other Flavano-Ellagitannins in Red Wine. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42(48), 6012-6014.
- Ray, P. D., Huang, B. W., y Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.*, 24(5), 981-990
- Ruiz B. M., (2020) Determinación de la actividad antioxidante. Programa académico: Química y Farmacia., Guía de laboratorio. Universidad Simón Bolívar., pág. 3.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT] (2021) Plantas medicinales de México, gob.mx. <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/plantas-medicinales->

- Zenil N., Colinas M. T., Bautista C., Vázquez T. R., Lozoya H., y Martínez M. T. (2018). Fenoles totales y capacidad antioxidante estimada con los ensayos DPPH/ABTS en rosas en soluciones preservantes. REMEXCA, 5(6), 1029-1039

Tabla 1 Correlaciones hemólisis y metabolitos secundarios

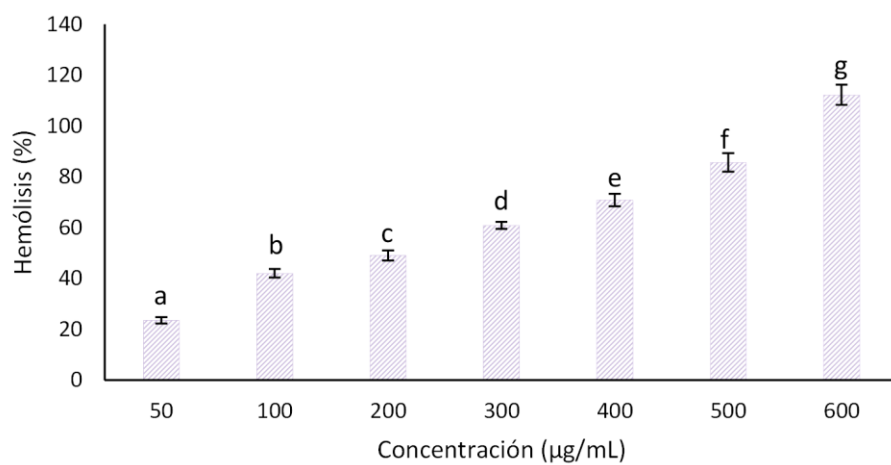
Correlación Extractos	Ecuación	Coefficiente de correlación	Nivel de correlación
ABTS•+ vs DPPH•	$ABTS = 20.6306 + 2.13783 * DPPH$	0.804529	Moderadamente fuerte
ABTS•+ vs Fenoles	$ABTS = 2.60435 + 0.986636 * FENOLES$	0.726361	Moderadamente fuerte
ABTS•+ vs Taninos	$ABTS = 54.7128 - 87.7926 * TANINOS$	-0.242124	Relativamente débil
ABTS•+ vs Hemólisis	$ABTS = 19.9851 + 0.132011 * HEMOLISIS$	0.697689	Moderadamente fuerte
DPPH• vs Fenoles	$DPPH = -2.53366 + 0.319245 * FENOLES$	0.624526	Moderadamente fuerte
DPPH• vs Taninos	$DPPH = 12.7785 - 16.2717 * TANINOS$	-0.119246	Relativamente débil
DPPH• vs Hemólisis	$HEMOLISIS = 146.609 + 2.95216 * DPPH$	0.210212	Relativamente débil
Fenoles vs Taninos	$FENOLES = 41.0975 + 0.204757 * TANINOS$	0.00308808	Relativamente débil
Flavonoides vs Taninos	$FLAVONOIDES = 2.21103 + 168.774 * TANINOS$	0.844343	Moderadamente fuerte
Flavonoides vs Fenoles	$FLAVONOIDES = 23.4452 + 0.00730175 * FENOLES$	0.00975118	Relativamente débil
Flavonoides vs ABTS•+	$FLAVONOIDES = 24.3524 - 0.0138947 * ABTS$	-0.0252049	Relativamente débil
Flavonoides vs DPPH•	$FLAVONOIDES = 21.2912 + 0.229551 * DPPH$	0.156705	Relativamente débil

Correlación hemólisis	Ecuación	Coefficiente de correlación	Nivel de correlación
Hemólisis VS Flavonoides HM	$HEMOLISIS HM = 420.721 - 6.80022 * FLAV. HM$	-0.419521	Relativamente débil
Hemólisis VS Flavonoides FM	$HEMOLISIS FM = 479.9 - 0.97329 * FLAV FM$	-0.17921	Relativamente débil
Hemólisis VS Flavonoides TM	$HEMOLISIS TM = 263.679 - 15.7475 * FLAV TM$	-0.915619	Relativamente fuerte
Hemólisis VS Flavonoides HA	$HEMOLISIS HA = 134.294 - 1.76776 * FLAV HA$	-0.927027	Relativamente fuerte
Hemólisis VS Flavonoides FA	$HEMOLISIS FA = 133.968 - 1.50367 * FLAV FA$	-0.371395	Relativamente débil
Hemólisis VS Flavonoides TA	$HEMOLISIS TA = 135.623 - 2.78756 * FLAV TA$	-0.718703	Moderadamente fuerte
Hemólisis VS Taninos HM	$HEMOLISIS HM = -89.3058 + 2150.77 * Taninos HM$	0.268169	Relativamente débil

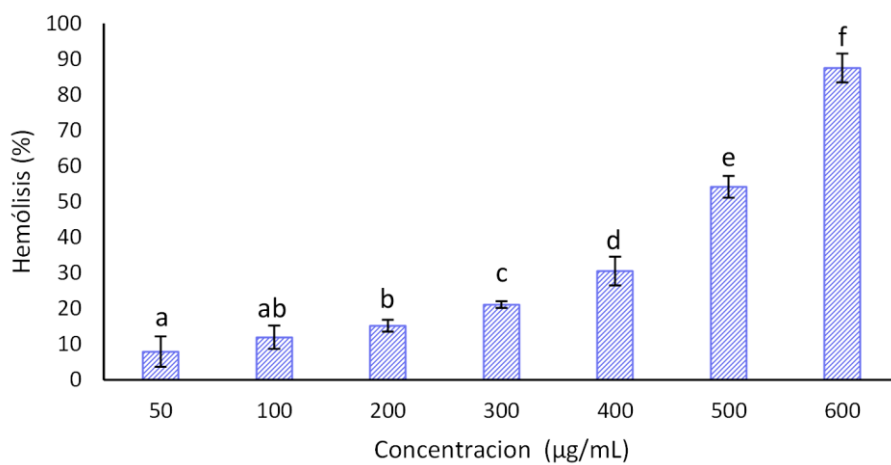
Hemólisis VS Taninos FM	HEMOLISIS FM = 835.846 - 5106.3*TANINOS FM	-0.825302	Moderadamente fuerte
Hemólisis VS Taninos TM	HEMOLISIS TM = 186.613 - 726.234*TANINOS TM	-0.353502	Relativamente débil
Hemólisis VS Taninos HA	HEMOLISIS HA = -311.576 + 1927.07*TANINOS HA	0.511692	Moderadamente fuerte
Hemólisis VS Taninos FA	HEMOLISIS FA = -80.1388 + 643.596*TANINOS FA	0.553974	Moderadamente fuerte
Hemólisis VS Taninos TA	HEMOLISIS TA = 107.283 - 119.487*TANINOS TA	-0.0650743	Relativamente débil
Hemólisis VS Fenoles HM	HEMOLISIS HM = - 286.261 + 8.42994*FENOLES HM	0.427958	Relativamente débil
Hemólisis VS Fenoles FM	HEMOLISIS FM = -68.9915 + 9.40757*FENOLES FM	0.776091	Moderadamente fuerte
Hemólisis VS Fenoles TM	HEMOLISIS TM = 226.636 - 3.91035*FENOLES TM	-0.523913	Moderadamente fuerte
Hemólisis VS Fenoles HA	HEMOLISIS HA = 180.967 - 3.7675*FENOLES HA	-0.639102	Moderadamente fuerte
Hemólisis VS Fenoles FA	HEMOLISIS FA = -21.3008 + 2.61323*FENOLES FA	0.988098	Relativamente fuerte
Hemólisis VS Fenoles TA	HEMOLISIS TA = 448.777 - 5.42471*FENOLES TA	-0.738797	Moderadamente fuerte
Hemólisis VS DPPH HM	HEMOLISIS HM = 10.6074 + 5.64644*DPPH HM	0.84593	Moderadamente fuerte
Hemólisis VS DPPH FM	HEMOLISIS FM = 487.407 - 1.72386*DPPH FM	-0.695557	Moderadamente fuerte
Hemólisis VS DPPH TM	HEMOLISIS TM = 176.063 - 0.142787*DPPH TM	-0.0737236	Relativamente débil
Hemólisis VS DPPH HA	HEMOLISIS HA = 86.9502 - 0.110724*DPPH HA	-0.118921	Relativamente débil
Hemólisis VS DPPH FA	HEMOLISIS FA = 60.6519 + 0.597447*DPPHFA	0.205407	Relativamente débil
Hemólisis VS DPPH TA	HEMOLISIS TA = 77.654 + 1.28035*DPPH TA	0.993977	Relativamente fuerte
Hemólisis VS ABTS HM	HÉMOLISIS HM = 1282.91 - 13.6082*ABTS HM	-0.268169	Relativamente débil
Hemólisis VS ABTS FM	HEMÓLISIS FM = 2881.45 - 31.0424*ABTS FM	-0.432386	Relativamente débil
Hemólisis VS ABTS TM	HEMÓLISIS TM = 851.136 - 35.9722*ABTS TM	-0.935434	Relativamente fuerte
Hemólisis VS ABTS HA	HEMÓLISIS HA = 137.494 - 2.1932*ABTS HA	-0.31449	Relativamente débil
Hemólisis VS ABTS FA	HEMÓLISIS FA = 208.125 - 6.48988*ABTS FA	-0.60534	Moderadamente fuerte
Hemólisis VS ABTS TA	HEMÓLISIS TA = 46.2889 + 1.21475*ABTS TA	0.12468	Relativamente débil

Hemólisis VS Antocianinas HM	HEMOLISIS HM = 211.928 - 177.207*ANTOCIANINAS HM	-0.639166	Moderadamente fuerte
Hemólisis VS Antocianinas FM	HEMOLISIS FM = 528.362 - 264.035*ANTOCIANINAS FM	-0.884629	Moderadamente fuerte
Hemólisis VS Antocianinas TM	HEMOLISIS TM = 175.316 + 61.0655*ANTOCIANINAS TM	0.956145	Relativamente fuerte
Hemólisis VS Antocianinas HA	HEMOLISIS HA = 86.8384 + 0.154587*ANTOCIANINAS HA	0.0257876	Relativamente débil
Hemólisis VS Antocianinas FA	HEMOLISIS FA = 60.854 + 10.8018*ANTOCIANINAS FA	0.886078	Moderadamente fuerte
Hemólisis VS Antocianinas TA	HEMOLISIS TA = 90.1664 + 2.53851*ANTOCIANINAS TA	0.43069	Relativamente débil

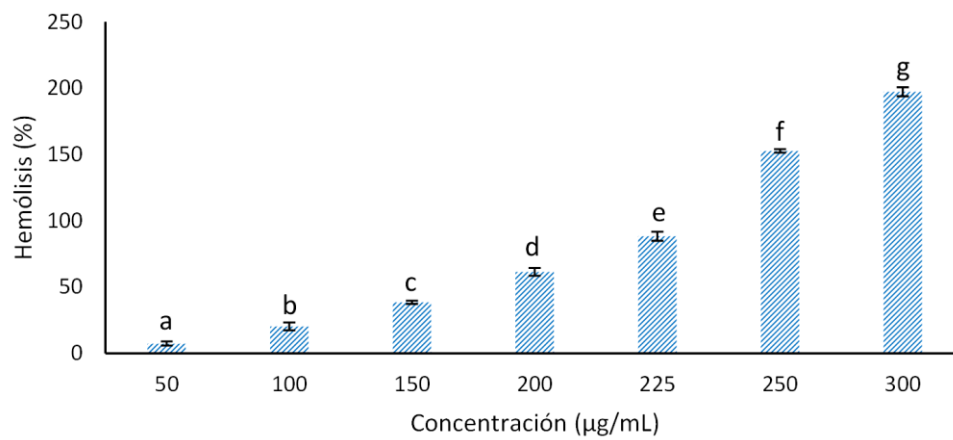
Hoja metanol

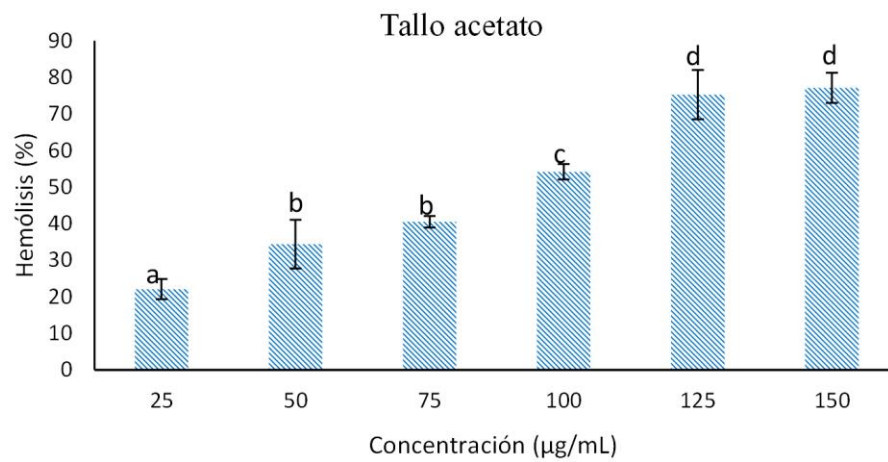
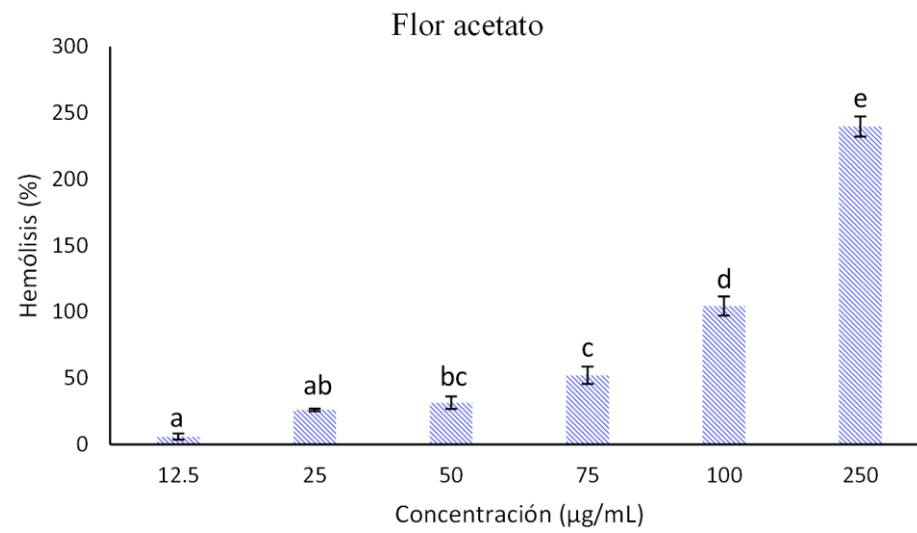
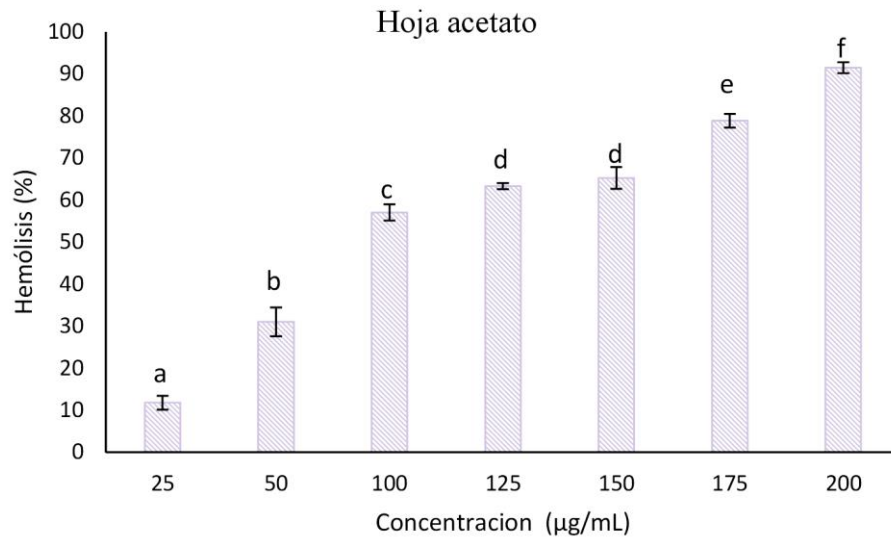


Flor metanol



Tallo metanol





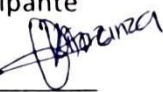


CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

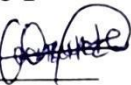
Yo, _____ Fernanda Laila Guzmán Gallardo _____ manifiesto que se me ha informado la naturaleza del estudio Capacidad antioxidante y efecto hemolítico de metabolitos presentes en extractos de Justicia spicigera, he leído y comprendido la información del proyecto y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria, y doy voluntariamente mi consentimiento para donar muestras de sangre durante el periodo que dura la investigación. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación y recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Karen Gamundi Fernández 
 Nombre y firma del participante

17-08-2022
 Fecha


Aranza Diaz Garciuno 
 Nombre y firma del testigo 1

17-08-2022
 Fecha

Dante Gonzalez 
 Nombre y firma del testigo 2

17-08-2022
 Fecha

He explicado al Sr(a). Karen Gamundi Fernández _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Fernanda Laila Guzmán Gallardo 
 Nombre y firma del investigador

17-08-2022
 Fecha