



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

---

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

Obtención y evaluación de la actividad antioxidante de  
extractos de  
*“Justicia spicigera schltdl”*

T E S I S

Que para obtener el título de  
Licenciada en Nutrición

P R E S E N T A

Maricela Alcántara Melchor

Director de Tesis:  
Dr. Abelardo Camacho Luis

Codirector:  
Dra. Raquel Cariño Cortes



Pachuca, Hgo., Febrero/2010

## Índice

I. <b>Resumen</b>	1
II. <b>Marco Teórico.</b>	
1. <i>Justicia spicigera</i> schldl.	3
1.1. Sinonimia	
1.2. Descripción.	
1.3. Distribución geográfica.	
1.4. Usos.	
2. Antecedentes experimentales de <i>Justicia spicigera</i> schldl	6
3. Especies reactivas de oxígeno (ERO).	7
3.1. Radicales libres.	
3.2. Formación de radicales libres.	
3.3. Mecanismos de formación de ERO.	
4. Clasificación de los radicales libres de oxígeno.	9
4.1. Radicales libres inorgánicos o primarios.	
4.2. Radicales libres orgánicos o secundarios.	
5. Estrés oxidativo.	10
6. Efecto de los radicales libres sobre las biomoléculas.	10
6.1. Acido desoxirribonucleico (ADN).	
6.2. Lípidos.	
6.3. Proteínas.	
6.4. Carbohidratos.	
7. Antioxidantes.	12
7.1. Mecanismos antioxidantes.	
8. Enzimas antioxidantes.	13
8.1. Glutación (GSH).	
8.2. Superóxido dismutasa (SOD).	
8.3. Glutación peroxidasa (GPx).	
8.4. Catalasa (CAT).	
8.5. Glutation-S-transferasa(GST).	
9. Otros antioxidantes.	15
10. Plantas y antioxidantes.	16

III.	<b>Problema de investigación.</b>	17
IV.	<b>Justificación.</b>	18
V.	<b>Objetivos.</b>	19
	1. Objetivo general.	
	2. Objetivos específicos.	
VI.	<b>Hipótesis.</b>	19
VII.	<b>Diseño Metodológico.</b>	20
VIII.	<b>Materiales y Métodos.</b>	23
	1. Preparación de la planta.	
	1.1. Preparación de los extractos de la planta.	23
	2. Prueba de DPPH• (ácido 1,1-difenil-2-picrilhidrazil).	24
	3. Prueba de ABTS• (2,2`-azino-di-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico).	25
	4. Tamizaje Fitoquímico.	26
	5. Cromatografía en Columna.	34
	6. Análisis Estadístico	34
IX.	<b>Resultados.</b>	35
	1. Rendimiento de los extractos totales.	35
	2. Ensayo DPPH•.	36
	3. Ensayo ABTS•.	38
	4. Tamizaje Fitoquímico.	40
	5. Cromatografía en Columna.	41
	6. Rendimiento de los Eluatos.	42
	7. Ensayo DPPH• de los Eluatos.	43
	8. Ensayo ABTS• de los Eluatos.	46
X.	<b>Discusión.</b>	49
XI.	<b>Conclusiones.</b>	52
XII.	<b>Perspectivas.</b>	53
XIII.	<b>Bibliografía.</b>	54
	Glosario	60
	Anexos.	64

**ÌNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie Schldl	4
Tabla 2. Usos del Muicle <i>justicia spicigera</i>	5
Tabla 3. Resumen de los ensayos que se realizaron a cada metabólito	26
Tabla 4. Rendimiento de los Extractos Totales	35
Tabla 5. Resultados de las pruebas realizadas a los metabólitos	40
Tabla 6. Diluciones de los eluatos según rendimiento	41
Tabla 7. Rendimiento de los Eluatos	42

**ÌNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Oxidación del DPPH•	24
Figura 2. Oxidación del ABTS•	25
Figura 3. Determinación de la capacidad de captura de radicales libres por el ensayo DPPH•	37
Figura 4. Determinación de la capacidad de captura de radicales libres por el ensayo ABTS•	39
Figura 5. Determinación de la capacidad de captura de radicales libres de los eluatos A, B, C y L por el ensayo DPPH•	43
Figura 6. Determinación de la capacidad de captura de radicales libres de los eluatos D, E, F por el ensayo DPPH•	44
Figura 7. Determinación de la capacidad de captura de radicales libres de los eluatos G y H por el ensayo DPPH•	45
Figura 8. Determinación de la capacidad de captura de radicales libres de los eluatos A, B, C, I, J y L por el ensayo ABTS•	46
Figura 9. Determinación de la capacidad de captura de radicales libres de los eluatos D, E y F por el ensayo ABTS•	47
Figura 10. Determinación de la capacidad de captura de radicales libres de los eluatos G, H y K por el ensayo ABTS•	48
Figura 11. Estructura de la Kaempferitrina	49
Figura 12. Estructura de las ligninas antivirales de <i>Justicia procumbens</i>	51

## Abreviaturas

ERO: Especies reactivas de oxígeno

NF- $\kappa$ B: Factor de necrosis  $\kappa$ B

ABTS•: 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

DPPH•: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

GSH: Glutación

SOD: Superóxido dismutasa

GPx: Glutación peroxidasa

GSSG: Glutación oxidado

CAT: Catalasa

GST: Glutación-S-Transferasa

ADN: Acido desoxirribonucleico

**Este trabajo fue realizado en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo en el Instituto de Ciencias de la Salud en los laboratorios de farmacia**

## Agradecimientos

A **Dios** por permitirme la vida y por escuchar mis oraciones proveyendo cada una de mis necesidades para poder cumplir este sueño, prometiendo superación y éxitos sin fin, para devolver el apoyo brindado, y la mejor de las ayudas que puede haber.

A **mis padres** sabiendo que no existirá una forma de agradecer una vida de sacrificio y esfuerzo, quiero que sientan que el objetivo logrado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue su apoyo.

A **mis hermanos** por su apoyo, por sus consejos, por sus palabras de aliento que me brindaron durante este tiempo y sobre todo por haber confiado en mí.

A **Giezi** por el gran apoyo brindado durante los años más difíciles y más felices de mi vida, por haber significado la inspiración que necesitaba para terminar mi carrera profesional, la cual constituye un aliciente para continuar con mi superación.

A la **Dra. Raquel** por ser de esa clase personas que todo lo comprenden y dan lo mejor de sí mismos sin esperar nada a cambio... porque sabes escuchar y brindar ayuda cuando es necesario... porque te has ganado el cariño, admiración y respeto de todo el que te conoce.

A la **Maestra Abigail Aguilar** y al mismo tiempo a el **Herbario del IMSS** por haberme compartido de sus conocimientos para la caracterización de la planta.

A los **investigadores** Dr. Abelardo Camacho Luis y al M en C. Juan Antonio Gayosso De-Lucio que me apoyaron durante la realización de este trabajo con sus críticas y soluciones a cada uno de los problemas que se me presentaban.

A **Anita** por su amistad y apoyo incondicional que me brinda siempre.

## Dedicatorias

A **Dios** por permitirme existir y si no fuera por su amor, su gracia y su dirección no hubiera llegado al final de este trabajo, en mi han quedado marcadas huellas profundas de éste recorrido lo que me alienta a seguir adelante.

A **mis padres** por la confianza y apoyo que me brindaron mientras estuve fuera de casa y por cada uno de sus consejos que fueron un aliento para seguir adelante.

A la **UAEH** por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de investigación y por haberme permitido ser parte de esta institución.

A **mi familia** por que siempre estuvieron al pendiente de mi, apoyándome sin esperar nada a cambio, los quiero mucho.

A **Giezi** por cada una de sus palabras de aliento en esos momentos en los que estuve a punto de desfallecer, por su amor, su comprensión y su apoyo incondicional. TE AMO



## I. Resumen

Los antioxidantes son sistemas y reacciones que eliminan compuestos químicos y reacciones capaces de evitar que se generen especies reactivas del oxígeno con potencial tóxico. Se ha demostrado que los antioxidantes actúan protegiendo al organismo de la acción de los radicales libres. *Justicia spicigera* (Muicle) es una planta medicinal usada como tónico sanguíneo para cólicos menstruales, anemia, bronquitis y como antiinflamatorio. El objetivo del presente estudio fue determinar la capacidad de captura de radicales libres del extracto de *Justicia spicigera* y evaluar la actividad antioxidante de 4 extractos obtenidos mediante sistema de reflujo por medio de dos ensayos *in vitro* ABTS• (2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) y DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). En donde se encontró que el extracto metanólico fue el que tuvo mayor capacidad de captura de radicales libres con respecto a la vitamina C, además a este extracto se le realizó el tamizaje fitoquímico para identificar los compuestos responsables de dicha actividad, dando un ensayo positivo en la determinación de flavonoides, específicamente de catequinas. De la cromatografía por exclusión molecular que se le realizó a dicho extracto se obtuvieron 11 eluatos a los cuales se evaluó su capacidad antioxidante *in vitro*, encontrándose que los eluatos acuosos presentaron mayor capacidad de captura lo cual concuerda con la forma de uso tradicional, donde permanecen los responsables del efecto antioxidante

**Palabras clave:** Antioxidantes, *Justicia spicigera*, Radicales Libres, Plantas Medicinales.

## Abstract

Antioxidants are systems and reactions that eliminate chemical compounds and reactions capable of generate reactive oxygen species with toxic potential. It has been demonstrated that antioxidants act protecting the organism from the action of free radicals. *Justicia spicigera* (Muicle) is a medicinal plant used as blood tonic in menstrual disorders, anemia, bronchitis and as an anti-inflammatory remedy. The objective of the present paper was to determine the ability of this plant to capture free radicals and to evaluate the antioxidant capacity of 4 samples of extract in 2 essays in vitro ABTS (2,2-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and DPPH (acid 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), in which it was found that the methanol extract was the one which had a larger capture capacity of free radicals compared to vitamin C. Besides, a screening test was performed in order to identify phytochemical compounds in this extract, resulting in a positive result in determining flavonoids called catechins. From the chromatography in columns performed on this extract, 11 eluates were obtained, from which another two ABTS and DPPH tests *in vitro* were made. It was found that the aqueous eluates showed a higher capture capacity, which could justify its traditional use as an infusion, where the agents responsible for its antioxidant effects remain.

**Key words:** antioxidants, *Justicia spicigera*, free radicals, medicinal plants.

## II. Marco Teórico

### 1. *Justicia spicigera Schltl*

#### 1.1. Sinonimia

##### 1.1.1. Popular

Añil de piedra hierba púrpura, limanin, micle, mohuite, muele, muecle, muille, muite, muitle. Oaxaca: me tzi ña; Puebla: mouait (tepehua). mouel, mouitl, moitle; San Luis Potosí: muu (tenek); Yucatán: cruz k'aax.<sup>1</sup>

##### 1.1.2. Botánica.

*Jacobinia spicigera* (Schlec.) L. H. Bailey; *Justicia atramentaria* Benth.; *Sericographis mohintli* Nees; *Justicia mohintli* Hemsley; *Jacobinia scarlatina* Blake.<sup>1</sup>

#### 1.2. Descripción

Clasificación taxonómica pertenece a la familia Acanthaceae y a la sub-clase Asteridae como se muestra en la tabla 1. Es un arbusto de 1.5 a 3m de alto, con tallo muy ramificado y hojas alargadas de 5 a 10 cm de largo de color verde oscuro, flores tubulares anaranjadas en inflorescencias las cuales originan frutos con forma de cápsula. Florece de marzo a mayo; en climas tropicales y templados.<sup>2-5</sup> Se cultiva en huertos y casas, crece a la orilla de caminos, en lugares con bosque mesófilo y de encinos. También se asocia a la selva tropical caducifolia, subcaducifolia, matorral xerófilo y bosque de encino y pino. Desde el nivel del mar hasta los 3000 msnm.<sup>3,5</sup>

**Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie *Schltl***

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Sub-reino</b>	Tracheobionta
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Sub-clase</b>	Asteridae
<b>Orden</b>	Scrophulariales
<b>Familia</b>	Acanthaceae
<b>Genero</b>	Justicia

Fuente: modificado a partir de USDA, 2008.

### 1.3. Distribución geográfica.

El Muicle (*Justicia spicigera Schltl*) es nativa de Norteamérica. En México se encuentra en los estados de Guerrero, Chiapas, Jalisco, Michoacán, Nayarit, San Luís Potosí, Valle de México, Morelos, Tlaxcala, Oaxaca, Puebla, Veracruz e Hidalgo. Su producción en dichos estados es en forma silvestre.<sup>2-4, 7</sup>

En el Estado de Hidalgo se encuentra en, Atlapexco, Huautla, Huejutla, Yahualiacá, Huehuetla, San Bartolo Tutotepec y Tenango.<sup>5</sup>

En América del sur se encuentra en Belice; Costa Rica; El Salvador; Guatemala; Honduras; Nicaragua.<sup>2-4</sup>

#### 1.4. Usos.

En diferentes lugares se le han conferido algunos usos tradicionales los cuales se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2. Usos del Muicle *Justicia spicigera*.**

<b>Medicinal</b>	Tradicionalmente el Muicle se considera un tónico de naturaleza fría y se utiliza para aliviar trastornos menstruales y anemias. Así como para enfermedades metabólicas como la gota. También se emplea para los nervios, el insomnio, bronquitis, cólicos intestinales, vomito, epilepsia, para la desinflamación de golpes, dolores de cabeza y de riñón, anemia, mareos. <sup>2-5</sup> En afecciones respiratorias como tos, gripa y bronquitis se toma la infusión de las hojas como agua de uso. El té de esta planta se toma para limpiar y enriquecer la sangre, mejora la circulación: también para la menopausia. <sup>5</sup>
<b>Colorante</b>	Con la infusión se tiñe el carrizo con el cual se elaboran las canastas llamadas huauteacas que son muy apreciadas en la región. <sup>5</sup>
<b>Ornamental</b>	Por lo vistoso de sus flores se cultiva en patios, huertos o jardines como una planta de ornato. Se utiliza en jardines y cercos, la madera se utiliza para la elaboración de silbatos. <sup>5</sup>
<b>Ritual</b>	En algunas comunidades de la Huasteca esta planta junto con otras especies se utiliza en una ceremonia denominada “baño de los siete días”, en la cual se celebran los siete días de nacido de un niño, durante la ceremonia el niño es bañado con el agua resultante de la maceración de esta y otras plantas, los asistentes a la fiesta también deben bañarse o lavarse las manos con esta agua. <sup>5</sup>
<b>Plaguicida</b>	Las ramas de este arbusto se colocan en el nido de las gallinas para evitar o eliminar a los borucos. Las hojas se utilizan para la elaboración de repelente de mosquitos. <sup>5</sup>

Fuente: Creado a partir de Herbario del IMSS, 1996; Martínez, 1996; Villavicencio, 2005.

## 2. Antecedentes experimentales de *Justicia spicigera schldl*

Se ha encontrado que la infusión de *Justicia spicigera* tiene efecto citotóxico en cultivo de células de leucemia humana TF-1, mediante la inducción de la apoptosis; sin efecto sobre la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas normales. La citotoxicidad también es característica de otras especies como *Justicia procumbens* y *Justicia pectoralis*, aunque no se sabe cual es el compuesto bioactivo de *Justicia spicigera*, este reporte es el primer informe sobre la actividad citotóxica.<sup>8</sup>

Ponce-Macotella reportó que los extractos etanólicos de *Justicia spicigera* tenían una actividad antiparasitaria sobre *Giardia duodenalis* evitando el crecimiento de los trofozoitos, 98% de las células perdieron su tamaño y las membranas celulares fueron dañadas lo que evito su proliferación.<sup>9</sup>

En un estudio realizado a 54 plantas mexicanas sobre el efecto antiinflamatorio que pudieran tener se encontró que *Justicia spicigera* tiene tal efecto ya que actúa como Inhibidor del factor de necrosis  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).<sup>10</sup>

La información química de *Justicia spicigera* es escasa. En la hoja se han detectado los flavonoides camferitrín.<sup>11</sup> y triramnósido de camferol. Se ha detectado también la presencia de taninos en los retoños.<sup>1</sup>

En la búsqueda de especies vegetales con propiedades funcionales, destaca la capacidad antioxidante de los metabolitos contenidos en estas especies, por su naturaleza química de tipo flavonoide podrían representar una ventaja terapéutica y justificaría su uso tradicional.

### **3. Especies reactivas de oxígeno (ERO).**

El oxígeno está asociado a las condiciones de vida aerobia, representa la fuerza motriz para el mantenimiento del mecanismo y viabilidad celular, al mismo tiempo es un peligro potencial debido a las especiales características paramagnéticas de este gas, responsable de la formación de intermediarios parcialmente reducidos y dotados de una alta reactividad conocidos como especies reactivas del oxígeno (ERO). El mundo de los radicales libres en los sistemas biológicos se comenzó a explorar por Denham Harman, quien en 1956 propuso el concepto de que los radicales libres juegan un papel importante en el proceso de envejecimiento.<sup>12-13</sup>

#### **3.1. Radicales libres.**

Un radical libre es una especie química deficiente de electrones, de cualquier elemento o molécula, que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos dándole una configuración electrónica que genera una gran inestabilidad.<sup>13-15</sup> Estos radicales recorren el organismo intentando captar un electrón de las moléculas estables, con el fin de lograr su estabilidad electroquímica iniciando reacciones en cadena que destruyen las moléculas del cuerpo.<sup>16</sup> Un compuesto puede convertirse en radical libre captado o perdiendo un electrón. Asimismo, pueden formarse radicales libres cuando un enlace covalente se rompe y cada electrón de la pareja compartida permanece en un átomo (fisión homolítica). Como consecuencia de poseer electrones desapareados, estas especies químicas son extremadamente reactivas, tienen por tanto una vida muy efímera por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de cuantificar.<sup>15</sup>

Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas, distribuidas ampliamente y difusibles que se producen por diferentes mecanismos.<sup>15</sup> Estos mecanismos incluyen la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal, en los cloroplastos, y las reacciones de

oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo) al interactuar con las principales biomoléculas del organismo.<sup>15, 16</sup>

### **3.2. Formación de radicales libres.**

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se generan de manera habitual durante las reacciones metabólicas tisulares, incluyendo la piel. La mayoría del oxígeno del organismo es utilizado en el metabolismo celular. A través de una serie de adiciones de un electrón, el oxígeno molecular es secuencialmente transformado en anión superóxido, peróxido de hidrogeno, radical hidroxilo y finalmente en agua.<sup>17</sup>

En cambio, en situaciones de elevada demanda metabólica y en presencia de agentes externos como la luz solar, el tabaquismo o la contaminación, también se producen radicales libres por la administración de paracetamol, tetracloruro de carbono y furosemida aunque no se puede olvidar agentes como las radiaciones ionizantes, el *shock* térmico y las sustancias que oxidan el glutatión (GSH) como fuentes de radicales libres, en las que los mecanismos de producción pueden no ser adecuados o suficientes.<sup>15</sup>

Existen también algunas circunstancias en que también se producen radicales libres como son: <sup>15</sup>

- Dieta hiperprotéica
- Traumatismos
- Procesos inflamatorios
- Ejercicio extenuante

### **3.3. Mecanismos de formación de ERO.**

Entre los mecanismos que pueden llevar a una formación excesiva de estos radicales tenemos: <sup>14</sup>



1. Formación de radical superóxido ( $O_2^-$ ) por fuga de electrones en la mitocondria durante la cadena respiratoria mitocondrial, la cual utiliza aproximadamente el 80% a 90% del  $O_2$  que consume una persona; también durante las reacciones de autooxidación debido a la actividad de ciertas enzimas como la xantina oxidasa.
2. La formación de  $H_2O_2$  durante la reacción de dismutación, así como también por la acción de las enzimas oxidasas.
3. Formación del radical hidroxilo debido a la acción de las radiaciones ionizantes, a las cuales los organismos están siempre sometidos. Estas radiaciones probablemente lleven a cabo la ruptura de algunas moléculas de agua de las células.
4. Formación de radicales libres debido al humo del tabaco, los pesticidas y medicamentos utilizados en el tratamiento del cáncer, o durante las reacciones catalizadas por los citocromos  $P_{450}$ .

#### **4. Clasificación de los radicales libres de oxígeno.**

##### **4.1. Radicales libres inorgánicos o primarios.**

Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representa por tanto distintos estados en la reducción de este y se caracteriza por tener una vida media muy corta; estos son el anión superóxido, el radical hidroxilo y el óxido nítrico.<sup>15</sup>

##### **4.2. Radicales libres orgánicos o secundarios**

Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de dos radicales primarios entre sí, poseen una vida media un tanto más larga que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre.<sup>15</sup>

## **5. Estrés oxidativo.**

El estrés oxidativo se define como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de éstas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas de oxígeno.<sup>15</sup>

## **6. Efecto de los radicales libres sobre las biomoléculas**

### **6.1. Acido desoxirribonucleico (ADN).**

Entre las moléculas productoras de radicales libres, tenemos al peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), el cual es un agente de acción bactericida ampliamente conocida y que además causa severos daños al DNA mediante la producción de radicales libres de oxígeno. Estos daños incluyen la inhibición de la actividad transformante de *E. coli*, la pérdida de cualquiera de las cuatro bases nitrogenadas, así como modificaciones en su estructura y a los azúcares, además de producir sitios abasicos, rupturas en las cadenas del DNA mediante las rupturas de los enlaces diesterfosfato, así como la producción de mutaciones.<sup>15</sup>

### **6.2. Lípidos.**

Es aquí donde se produce el daño mayor en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular produciendo edema y muerte celular. Los productos finales del proceso de peroxidación lipídica, entre lo que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes y aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y causar edema e influir en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis. Estos productos pueden también alterar la actividad de fosfolipasa e inducir la liberación de ácido

araquidónico y la subsiguiente formación de prostaglandinas y distintos endoperóxidos. El malondialdehído, que es otro producto final de la peroxidación de ácidos grasos con tres o más dobles enlaces, puede causar entrecruzamiento o polimerización de distintos componentes de la membrana. Así pues, las propiedades de las membranas resultan aún más dañadas.<sup>15, 18</sup>

### **6.3. Proteínas.**

Las proteínas son modificadas de diferente manera por las especies reactivas de oxígeno. Los radicales libres de oxígeno, por ejemplo, pueden reaccionar directamente con el ligando metálico de muchas metaloproteínas. Se ha comprobado que el hierro de la oxihemoglobina puede reaccionar con el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno para formar metahemoglobina. Debido a la reactividad de los radicales libres con las moléculas insaturadas o que contiene azufre, las proteínas con proporciones elevadas de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína pueden sufrir modificaciones de sus aminoácidos mediadas por radicales libres. En este sentido se ha observado que enzimas tales como la papaína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa e incluso la superóxido dismutasa, que dependen todas ellas de dichos aminoácidos para desarrollar su actividad, sufren también alteraciones en su estructura proteica, que dan lugar a entrecruzamientos de cadenas peptídicas y fenómenos de agregación que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares y por último hay formación de grupos carbonilos.<sup>15, 19</sup>

### **6.4. Carbohidratos.**

Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical  $\bullet\text{OH}$ . Para producir sustancias reactivas. Así mismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso fragmentándose a unidades más sencillas. Algunos

investigadores han demostrado que el ácido hialurónico se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radicales hidroxilo, provocando un descenso de la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones. A pesar de que los radicales libres son especies extremadamente reactivas, las células disponen de sistemas de protección frente a ellos.<sup>19, 20</sup>

## **7. Antioxidantes.**

Los compuestos químicos y las reacciones capaces de generar ERO con potencial tóxico son conocidos como prooxidantes. Por otra parte, los sistemas y reacciones que eliminan estas especies, disponen de ellas, suprimen su formación o se oponen a sus acciones se les conocen como antioxidantes.<sup>21</sup>

Un antioxidante celular es definido como una sustancia que está presente en baja concentración con respecto al substrato oxidable y que retarda o evita su oxidación. Entre los antioxidantes celulares tenemos a la vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol),  $\beta$ -caroteno, entre otros.<sup>22, 23</sup>

Existen alimentos que contienen una gran variedad de fitonutrientes, muchos de los cuales tienen propiedades antioxidantes. Además de las bien conocidas vitaminas C y E y los carotenoides, existen otros compuestos como los flavonoides que son fuertes antioxidantes.<sup>23</sup>

Los sistemas antioxidantes pueden dividirse en tres clases:

- Sistemas enzimáticos como la catalasa, la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx).
- Sustancias eliminadoras ("Scavenger") que son pequeñas moléculas que limpian el plasma de oxiradicales, un ejemplo de esto son el  $\alpha$ -tocoferol, el ácido ascórbico, los carotenos y el glutatión.
- Sustancias proteicas que son capaces de secuestrar metales de transición sobre todo el hierro como lactoferrina, ceruloplasmina y transferrina.

## 7.1. Mecanismos antioxidantes.

Los niveles de ERO en las células son modulados por una variedad de enzimas y de antioxidantes.<sup>24</sup> El anión superóxido es convertido a peróxido de hidrogeno por la superóxido dismutasa. La catalasa, la glutatión peroxidasa la tioredoxina funcionan para convertir el peróxido en agua, previniendo su descomposición a radical hidroxilo.<sup>25</sup>

Los antioxidantes pueden actuar de las siguientes formas:<sup>26</sup>

1. Removiendo al oxígeno o disminuyendo su concentración local
2. Removiendo iones metálicos catalíticos
3. Removiendo especies reactivas del oxígeno (ERO) como  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$
4. Evitando la formación de radicales como  $\cdot OH$ ,  $RO\cdot$ ,  $RO_2\cdot$ .
5. Rompiendo la secuencia de una reacción iniciada.
6. Secuestrando o eliminando el singulete de oxígeno.

Los antioxidantes que inhiben la peroxidación lipídica por los mecanismos listados 1, 2, 4 y 6, son llamados antioxidantes preventivos. Los que actúan por el mecanismo 3 también son preventivos, pero son enzimas (catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx), las cuáles no son consumidos en la reacción. Los antioxidantes que rompen la secuencia de la reacción (5), los secuestradores de oxígeno (6) y los quelantes de metales (2) pueden ser consumidos mientras ejercen sus funciones protectoras.<sup>27</sup>

## 8. Enzimas antioxidantes.

### 8.1. Glutatión (GSH):

Es un componente no enzimático del sistema defensivo antioxidante. Es un tripéptido endógeno compuesto por ácido glutámico, cisteína y glicina. Juega un papel central en la defensa celular contra el daño oxidativo. El GSH puede actuar directamente como un "Scavenger" o atrapador y se cree que este es el efecto protector más potente contra la radiación ultravioleta B.<sup>28</sup> El GSH neutraliza los

radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrógeno, y el resultante radical tiol, mucho menos reactivo, decae o degenera o a través de un mecanismo dependiente del oxígeno, en ambos casos formando glutatión oxidado (GSSG).<sup>29</sup>

### **8.2. Superóxido dismutasa (SOD).**

La SOD es una enzima que cataliza la reducción del anión superóxido ( $O_2^-$ ), producido durante la fosforilación oxidativa, o bien derivado de la radiación UV y durante la inflamación, transformándolo en un producto menos reactivo como es el  $H_2O_2$ . La glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT) en conjunto, descomponen este  $H_2O_2$ . La SOD está presente en la piel en diferentes formas: SOD cobre/zinc (Cu/Zn-SOD) y la SOD manganeso (Mn-SOD).<sup>29</sup>

### **8.3. Glutatión peroxidasa (GPx).**

La GPx es una selenoproteína tetramérica con una selenocisteína en cada uno de los cuatro centros activos.<sup>29, 30</sup> Es una enzima intracelular ubicua que utiliza los peróxidos lipídicos como sustrato. La GPx cataliza la conversión del  $H_2O_2$ , inducida por la radiación UV, en agua y oxígeno, usando GSH como cofactor.<sup>31</sup> Como parte del mecanismo antioxidante, evita la oxidación de los lipoperóxidos (L-OOH), reduciéndolos en presencia de GSH. Esta reacción produce hidróxidos que son elementos potencialmente dañinos y que al oxidarse se convierten en radicales alcóxilos, para los que no se conoce enzima que los metabolice.<sup>29</sup>

### **8.4. Catalasa (CAT).**

La catalasa es una enzima que contiene  $Fe^{2+}$ , se encuentra principalmente en los peroxisomas, los cuales sirven para eliminar  $H_2O_2$  y otras moléculas; una vía por la cual la catalasa elimina al  $H_2O_2$  es catalizando una reacción entre dos moléculas de  $H_2O_2$ , resultando en la formación de agua y oxígeno.<sup>32</sup>

A pH fisiológico, la larga vida del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , su capacidad para atravesar bicapas lipídicas y su reactividad con membranas o proteínas unidas a  $\text{Fe}^{2+}$ , se hace que dicho compuesto sea una forma extremadamente peligrosa de oxígeno activado. Por otro lado, los hidroperóxidos reaccionan con metales de transición parcialmente quelados, formando especies radicales muy reactivas, como los radicales hidroxilo y alcóxilo, a través de la reacción de Fenton. Una concentración elevada de anión superóxido. El mecanismo de inactivación es probablemente la descomposición, dependiente del oxígeno, de uno de los cuatro anillos de porfirina.<sup>33</sup>

### **8.5. Glutation-S-transferasa(GST).**

Las GST son enzimas miembros de una familia de supergenes. Se encuentra tanto en el citosol como en la mitocondria,<sup>34</sup> y juegan un papel primordial en la eliminación de productos derivados del estrés oxidativo, incluyendo los hidroperóxidos de DNA. Se considera que las ERO son las responsables de los efectos nocivos de la radiación ultravioleta sobre la piel. Como ya sabemos, los efectos de la radiación ultravioleta implican daños moleculares con la consecuente inflamación, mutagénesis y genotoxicidad.<sup>35</sup>

### **9. Otros antioxidantes.**

Además de las enzimas anteriores, también existen otras más en el citosol que catalizan la eliminación del anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y del peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), reduciendo al máximo la formación de radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), moléculas con capacidad de fijar y destruir los radicales libres: Scavenger (atrapadores), neutralizadores del oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ): tales como el glutatión, la vitamina E, etc.<sup>36</sup>

También existen antioxidantes de origen natural, los cuales son administrados de distintas formas. Los antioxidantes naturales se encuentran en casi todas las plantas, estos antioxidantes incluyen sustancias como carotenoides, vitaminas,

fenoles, flavonoides, glutatión dietario y metabolitos endógenos.<sup>37</sup> Los antioxidantes derivados de plantas han demostrado su acción como apagadores de singuletes y tripletes de oxígeno, atrapadores de radicales libres, eliminadores de peróxido, inhibidores de enzimas y sinergistas en el apagamiento de especies reactivas de oxígeno (ERO).<sup>38</sup>

## **10. Plantas y antioxidantes.**

Las frutas y los vegetales contienen una gran cantidad de nutrientes, muchos de los cuales presentan propiedades antioxidantes; <sup>39</sup> se han encontrado nutrientes antioxidantes además de las vitaminas C y E y de los carotenoides, otros como los flavonoides, que son componentes de frutas y vegetales que tienen una gran cantidad antioxidante. Estudios realizados en uvas, toronja, tomate, naranja y manzanas, muestran que la mayoría de la capacidad antioxidante está relacionada con la presencia de compuestos fenólicos de los cuales los flavonoides son la familia más abundante. La protección proporcionada por frutas y vegetales contra diversas enfermedades ha sido atribuida a la presencia de compuestos con propiedad antioxidante como los flavonoides y taninos. La presencia de compuestos antioxidantes en frutas y vegetales ha estimulado a la investigación de estos en el ámbito de los radicales libres encontrando cada vez más componentes de las plantas que nos proporcionan una protección.<sup>40</sup>



### **III. Problema de investigación**

En los últimos años se ha adquirido un especial interés sobre el papel que pudiera tener la sobreproducción de radicales libres en la patogenia de numerosas enfermedades, así como el valor de la terapia antioxidante.

Actualmente el interés por las plantas medicinales ha resurgido una vez más en el ámbito de la ciencia y la economía, encontrando frecuentemente en la literatura científica la inclusión de especies vegetales, como uno de los recursos naturales para el tratamiento de enfermedades o simplemente como complemento o suplemento, aunque también es importante tomar en cuenta algún efecto colateral peligroso.<sup>41</sup>

Hasta el momento falta información científica para conocer la utilización del Muicle y su posible actividad antioxidante, ya que lo único que se sabe es que se utiliza tradicionalmente como remedio para algunas afecciones como el insomnio, cólicos intestinales, vomito, epilepsia, antiinflamatorio, dolores de cabeza y de riñón, mareos y anemia.<sup>2, 3, 5</sup> En algunas otras como afecciones respiratorias, tos, gripa y bronquitis.<sup>5</sup>

Hasta el momento es escasa la información sobre la posible actividad antioxidante que tiene el Muicle para y así poder utilizarlo en algún tratamiento farmacéutico o bien como complemento alimenticio para personas que tengan un gran estrés oxidativo.

Por lo tanto este trabajo permitirá ampliar el conocimiento en cuanto a la actividad antioxidante que pudiera tener esta planta, así como su composición química cualitativa.

#### **IV. Justificación**

Debido a la existencia de un desequilibrio entre los mecanismos prooxidantes y antioxidantes en el organismo humano existe la necesidad de encontrar compuestos que ayuden a disminuir el estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es uno de los principales causantes de las enfermedades crónico-degenerativas como el Cáncer, Diabetes Mellitus, hipertensión siendo las principales causas de muerte a nivel mundial.

Se ha demostrado que los antioxidantes existentes en determinados alimentos y plantas medicinales actúan protegiendo al organismo de la acción de los radicales libres, causantes de los procesos de envejecimiento y algunas enfermedades crónicas.

Se ha reportado que *Justicia spicigera* tiene propiedades antivirales, antiparasitarias y citotóxicas en células de leucemia humana. Sin embargo, aun no se han identificado los metabolitos responsables de su bioactividad.

Únicamente se ha reportado la identificación de metabolitos de tipo flavonoide: justicidinas y kaempferitrina

Por lo tanto es posible que el extracto de *Justicia spicigera* tenga actividad antioxidante, lo cual podría explicar en parte su posible mecanismo de acción. Y así ayudar a la nueva generación de medicamentos a partir de productos naturales que pueden contrarrestar el daño causado por el estrés oxidativo

## V. Objetivos

### 1. Objetivo general

Determinar la capacidad de captura de radicales libres del extracto total de *Justicia spicigera* mediante dos ensayos *in vitro*.

### 2. Objetivos específicos

- Obtener el extracto hexánico, acetato de etilo, metanólico y acuoso de *Justicia spicigera*.
- Determinar la capacidad de captura de radicales libres mediante las técnicas dos ensayos:
  - ABTS • (2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) y
  - DPPH • (ácido 1,1-difenil-2-picrilhidrazil)
- Realizar un tamizaje fitoquímico para identificar la posible familia de compuestos responsables de la actividad antioxidante.
- Fraccionar mediante cromatografía de exclusión molecular el extracto crudo con mayor actividad antioxidante e identificar la fracción eluida con mayor actividad.

## VI. Hipótesis

Si los extractos de *Justicia spicigera schtdl* presentan capacidad antiradical entonces serán capaces de decolorar los radicales catiónicos ABTS<sup>+</sup> y DPPH<sup>+</sup> en el medio de reacción.

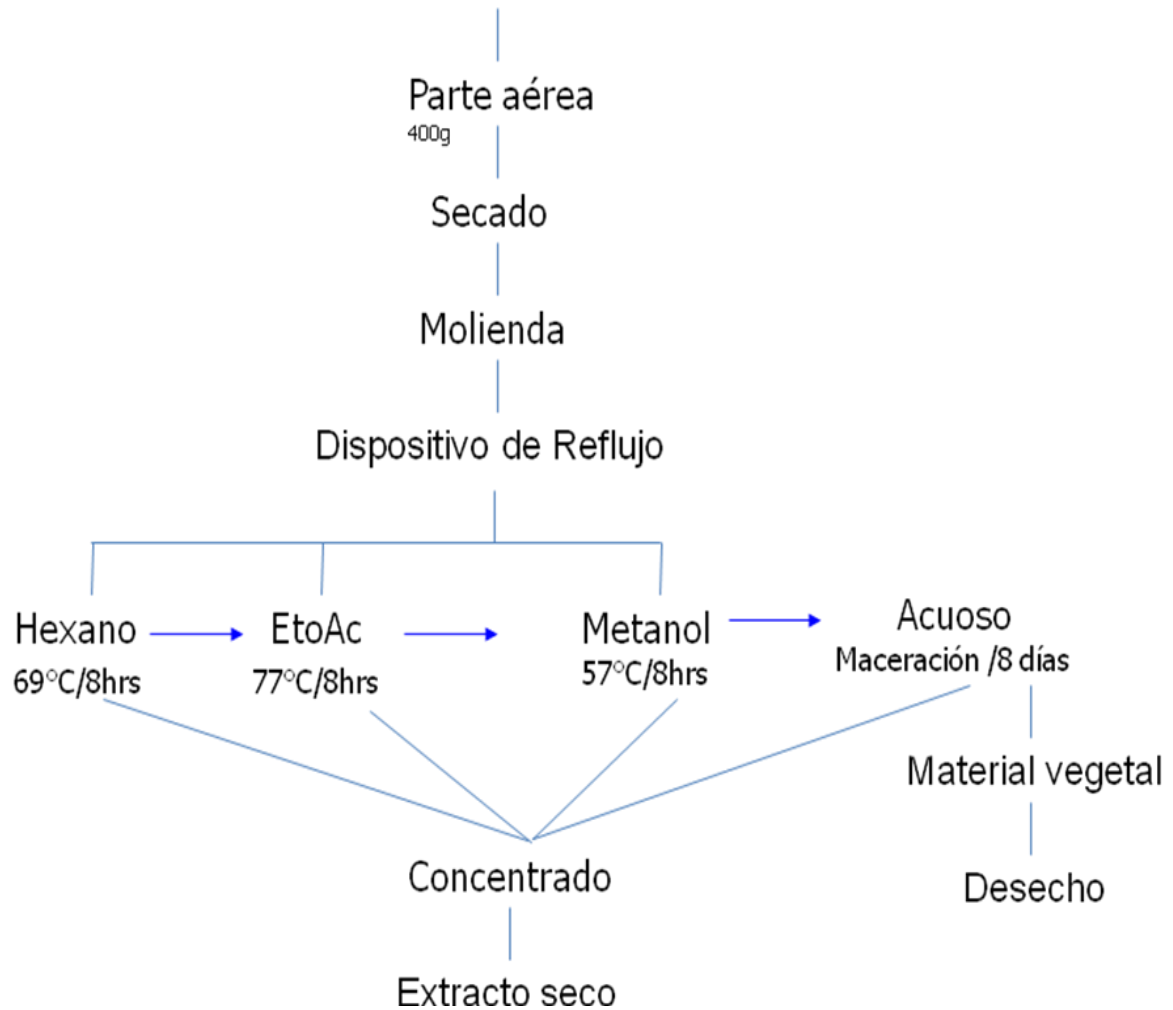
## VII. Diseño Metodológico

El diagrama 1 nos muestra el proceso que se llevo a cabo desde que se obtuvo la planta, su identificación como *Justicia spicigera*, el proceso de secado, molienda y la obtención de los 4 extractos hasta llegar a la sequedad de estos.

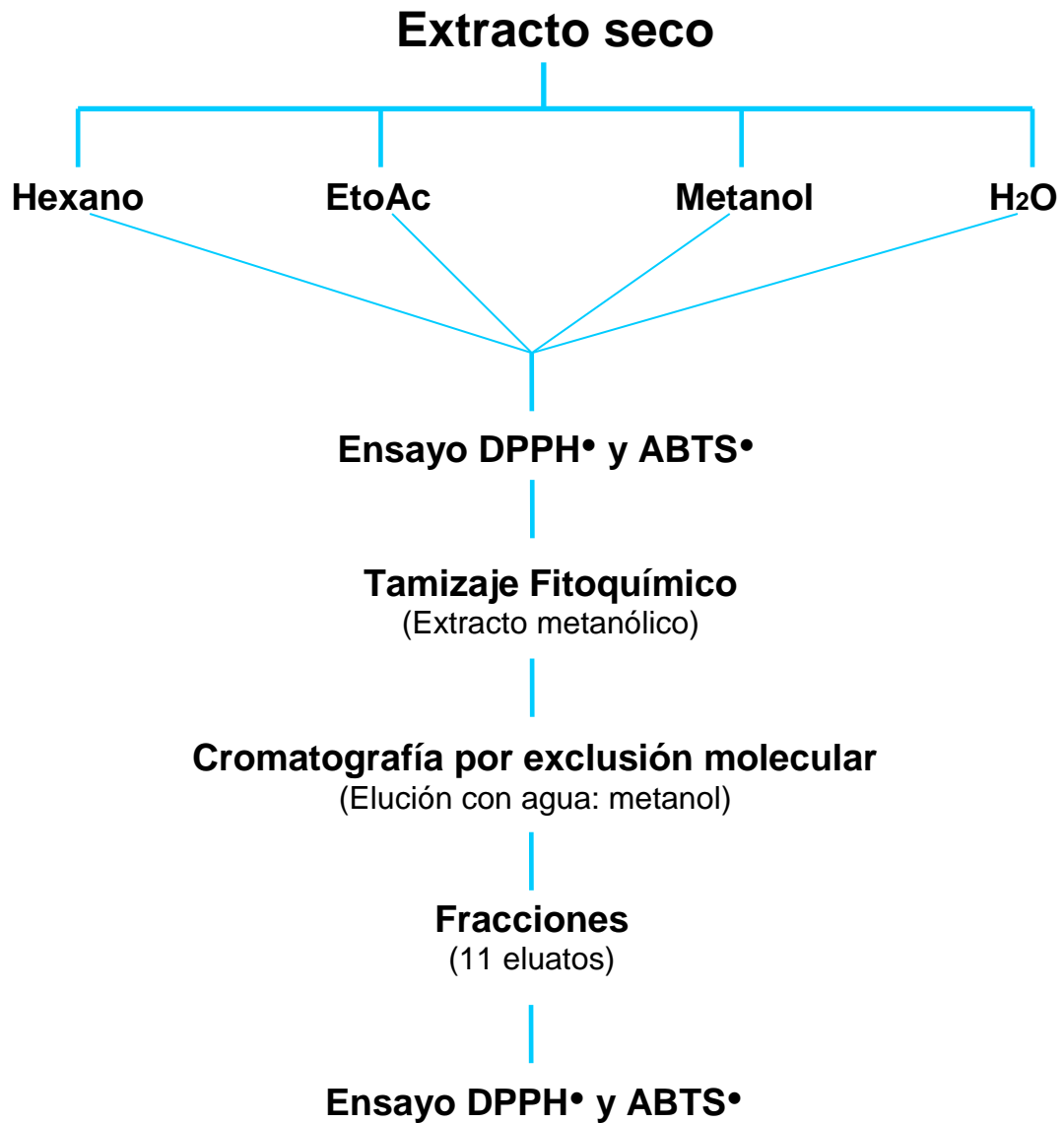
En el diagrama 2 podemos observar los pasos siguientes una vez que se obtuvieron los extractos como son la realización de los ensayos DPPH• y ABTS• y posteriormente al extracto con mayor capacidad de captura de radicales libres se le realizó el tamizaje fitoquímico que es una prueba cualitativa para identificar algunos de los compuestos presentes en este extracto, una vez realizado el tamizaje fitoquímico el extracto se separo por medio de una cromatografía en columna obteniendo de ella fracciones a las cuales también se les realizaron las dos pruebas DPPH• y ABTS• para determinar su capacidad de captura de radicales libres de estas.

# ***Justicia spicigera Schltdl***

*voucher-* 15,519



**Diagrama 1: Obtención de extractos crudos**



**Diagrama 2: Determinación de la actividad antioxidante de extractos totales y fracciones; tamizaje fitoquímico**

## **VIII. Materiales y Métodos**

### **1. Preparación de la planta**

La planta se adquirió en el mercado Santa Cruz Tecámac Estado de México ubicado entre las calles Felipe Villanueva y Francisco González Bocanegra. Según el locatario tiene una procedencia del Estado de Puebla, la colecta se dio en el mes de enero de 2009 y fue identificada por la Maestra en Ciencias Abigail Aguilar Contreras, Jefa del Herbario del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS como *Justicia spicigera Schtdl* (Muicle), asignando el voucher 15,519 y depositado en el Herbario de la misma institución. Se obtuvo únicamente la parte aérea (hojas y tallos) la cual se puso a secar a la sombra para después someterla a molienda mecánica y así obtener los extractos de n-hexano, acetato de etilo (EtoAc), metanólico y acuoso.

#### **1.1. Preparación de los extractos de la planta**

Para obtener los extractos se molió la parte aérea de la planta y se pesaron 400 g de esta, se colocó en un sistema de reflujo en una concentración 1:1 con cada uno de los disolventes de manera consecutiva agregándose en orden creciente de polaridad n-hexano durante 8 h., a 69 °C; acetato de etilo durante 8 h, 77 °C; metanol durante 8 h, 57 °C; por último se puso en maceración con agua destilada

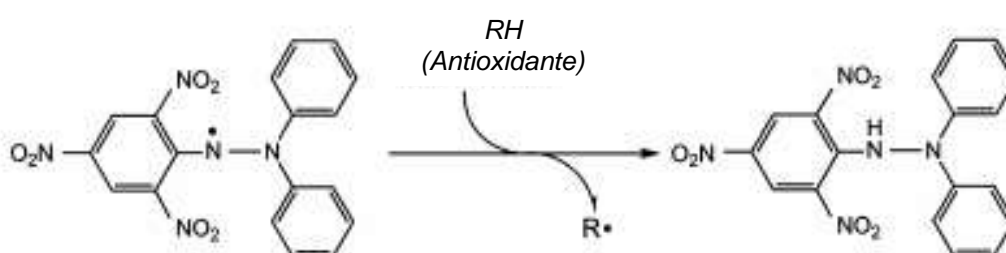
durante 8 días a temperatura ambiente conforme se fue sacando del dispositivo de reflujo, se filtro por gravedad y se concentro a presión reducida en un rotavapor marca Buchi, el material vegetal puso a secar para después agregar el siguiente disolvente. El extracto n-hexanico se concentró a una temperatura de 40 °C y una presión de 335 mbar, acetato de etilo a 40 °C y una presión de 240 mbar, metanólico a 40-45 °C a una presión de 337 mbar y el acuoso a 40 °C y una presión de 72 mbar.

Para asegurar que el extracto tuviera la menor cantidad de líquido se pusieron a secar por arrastre de vapor hasta sequedad y poder determinar el rendimiento de cada extracto. Los extractos secos se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

## 2. Prueba de DPPH• ( 2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

A los extractos totales se les realizó la prueba del ácido 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) para determinar su capacidad de captura de radicales libres.<sup>42, 43</sup> Este ensayo se realizó por quintuplicado y se tomó como referencia a la vitamina C. Las diluciones se hicieron desde 19 ppm hasta 10,000 ppm.

Recientemente, el ensayo DPPH• se ha convertido en un estudio de uso frecuente cuando se trata de antioxidantes naturales. Una de las razones es que este método es simple y altamente sensible. Este análisis se basa en la teoría de que un donante de hidrógeno es un antioxidante (figura 1). El DPPH• es uno de los pocos compuestos estables y disponibles comercialmente, el efecto antioxidante es proporcional a la desaparición de DPPH• en las muestras de prueba. El color pasa de púrpura a amarillo seguido por la formación de DPPH• a la absorción de hidrógeno a partir de un antioxidante. Esta reacción es estequiométrica con respecto al número de átomos de hidrógeno absorbidos. Por lo tanto, el efecto antioxidante fue fácilmente evaluado siguiendo el descenso de absorción de rayos UV de 517 nm.<sup>44</sup>





**DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)**  
radical libre

**DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)**

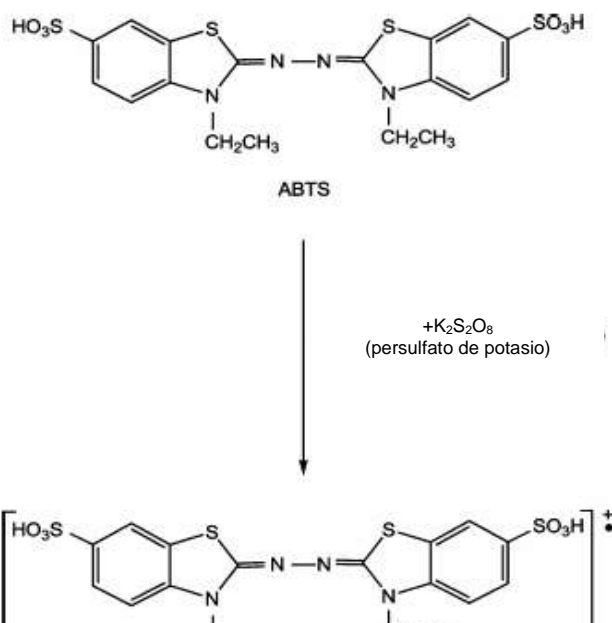
**Figura 1. Oxidación del DPPH •**

Tomado y modificado a partir de Joon-Kwan y Shibamoto T, 2009

### 3. Prueba de ABTS• (2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico))

A los extractos totales se les realizó la prueba con (2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) ABTS• para determinar su capacidad de captura de radicales libres <sup>45</sup>. Este ensayo se realizó por triplicado tomando como referencia a la vitamina C. Las diluciones se hicieron de 19 ppm hasta 10,000 ppm.

El ensayo de ABTS•, ha sido ampliamente utilizado para evaluar la actividad antioxidante de los componentes en los alimentos y bebidas, debido a su aplicabilidad en la fase acuosa como de lípidos. La actividad antioxidante de los extractos se determinó por la decoloración del ABTS•, mediante la reducción del catión radical expresado en el porcentaje de decoloración de la absorbancia a 734 nm.<sup>44</sup>



**Formación del radical estable ABTS desde ABTS con persulfato de potasio  
(2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)**

**Figura 2. Oxidación del ABTS•**

Tomado y modificado a partir de Joon-Kwan y Shibamoto T, 2009

#### 4. Tamizaje Fitoquímico

Para realizar el Tamizaje Fitoquímico se utilizó el extracto que tuvo mayor capacidad de captura de radicales libres. Se pesaron 0.4 g de extracto de la planta y se disolvieron en 40 mL de metanol; a partir de esta disolución se tomaron las muestras para cada una de las pruebas que se realizaron.

Las pruebas que se le realizaron fueron las que se presentan en la tabla 3<sup>46</sup>:

<b>Tabla 3. Resumen de los ensayos que se le realizaron a cada metabolito</b>	
<b>Metabólitos</b>	<b>Ensayos</b>
<b>Alcaloides</b>	<b>Dragendorff</b>
	<b>Mayer</b>
	<b>Wagner</b>
<b>Triterpenos y esteroides</b>	<b>Solkowski</b>
	<b>Rosemheim</b>
<b>Quinonas</b>	<b>Borntrager</b>
	<b>Variante con benceno</b>
<b>Cumarinas</b>	<b>Baljet</b>
	<b>Legal</b>
	<b>Hidroxamato férrico</b>
<b>Saponinas</b>	<b>Espuma</b>
<b>Poliurónidos</b>	<b>Poliurónidos</b>
<b>Resinas</b>	<b>Resinas</b>
<b>Azúcares Reductores</b>	<b>Fehling</b>

	<b>Benedict</b>
<b>Fenoles y Taninos</b>	<b>Cloruro Férrico</b>
	<b>Gelatina</b>
<b>Aminoácidos libres y aminas en general</b>	<b>Ninhidrina</b>
<b>Carbohidratos</b>	<b>Molisch</b>
<b>Glicócidos cardíacos</b>	<b>Kedde</b>
<b>Flavonoides</b>	<b>Acido sulfúrico concentrado</b>
	<b>Shinoda</b>
	<b>Rosemheim</b>
	<b>Catequinas</b>

Fuente: Tomado y modificado a partir de Domínguez X A, 1979; Miranda M M, 1992; MINSAP, 2007.

**4.1. Identificación de alcaloides Ensayo de Dragendorff:** como la alícuota del extracto estaba en un solvente orgánico se evaporo en baño de agua y el residuo se redisolvió en 1mL de ácido clorhídrico 1% (HCL) en agua, se mezcló con 3 gotas del reactivo. Para considerar que la prueba es positiva se toma en cuenta lo siguiente: si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado de color rojo ladrillo (+++).<sup>46, 47</sup>

**4.1.1. Ensayo de Mayer:** se procedió de la misma manera que en el ensayo anterior hasta obtener la solución ácida. Se añadió una pizca de cloruro de sodio en polvo (NaCl), se agitó y filtró. También se le colocaron 3 gotas del reactivo: para considerar que el ensayo es positivo se consideró lo siguiente: si se observaba opalescencia (+), turbidez definida (++) o precipitado coposo color crema, blanco o amarillo (+++) indica que la reacción es positiva.<sup>46</sup>

**4.1.2. Ensayo de Wagner:** al igual que en los casos anteriores se parte de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma. Un resultado positivo se indica por un precipitado carnemita.<sup>46</sup>

Interferencias:

- Proteínas que precipitan por adición de un reactivo que contenga un metal pesado
- Aminoácidos
- Aminas metiladas
- Cumarinas

- Carbohidratos
- Sustancias albuminosas
- Sales de amonio
- Taninos
- Hidroxiflavonas alquiladas
- Cardenólidos y bufadienílicos

Esta gran cantidad de compuestos no alcaloides y en algunos casos no nitrogenados que reaccionan similar a los alcaloides, se cree se deba a que pueden poseer carbonilos conjugados (cetonas o aldehídos) o funciones lactónicas que funcionan en una manera típica a los mismos.<sup>46</sup>

## **4.2. Identificación de triterpenos y esteroides**

**4.2.1. Ensayo de Solkowsky:** 1 mL de la fracción que se disolvió en  $\text{HCCL}_3$  se colocó en un tubo de ensayo con 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Un ensayo positivo se indica por una coloración amarilla rojiza.<sup>46-49</sup>

**4.2.2. Ensayo de Rosemheim:** 1 mL de la fracción de  $\text{HCCl}_3$  se mezcló con 1 mL de la solución de ácido tricloroacético al 90% en agua en un tubo de ensayo. Si se encontraba la presencia de dienos nucleares reales o potenciales si se formaba un color violeta que cambia a azul después de 20 minutos.<sup>46-49</sup>

## **4.3. Identificación de quinonas**

**4.3.1. Ensayo de Borntrager:** como la alícuota no se encontraba en  $\text{HCCL}_3$ , se evaporó el solvente en baño de agua y el residuo se redisolvió en 1 mL de  $\text{HCCL}_3$ , se agitó con 1 mL de solución de hidróxido de sodio (NaOH), potasio o amonio (KOH ó  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) al 5% en agua, mezclando las fases y se dejó en reposo hasta separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) es de colores de rosado a rojo (coloración rosada (++)), roja (+++) el ensayo se considera positivo (naftoquinonas y antraquinonas).<sup>46-49</sup>

Un ensayo negativo no excluye la presencia de quinonas, ya que pueden encontrarse en forma de glicósidos, siendo necesario la hidrólisis previa de los mismos para su posterior detección (glicósidos antracénicos).<sup>46, 47</sup>

**4.3.2. Variante:** 2 mL de la fracción de  $\text{HCCL}_3$  se concentraron a sequedad y se redisolvierón en 2 mL de benceno. Se agito un tubo de ensayo con 2 mL de NaOH al 5% en agua. Una evidencia positiva es la que sigue:

1-2-naftoquinonas benceno (rojo) álcali (azul violáceo)

1-4-naftoquinonas benceno (amarillo) álcali (rojo).<sup>46</sup>

#### 4.4. Identificación de Cumarinas

**4.4.1. Ensayo de Baljet:** permitió reconocer en el extracto la presencia de compuestos con agrupamientos lactónicos, en particular cumarinas, aunque pueden dar positivos otros metabolitos.

Como la alícuota del extracto no se encontraba en alcohol, se evaporo el solvente en baño de agua y se re disolvió en la menor cantidad de alcohol (1 mL). En estas condiciones se adiciono 1 mL del reactivo considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración(++) o precipitado rojo (+++), respectivamente.<sup>46-48</sup>

##### Interferencias a esta reacción

- Lactonas sesquiterpénicas o sesquiterpenlactonas
- Simaroubalidanos y limonoides

**4.4.2. Ensayo Legal:** a una solución del extracta disuelto en alcohol etílico se le añadieron 2 gotas de una solución recientemente preparada de nitroprusiano de sodio al 5% en agua y a continuación 1-3 gotas de solución de NaOH 2 M. En caso positivo aparece una coloración roja intensa que desaparece en unos minutos.<sup>46-49</sup>

##### Interferencias:

- Lactonas sesquiterpénicas

**4.4.3. Ensayo de Hidroxamato férrico:** una gota del extracto se coloco en una placa de porcelana y se añadió una gota de clorhidrato de hidroxilamina disuelto en etanol al 10%. Se añadieron unas gotas de hidróxido de potasio al 10% en

etanol y se calienta a la llama hasta burbujeo, una vez burbujeando se añadieron unas gotas de ácido clorhídrico (HCl) al 0.5 N y una gota de cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>) al 1% en agua. El desarrollo de una coloración violeta (+), claro (++) , intenso (+++).<sup>46-48</sup>

#### **4.5. Identificación de Saponinas**

**4.5.1. Ensayo de la espuma:** permitió conocer la presencia de saponinas tanto de tipo esferoidal como triterpénicas.

De modo que como la alícuota se encontraba en metanol, se diluyó en 5 veces su volumen en agua y se agitó la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos, dejándose en reposo. El ensayo se considera positivo si aparece espuma de más de 2 mm de altura, en la superficie del líquido y persiste por más de 2 minutos.<sup>46-48</sup>

#### **4.6. Identificación de Resinas**

**4.6.1. Ensayo de resinas:** para detectar este tipo de compuestos se adicionaron 2 mL de la solución alcohólica y 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado indica un ensayo positivo.<sup>46-49</sup>

#### **4.7. Identificación de azúcares reductores**

**4.7.1. Ensayo de Fehling:** como la alícuota del extracto no se encontraba en agua, se evaporó al solvente en baño de agua y el residuo se redisolvió en 1-2 mL de agua, se adicionaron 2 mL del reactivo, se calentó la mezcla en baño de agua durante 10-30 minutos. El ensayo se considera (+) si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo.<sup>46-49</sup>

**4.7.2. Ensayo de Benedict:** el residuo se redisolvió 1-2 mL de agua porque la fracción no era acuosa y se adicionó 1 mL del reactivo, se calentó la mezcla en baño de agua durante 10-30 minutos. El ensayo se considera (+) con la aparición de un precipitado rojizo.<sup>46</sup>

#### **4.8. Identificación de fenoles y taninos**

**4.8.1. Ensayo de Cloruro Férrico:** a la fracción disuelta en 1 mL de metanol se le añadieron 0.5 mL (3 gotas) de una solución de cloruro férrico al 5% en solución

salina fisiológica. La aparición de un precipitado o color verde oscuro indica la presencia de fenoles y/o taninos.<sup>46, 49</sup>

Si el extracto es acuoso el ensayo determina principalmente taninos. A una alícuota del extracto se le añade acetato de sodio para neutralizar y 3 gotas de una solución de FeCl<sub>3</sub> al 5% en una solución salina fisiológica, un ensayo (+) puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotaninos

Interferencias a esta reacción:

- Todos los compuestos que tengan OH fenólicos
- Flavonoides
- Lignanós
- Lactonas sesquiterpénicas
- Quinonas
- Aceites esenciales

**4.8.2. Ensayo de gelatina:** se concentro a sequedad 1 mL del extracto y se adiciono 1 mL de solución salina fisiológica y 3 gotas de solución de gelatina recientemente preparada a 0.5%. Un precipitado blanco o turbidez indica un ensayo positivo. Si la fracción es acuosa no es necesario evaporar.<sup>46</sup>

#### **4.9. Identificación de aminoácidos libres y aminos en general**

**4.9.1. Ensayo de Ninhidrina:** se toma una alícuota del extracto en metanol, se mezcla con 2 mL de la solución al 2% en agua ó 0.2% en alcohol de ninhidrina. Se calentó de 5-10 minutos en baño de agua. Este ensayo se considera (+) cuando se desarrolla un color azul-violáceo.<sup>46, 49</sup>

Interferencias:

- Alcaloides

#### **4.10. Identificación de glicósidos cardiacos**

**4.10.1. Ensayo de Kedde:** la fracción se disolvió en 1 mL de etanol, se mezcló con 1 mL del reactivo y se dejó reposar durante 5-10 minutos. Un ensayo positivo fue aquel en el que se desarrolló una coloración azul o violeta persistente durante 1-2 horas (cardenólidos y sus agliconas).<sup>46-49</sup>

**4.10.2. Ensayo de Raymond:** el residuo se disolvió en 1 mL de etanol al 50%, se agregaron unas gotas de solución de m-dinitrobenceno al 10% en etanol y unas gotas de solución de NaOH al 20% en agua. Un ensayo (+) se indica por una coloración violeta o azul.<sup>46-48</sup>

Esta prueba la dan positivos sustituyentes con grupos metileno activos

#### 4.11. Identificación de Flavonoides

**4.11.1. Ensayo con ácido Sulfúrico concentrado:** 1 mL del extracto se concentró a seco en tubos de ensayo y se agregaron unas gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Un ensayo (+) se indica por una coloración diferente al carmelita claro.<sup>46-48</sup>

Las siguientes coloraciones también son indicativas de un ensayo positivo:

- Coloración amarillo intenso es indicativo de flavonas y flavonoles
- Coloración anaranjado o guinda es indicativo de flavanonas
- Coloración rojo guinda o rojo azulado es indicativo de calconas o auronas

Interferencias: Quinonas

**4.11.2. Ensayo de Shinoda:** una alícuota del extracto en alcohol se le adicionó 1 mL de HCl concentrado y un pedacito de magnesio metálico o zinc. Cuando la reacción terminó se añadieron 2 mL de alcohol amílico y se agitó.

El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, rosado, vino, carmelita o rojo intenso en todos los casos, ocasionalmente verde o azul como reacción positiva para aglicón o heterosidos.<sup>46-48</sup>

Las coloraciones que a continuación se describen son indicativas de determinados flavonoides:<sup>46-48</sup>

- Coloración amarilla, naranja hasta rojo son indicativas de la presencia de flavonas
- Coloración rojo a carmesí o rojo a magenta indicativos de flavonol o flavonol.



- Colores carmesí a magenta ; rojo, magenta, violeta, azul son indicativos de flavononas
- Color amarillo es indicativo de isoflavonas
- Las isoflavononas, calconas y auroras no dan coloración

**4.11.3. Ensayo de Rosemheim:** permito reconocer en el extracto la presencia de leucoantocianidinas y antocianidinas.

1mL del extracto en metanol se calienta 10 minutos con 1 mL de HCl concentrado. Se dejó enfriar y se añadió 1 mL de agua y se agitó con 2 mL de alcohol amílico. Se dejaron separar las dos fases. La aparición de color rojo marrón en la fase amílica es indicativa de un ensayo (+).<sup>46-49</sup>

Colores anaranjados o rojo azulado es indicativo de antocianidinas.<sup>48</sup>

**4.11.4. Ensayo de Catequinas:** para ello se tomó de la solución metanólica obtenida una gota con la ayuda de un capilar y se aplicó la solución sobre papel filtro. Sobre la mancha se aplicó la solución de carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz ultravioleta indica un ensayo positivo.<sup>48</sup>

## 4.12. Identificación de carbohidratos y/o glicósidos

**4.12.1. Ensayo de Molish:** 2 mL del extracto acuoso se colocaron en un tubo de ensayo y se le añadieron unas gotas de solución de alfa-naftol al 5% en etanol. Se mezcló y por la pared del tubo se adicionó 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. La aparición de un anillo violáceo en la interface indica una reacción positiva.<sup>46</sup>

### Interferencias:

- Todos los metabolitos secundarios que estén en forma de glicósidos: saponinas, quinonas, flavonoides, carotenóidos, cumarinas

## 4.13. Identificación de poliurónidos

**Ensayo:** a 2mL del extracto se le adicionaron 10 mL de alcohol. La evidencia positiva es la aparición de un precipitado.<sup>46-49</sup>

## 5. Cromatografía en Columna por Exclusión Molecular.

Con respecto a los resultados que se obtuvieron en el Tamizaje Fitoquímico se realizó una cromatografía en columna utilizando Sephadex LH20, utilizando una mezcla agua-metanol como disolvente de elución.

El Sephadex LH20 se dejó remojando por 24 h, <sup>50, 51</sup> se vertieron 54 mL de Sephadex en una columna y se pasaron 500 mL de agua por él para poder equilibrarlo, (para evitar que el Sephadex se seque) se agregaron 3 gr del extracto metanólico disuelto en agua-metanol en una proporción de 1:1 previamente filtrado; una vez que se absorbió el extracto se colectaron fracciones de 300 mL por eluato, mediante la elución con proporciones crecientes de agua: metanol (10:0, 9:3, 6:4, 2.33:1, 1.5:1, 1:1, 1:1.5, 1:2.33, 4:6, 3:9, 0:10).<sup>52- 54</sup>

La cromatografía en columna por Sephadex LH20 o exclusión molecular puede separar compuestos hidrofílicos y lipofílicos como los esteroides, terpenoides, lípidos y péptidos de bajo peso molecular así como compuestos fenólicos. Debido a su carácter dual se hincha con agua y muchos disolventes orgánicos más. Tanto la partícula húmeda, tamaño y límite de exclusión puede variar dependiendo del disolvente para la inflamación en el caso de que el solvente sea metanol como en este estudio la partícula va de 27-163 micras con un diámetro de 103 micras. Dependiendo de los disolventes escogidos, este medio puede separar a los componentes de la muestra en fase estacionaria y móvil debido a

las propiedades físicoquímicas de este medio, se puede utilizar durante la purificación inicial antes del intercambio iónico o en cromatografía en fase reversa o en la final. <sup>50, 51, 53, 55</sup>

## 6. Análisis Estadístico.

Los datos se integraron en una base de datos la cual fue analizada por medio del programa Sigma Stat versión 2.03. Las diferencias significativas entre las muestras se analizaron mediante la prueba de Tukey-Kramer siendo significativo con una  $p < 0.05$ .

## IX. Resultados

### 1. Rendimiento de los extractos totales

Se determinó el rendimiento de cada uno de los extractos a partir de la siguiente ecuación

$$\text{RET} = \text{Peso del vial con extracto seco} - \text{Peso del vial vacío}$$

Encontrándose que el extracto metanólico fue el que tuvo mejor rendimiento con respecto a los demás extractos tabla 5.

<b>Tabla 4. Rendimiento de los Extractos Totales</b>	
<b>Disolvente</b>	<b>Gramos de Extracto (g)</b>
<b>Hexano</b>	5.4285
<b>Acetato de etilo</b>	9.6229
<b>Metanol</b>	49.0897
<b>H<sub>2</sub>O</b>	16.8016

## 2. Ensayo DPPH•

La prueba del DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) se utilizó para la determinación de captura de radicales libres de los extractos totales de *Justicia spicigera*. En la figura 3 se observa que los 4 extractos obtenidos de la parte aérea de la planta y la vitamina C presentaron actividad antioxidante significativamente mayor con una  $p < 0.05$  con respecto al control siendo el extracto metanólico el que tuvo una mayor capacidad de captura de radicales libres a partir de 19 ppm hasta 5000 ppm con un porcentaje de 10% a 90% mostrando que el pico mayor al 50% lo presentó de 156 ppm a 2,500 ppm; el rango de porcentaje que presenta este extracto es muy similar al de la vitamina C que es considerada como un potente antioxidante. El extracto hexánico presentó capacidad de captura a partir de 78 ppm a 1,250 ppm en un porcentaje de 7% a 73% mostrando su mayor capacidad de captura a 312 ppm y 625 ppm. El extracto acuoso presentó su capacidad de captura de 156 ppm a 1,250 ppm en un porcentaje de 13% a 60% mostrando su capacidad de captura mayor a 625 ppm y 1,250 ppm. El extracto de acetato de etilo presentó una capacidad de captura a partir de 78 ppm a 625 ppm en un porcentaje de 7% a 37%, fue el que presentó menor capacidad de captura de radicales libres con respecto a los otros extractos y a la vitamina C ya que su porcentaje máximo está por debajo de 40%.

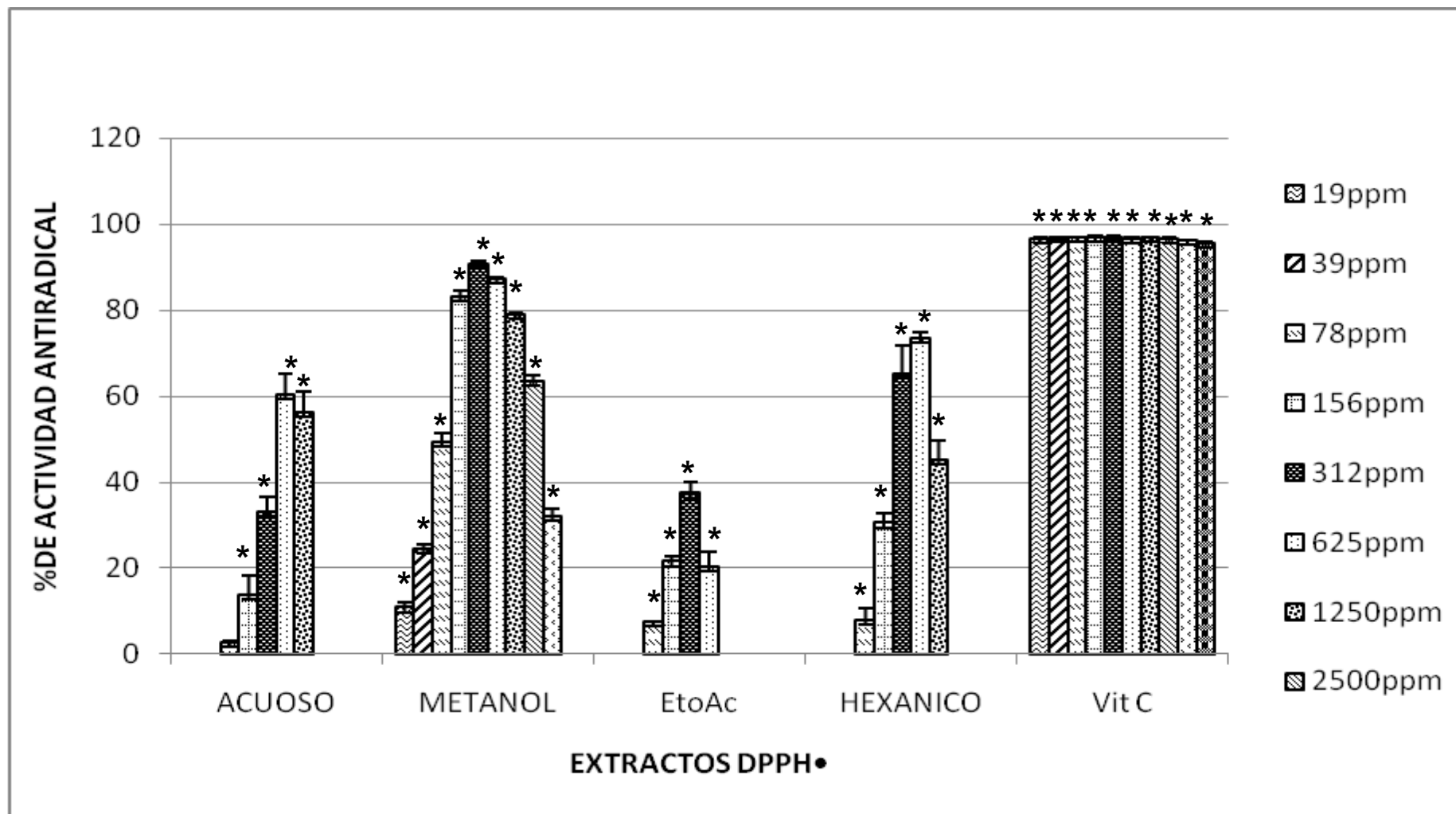


Figura 3. Determinación de la capacidad de captura de radicales libres por el ensayo DPPH• en donde cada barra representa la media  $\bar{X} \pm SD$  en porcentaje de cada dilución por quintuplicado con respecto al control.

\* $p < 0.05$  con respecto al control

### 3. Ensayo ABTS•

La prueba del ABTS• (2,2`-azino-di-(3-etilbenzotiazolina-6-àcido sulfónico) es otra de las pruebas que se utilizó para la determinación de captura de radicales libres de los extractos totales de *Justicia spicigera*. En la figura 4 se observa que los 4 extractos obtenidos de la parte aérea de la planta y la vitamina C presentaron actividad antioxidante significativa con una  $p < 0.05$  con respecto al control pero el extracto metanólico presentó mayor capacidad de captura de radicales libres en a partir de 78 ppm a 10,000 ppm en un porcentaje de 17% a 99% mostrando que el pico mayor al 50% lo presentó de 312 ppm a 10,000 ppm en este rango de concentración su porcentaje de inhibición es muy similar al de la vitamina C tomando en cuenta que esta es considerada como un potente antioxidante. El extracto de acetato de etilo presentó un rango de captura significativo a partir de 78 ppm hasta 10,000 ppm en un porcentaje de 8% a 96% mostrando su mayor capacidad de captura a 625 ppm a 10,000 ppm entre más concentrado estaba el extracto presentó una mayor similitud con la vitamina C. El extracto acuoso presentó su rango de captura de radicales libres a partir de 39 ppm a 10,000 ppm en un porcentaje de 8% a 97% presentando su mayor capacidad de captura de 1,250 ppm a 10,000 ppm, al igual que el extracto de acetato de etilo entre más concentrado más capacidad de captura presenta. El extracto hexánico presentó una capacidad de captura de radicales libres a partir de 19 ppm hasta 10,000 ppm en un porcentaje de 10% a 94% presentando su pico máximo de captura de 312 ppm a 10,000 ppm aunque se podría decir que este extracto también tuvo un rango de concentración y captura mayor al de los anteriores el porcentaje de captación fue menos con respecto al control y a la vitamina C.

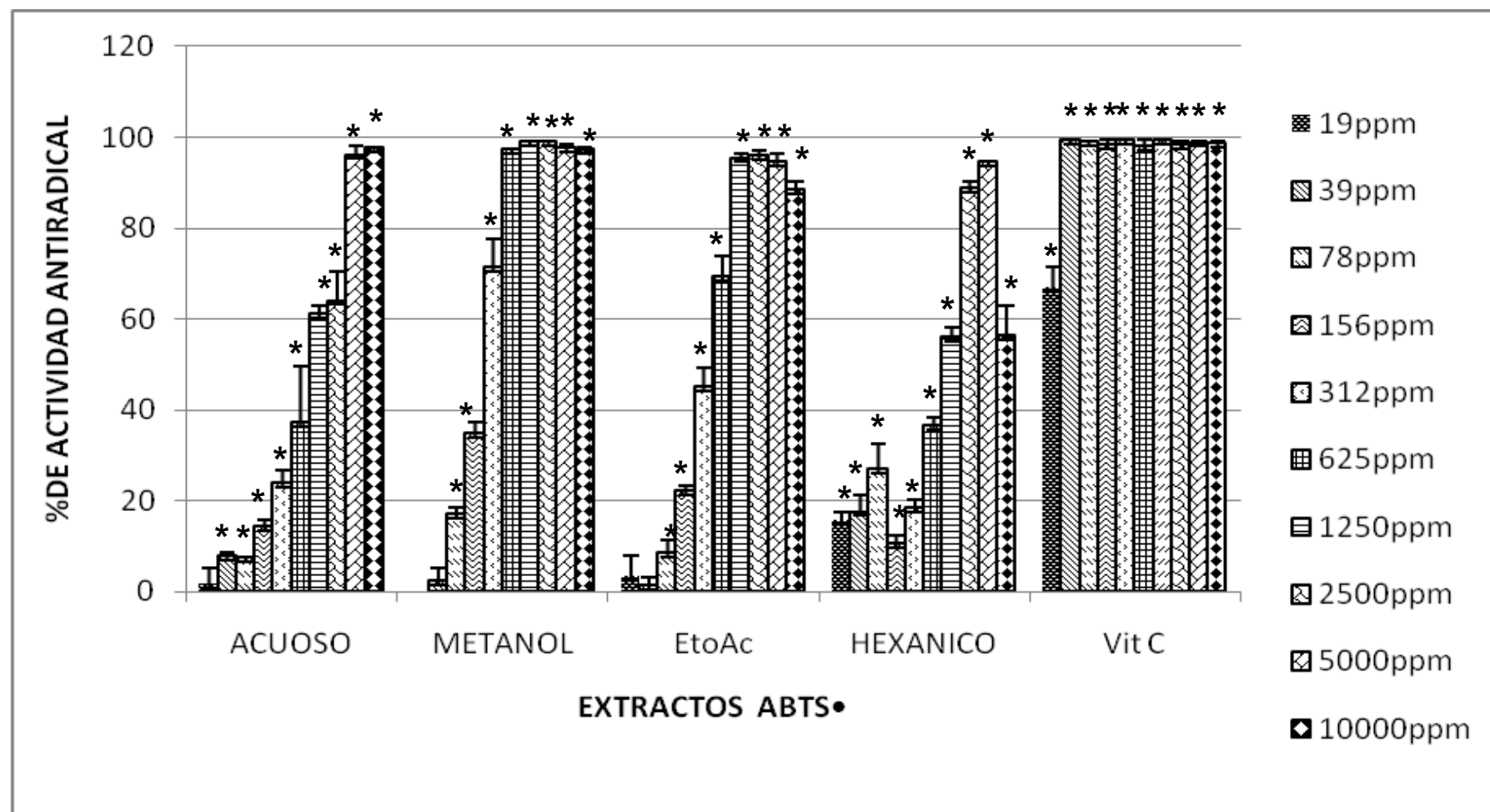


Figura 4. Determinación de la capacidad de captura de radicales libres por el ensayo ABTS• en donde cada barra representa la media  $\bar{X} \pm SD$  en porcentaje de cada dilución por triplicado con respecto al control.

\* $p < 0.05$  con respecto al control

#### 4. Tamizaje Fitoquímico

De las pruebas que se realizaron a este extracto se encontraron los siguientes resultados (tabla 5) encontrándose carbohidratos no reductores, fenoles y taninos, aminoácidos libres y aminos en general, y flavonoides.

<b>Tabla 5. Resultados de la pruebas realizadas a los metabolitos</b>	
<b>Ensayo</b>	<b>Resultados</b>
<b>Determinación de Alcaloides</b>	
<b>Dragendorff</b>	Negativo
<b>Mayer</b>	Negativo
<b>Wagner</b>	Negativo
<b>Determinación de Triterpenos y Esteroides</b>	
<b>Solkowski</b>	Negativo
<b>Rosemheim</b>	Negativo
<b>Identificación de Quinonas</b>	
<b>Borntrager</b>	Negativo
<b>Variante</b>	Negativo
<b>Identificación de Coumarinas</b>	
<b>Baljet</b>	Negativo
<b>Legal</b>	Negativo
<b>Hidroxamato Férrico</b>	Negativo
<b>Identificación de Saponinas</b>	
<b>De la Espuma</b>	Negativo
<b>Identificación de Resinas</b>	
<b>Resinas</b>	Negativo
<b>Identificación de Azucares Reductores</b>	
<b>Fehling</b>	<b>Positivo</b>
<b>Benedict</b>	<b>Positivo</b>
<b>Identificación de Fenoles y Taninos</b>	
<b>Cloruro Férrico</b>	<b>Positivo</b>
<b>Gelatina</b>	Negativo
<b>Identificación de Aminoácidos libres y Aminos en general</b>	



<b>Ninhidrina</b>	<b>Positivo</b>
<b>Identificación de Glicosidos Cardiacos</b>	
<b>Kedde</b>	Negativo
<b>Identificación de Flavonoides</b>	
<b>Acido Sulfúrico concentrado</b>	Negativo
<b>Shinoda</b>	Negativo
<b>Rosemheim</b>	Negativo
<b>Catequinas</b>	<b>Positivo</b>
<b>Identificación de Carbohidratos y/o Glicósidos</b>	
<b>Molish</b>	Negativo
<b>Identificación de Poliurónidos</b>	
<b>Poliurónidos</b>	Negativo

## 5. Cromatografía en Columna

A el extracto metanólico se le realizó la cromatografía en columna con Sephadex LH20 para poder separar los compuestos dando como resultado 11 eluatos a los cuales también se les aplicaron los ensayos DPPH• y ABTS• para identificar cual de los eluatos contenía el mayor numero de componentes responsables de la captura de radicales libres.

La disponibilidad de los eluatos vario dependiendo del rendimiento, por lo que las diluciones se hicieron dependiendo del rendimiento de cada eluato (tabla 6).

**Tabla 6. Diluciones de los eluatos según el rendimiento.**

<b>Eluatos</b>	<b>Diluciones</b>
A, B, C, I, J, L	1,250 ppm hasta 10,000 ppm
D, E, F	625 ppm hasta 5,000 ppm
G, H, K	375 ppm hasta 3,000 ppm

## 6. Rendimiento de los Eluatos

A los 11(A-K) eluatos que se obtuvieron durante la cromatografía y al eluato 12(L) se les calculó el rendimiento con la misma formula para determinar el rendimiento de los extractos totales, encontrándose que el eluato A fue el que tuvo mayor rendimiento y el de menor rendimiento fue el K (tabla 7).

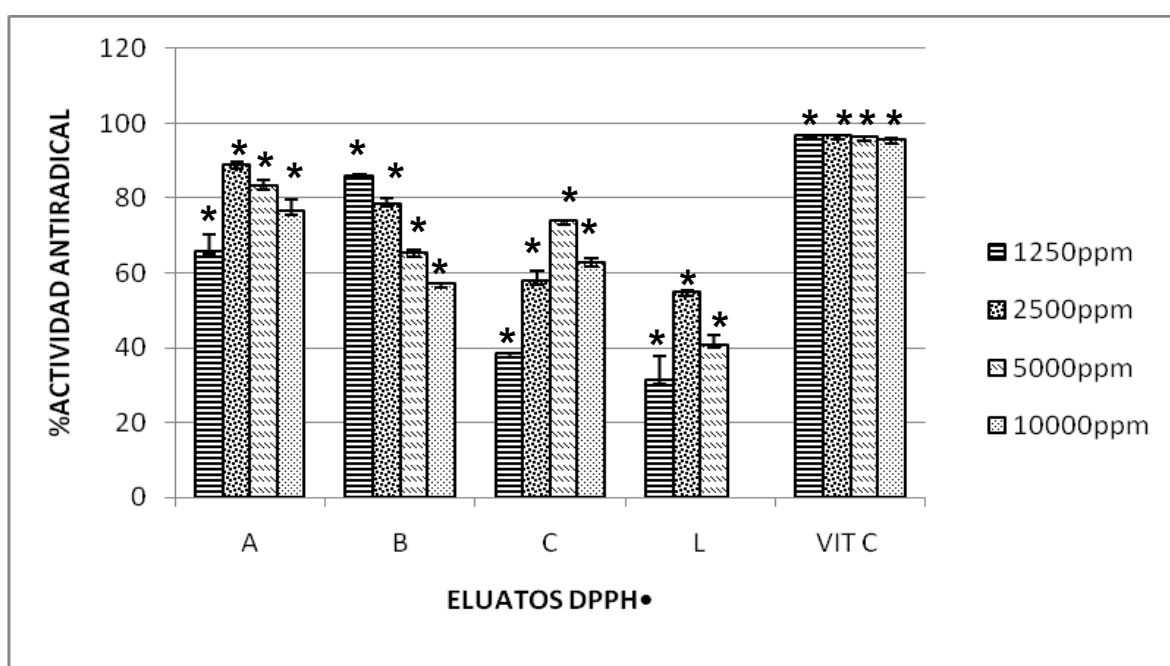
El eluato L se obtuvo a partir del residuo que se acumulo al momento de filtrar el extracto antes de echarlo a la columna.

<b>Tabla 7. Rendimiento de los Eluatos</b>	
<b>Eluato</b>	<b>Gramos (g)</b>
<b>A</b>	2.421
<b>B</b>	0.1137
<b>C</b>	0.0716
<b>D</b>	$9.9 \cdot 10^{-3}$
<b>E</b>	0.0749
<b>F</b>	$6.2 \cdot 10^{-3}$
<b>G</b>	$6.6 \cdot 10^{-3}$
<b>H</b>	$8.6 \cdot 10^{-3}$
<b>I</b>	0.0164
<b>J</b>	0.0148
<b>K</b>	$2.6 \cdot 10^{-3}$
<b>L</b>	1.841

## 7. Ensayo DPPH• de los Eluatos

En la figura 5 se observa que en el ensayo del DPPH• los eluatos que presentaron una capacidad de captura significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control en su dilucion de 1,250 ppm a 10,000 ppm fueron: A, B, C. La variacion que hubo en estos eluatos fue el porcentaje de captura de cada uno de ellos siendo el eluato A el que tuvo un mayor porcentaje de 65% a 88%, B de 57% a 86%, C de 38% a 73%, en esta grafica tambien se observa que el eluato A tiene un porcentaje similar al de la vitamina C en cada una de sus concentraciones, el eluato B presenta una mayor capacidad de captura a menor concentración y el eluato C casi mantiene estable su porcentaje de captura.

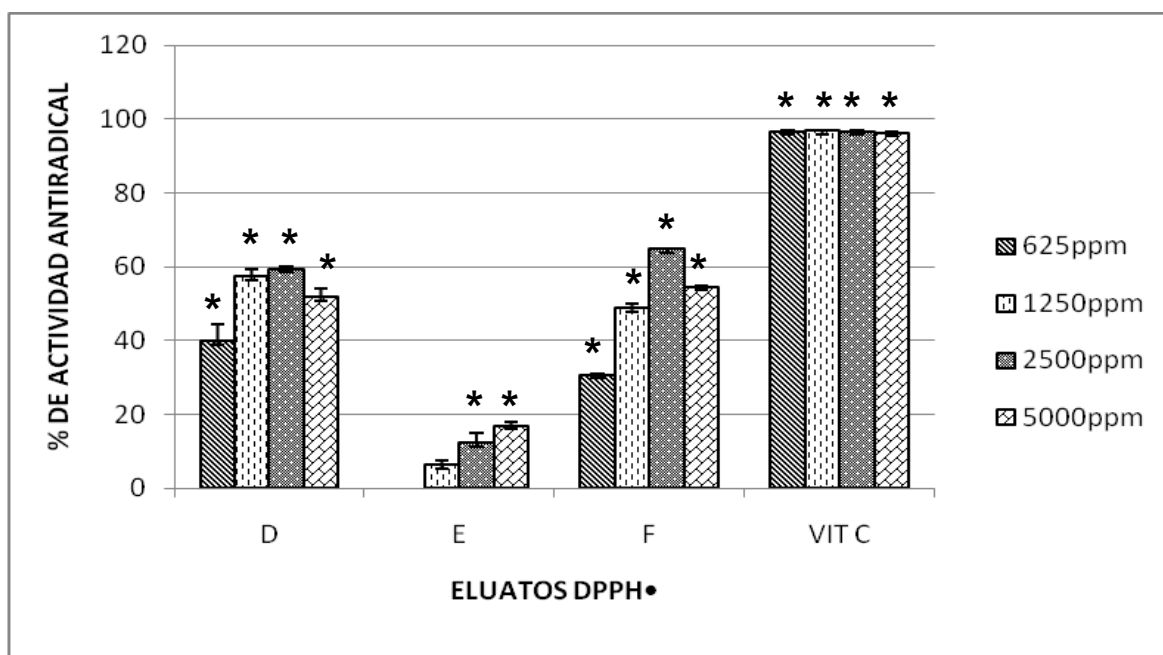
El eluato L presento una captura de radicales libres a partir de 1,250 ppm hasta 5,000 ppm presentando un porcentaje a partir de 31% a 54%.



**Figura 5.** Determinación de la capacidad de captura de radicales libres de los eluatos A, B, C y L por el ensayo DPPH• en donde cada barra representa la media  $\bar{X} \pm SD$  en porcentaje de cada dilución por quintuplicado con respecto al control

\* $p < 0.05$  con respecto al control

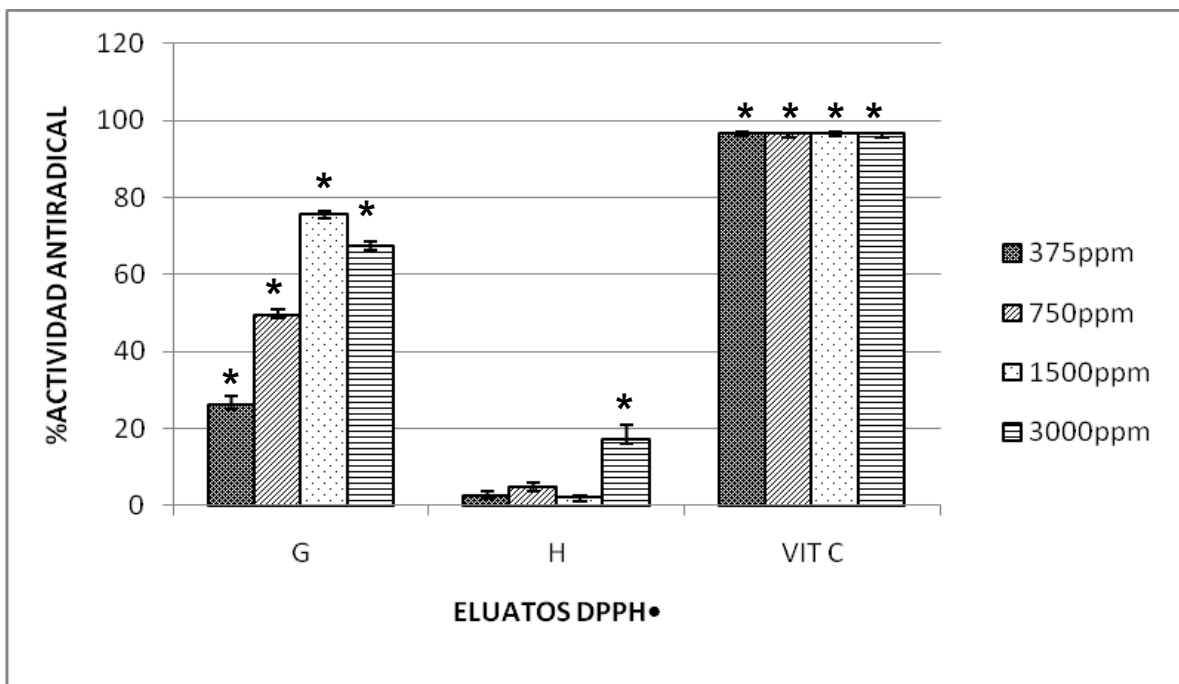
La figura 6 nos muestra que los eluatos que presentaron una mayor capacidad de captura de radicales libres ( $p < 0.05$ ) con respecto al control en su dilución de 625 ppm a 5,000 ppm por el ensayo del DPPH• fueron: D y F, variando en el porcentaje de captura que fue para el eluato D de 39% a 59% y el F de 30% a 64%: El eluato E presento una capacidad de captura a partir de 1,250 ppm a 5,000 ppm en un porcentaje de 6% a 16%.



**Figura 6. Determinación de la capacidad de captura de radicales libres de los eluatos D, E, F por el ensayo DPPH• en donde cada barra representa la media  $\bar{X} \pm SD$  en porcentaje de cada dilución por quintuplicado con respecto al control**

*\* $p < 0.05$  con respecto al control*

La figura 7 nos muestra que los eluatos que presentaron una mayor capacidad de captura de radicales libres con respecto al control ( $p < 0.05$ ) en su dilución de 375 ppm a 3,000 ppm por el ensayo del DPPH• fue el eluato G mostrando un porcentaje de 26% a 75%. El eluato H no presentó una capacidad de captura de radicales libres con respecto al control a excepción de la dilución de 3,000 ppm lo que nos indica que probablemente a mayor concentración pudiera tener algún efecto de captura.



**Figura 7. Determinación de la capacidad de captura de radicales libres de los eluatos G y H por el ensayo DPPH• en donde cada barra representa la media  $\bar{X} \pm SD$  en porcentaje de cada dilución por quintuplicado con respecto al control**

*\* $p < 0.05$  con respecto al control*

## 8. Ensayo ABTS• de los Eluatos

En la figura 8 se observa que en el ensayo del ABTS• los eluatos que presentaron una mayor capacidad de captura de radicales libres ( $p < 0.05$ ) con respecto al control en su dilucion de 1,250 ppm a 10,000 ppm fueron: A, B, C, I, J y L. La variacion que hubo en estos eluatos fue el porcentaje de captura de cada uno de ellos siendo el eluato A, B, y C los que tuvieron un porcenta mayor y muy similar al de la vitamina C; eluato A de 81% a 97%, B de 68% a 92% y C de 68% a 92%, tambien se puede observar que en estos eluatos a mayor dilucion mayor capacidad de captura. Los eluatos I, J y L tubieron un porcentaje menor al de los eluatos anteriores que fue: I de 27% a 68%, J de 26% a 70% y L de 63% a 93%.

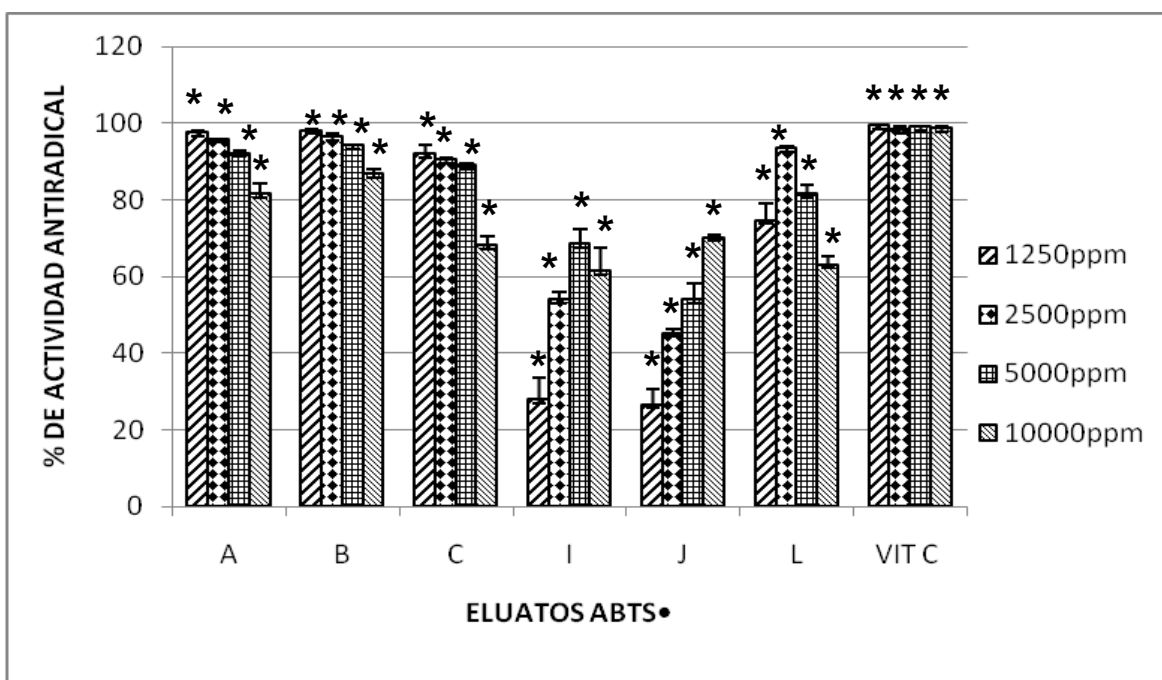
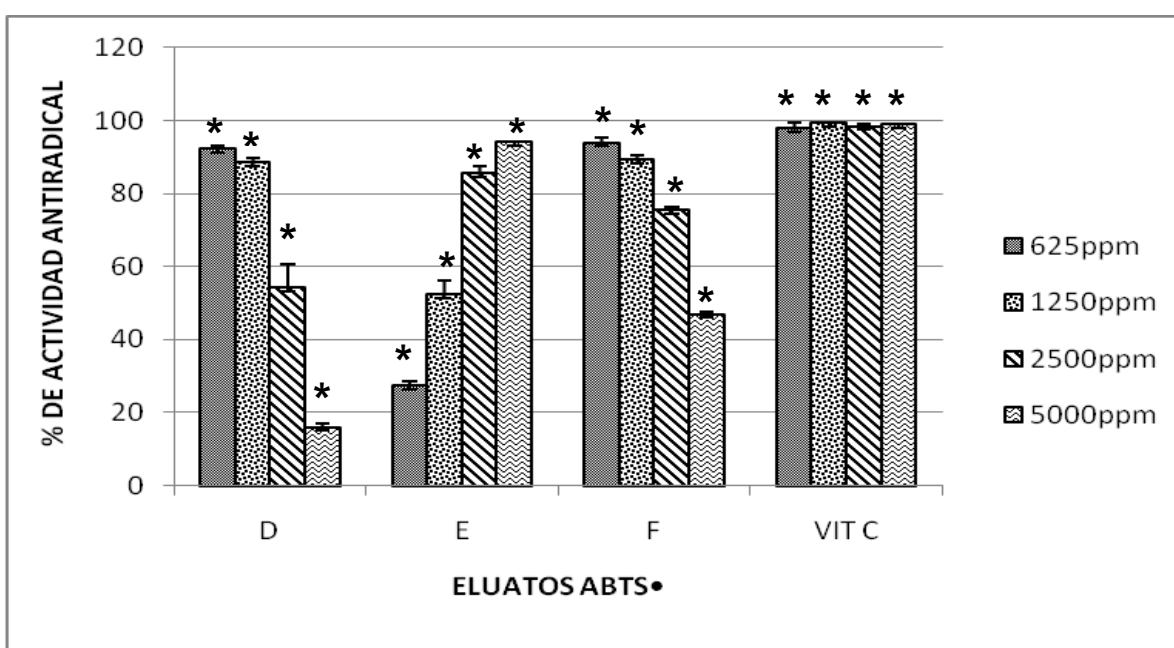


Figura 8. Determinación de la capacidad de captura de radicales libres de los eluatos A, B, C, I, J y L por el ensayo ABTS• en donde cada barra representa la media  $\bar{X} \pm SD$  en porcentaje de cada dilución por quintuplicado con respecto al control

\* $p < 0.05$  con respecto al control

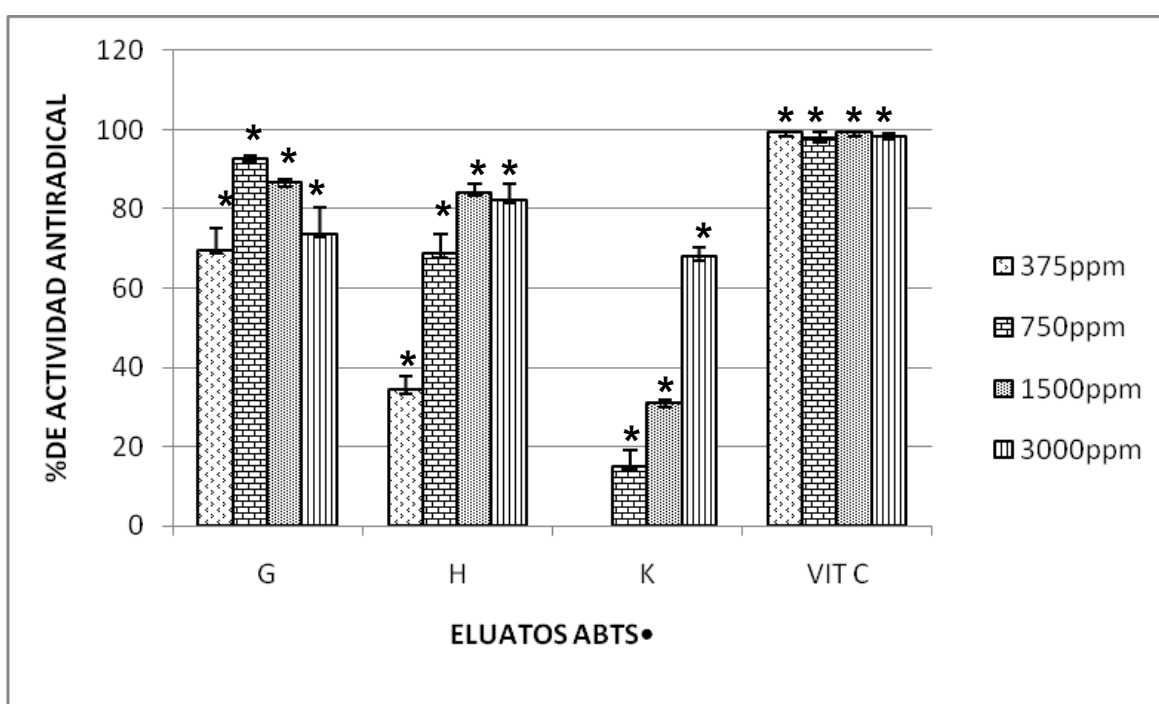
La figura 9 nos muestra que los eluatos que presentaron una mayor capacidad de captura de radicales libres ( $p < 0.05$ ) con respecto al control en su dilucion de 625 ppm a 5,000 ppm por el ensayo del ABTS• fueron: D, E y F, teniendo un porcentaje de captura muy similar entre ellos a diferentes diluciones, el eluato D de 15% a 92%, E de 27% a 94% y el F de 30% a 93%. en los eluatos D y F se observa que entre mas sea la dilucion mayor capacidad de captura presentan sin en cambio en el extracto E se presenta un efecto inverso esto es a mayor concentracion mayor capacidad de captura.



**Figura 9. Determinación de la capacidad de captura de radicales libres de los eluatos D, E y F por el ensayo ABTS• en donde cada barra representa la media  $\bar{X} \pm SD$  en porcentaje de cada dilución por quintuplicado con respecto al control**

*\* $p < 0.05$  con respecto al control*

La figura 10 nos muestra que los eluatos que presentaron una mayor capacidad de captura de radicales libres ( $p < 0.05$ ) con respecto al control en su dilucion de 375 ppm a 3,000 ppm por el ensayo del ABTS• fueron: G y H mostrando una capacidad de captura mayor el eluato G con un porcentaje de 69% a 92%, H de 39% a 84% ambos eluatos manteniendo una capacidad de captura en casi todas sus diluciones. El eluato K presento una capacidad de captura a partir de 750 ppm a 3,000 ppm en un porcentaje de 15% a 67% mostrando que a menor dilucion mayor capacidad de captura.



**Figura 10. Determinación de la capacidad de captura de radicales libres de los eluatos G, H y K por el ensayo ABTS• en donde cada barra representa la media  $\bar{X} \pm SD$  en porcentaje de cada dilución por quintuplicado con respecto al control**

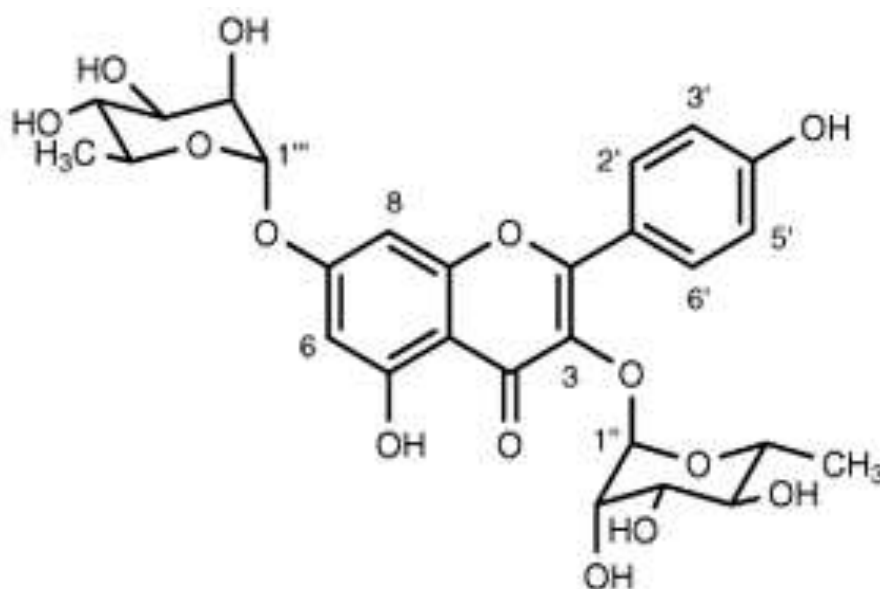
*\* $p < 0.05$  con respecto al control*



## X. Discusión

Los efectos benéficos que tienen los antioxidantes y la prevención de diferentes enfermedades es bien sabido,<sup>56</sup> además la tendencia cada vez más generalizada de utilizar productos naturales que sustituyan a los sintéticos ha propiciado la búsqueda de fuentes alternas, sin embargo una tarea muy importante es la extracción de dichos antioxidantes a partir de estos productos.<sup>57-59</sup>

Son pocas las evidencias comprobadas de que *Justicia spicigera* tenga alguna actividad medicinal y unas de estas son los estudios realizados acerca del efecto antiparasitario del extracto etanólico que se encontró sobre *Giardia duodenalis*.<sup>9</sup> Otro en el que se demostró que los extractos acuosos tienen actividad citotóxica sobre líneas celulares de leucemia humana.<sup>8</sup> En un estudio de *Justicia spicigera* junto con otras 53 plantas mexicanas se demostró que tiene efecto antiinflamatorio como inhibidor del factor de necrosis (NF-κB) esto debido a la presencia de lactonas y sesquiterpenos.<sup>10</sup> El único compuesto que hasta el momento está documentado que se ha aislado de esta planta es la camferitrín.<sup>11</sup> Compuesto de tipo flavonide con actividad antioxidante.<sup>1</sup>(figura 11).



**Figura 11. Estructura de la camferitrín**

Tomado y modificado a partir de <http://pubs.acs.org> | doi: 10.1021/np50020a020, 2009

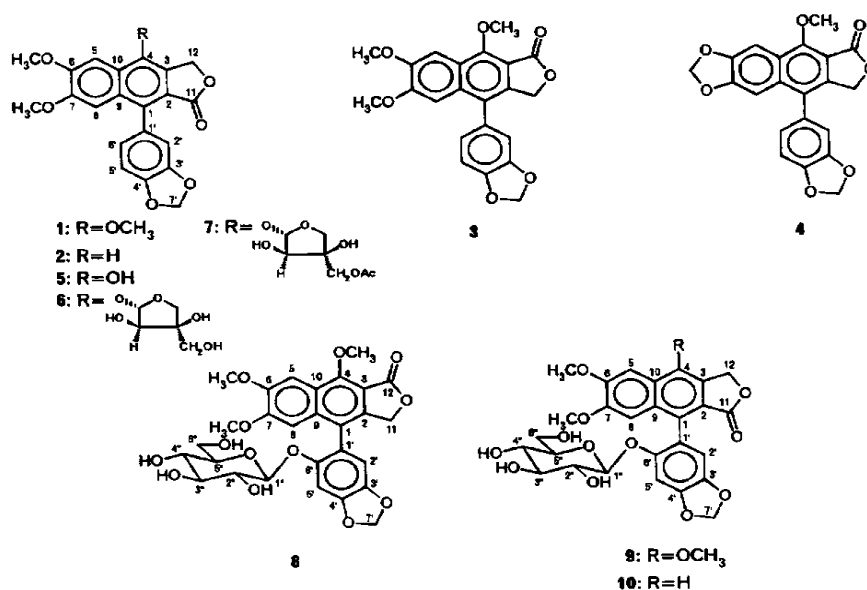
El objetivo de este estudio fue obtener y evaluar la capacidad antioxidante de *Justicia Spicigera* ya que hay pocos estudios que demuestren que la planta pudiera tener dicha actividad, pero existe uno en el que se demostró que los extractos metanólico y acuoso de flores, hojas y tallos de *Justicia spicigera* tenían actividad antioxidante aunque en mayor proporción el metanólico siendo evaluados por el ensayo del DPPH•.<sup>56</sup> Los datos obtenidos en ésta investigación demuestran que de los 4 extractos totales de *Justicia spicigera* que se analizaron el metanólico fue el que tuvo mayor actividad antioxidante esto demostrado mediante dos ensayos DPPH• y ABTS• en donde se corrobora lo dicho por los autores anteriormente.

En estudios previos se realizó el análisis fitoquímico en extractos acuosos y metanólicos de esta planta dando como resultado la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos, es este mismo estudio se determinó el contenido total de estos,<sup>56,60</sup> con estos resultados previos en el presente estudio se corroboraron dichos hallazgos, además se encontró que estos componentes son azúcares reductores, fenoles, taninos y aminas en general por lo que nuestros métodos de tamizaje resultan adecuados para determinar este tipo de componentes de esta planta. Sin embargo, se propone la determinación cuantitativa de éstos mediante técnicas cromatográficas específicas, particularmente fenoles, taninos y flavonoides.

No se han encontrado evidencias de la separación cromatográfica de los componentes de extractos de *Justicia spicigera*, sin embargo en esta investigación se realizó esta separación obteniendo 11 eluatos a los cuales se les realizaron los ensayos DPPH• y ABTS• encontrando que por ambas técnicas los eluatos que tenían mayor capacidad de captura de radicales libres eran los de las diluciones más acuosas, lo que nos indica un beneficio ya que en la medicina tradicional en la manera en que consumen esta planta es por medio de infusiones por lo que podemos decir que los componentes que pueden proporcionar protección frente al daño oxidativo aún están presentes.

En otras especies de *Justicia* en donde se ha determinado la actividad antioxidante es en *Justicia pectoralis* en donde se encontró que el extracto metanólico de esta tiene algún efecto antioxidante<sup>61</sup> y en otro demostraron que esta misma especie no tiene efecto genotóxico sobre *Salmonella thyphimurium*.<sup>62</sup> Investigadores encontraron que los extractos acuoso y metanólico de *Justicia flava* también tenían actividad antioxidante aunque en mayor proporción el metanólico.<sup>42, 63</sup> En otro estudio realizado a seis Acanthaceas (*Blepharis linearifolia*, *Dicliptera verticillata*, *Dyschoriste perrottetii*, *Hygrophila auriculata*, *Lepidagathis anobrya*, *Nelsonia canescens*) para determinar su contenido fenólico así como su capacidad antioxidante se encontró que 5 de estas plantas son buena fuente de antioxidantes esto debido a la presencia de compuestos fenólicos como taninos y flavonoides por lo que su uso puede ser una alternativa como antiinflamatorio y para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.<sup>64</sup>

En *Justicia procumbens* se demostró que tenía efecto antiviral y se aislaron 10 lignanos antivirales a los cuales se les llamo *justicidinas* (figura 12). También encontraron que esta misma especie era inhibidor de la agregación plaquetaria.<sup>65</sup> <sup>66</sup> En *Justicia insularis* demostraron que tiene efecto benéfico para el crecimiento del útero y ovarios cuando estos son inmaduros.<sup>67</sup>



**Figura 12. Estructura de las ligninas antivirales de *Justicia procumbens***

Tomado y modificado a partir de Asano et al, 1996

## XI. Conclusiones

- Los cuatro extractos que se obtuvieron de *Justicia spicigera* presentaron capacidad de captura de radicales libres con respecto al control.
- El extracto metanólico presento una capacidad de captura de radicales libres mayor al 50% desde 156 ppm hasta 2,500 ppm con respecto al control esto comprobado mediante el ensayo del DPPH• y ABTS•.
- La bioactividad es debido posiblemente a la presencia de Flavonoides (catequinas) encontradas mediante el tamizaje fitoquímico.
- Los eluatos obtenidos mediante la separación cromatográfica del extracto metanólico permitió obtener 11 fracciones, de las cuales las fracciones más acuosas tuvieron mayor actividad antioxidante.
- El eluato A fue el que presento mayor actividad antioxidante con respecto al control mediante los ensayos DPPH• y ABTS•.

## **XII. Perspectivas**

Identificación de los compuestos responsables de dicha actividad antioxidante mediante técnicas espectrofotométricas, espectroscópicas y/o cromatográficas en donde se evalúe al mismo tiempo el efecto tóxico de cada compuesto mediante un estudio biodirigido tanto *in vitro* en cultivos celulares como *in vivo* en humanos, para poder comprobar la protección contra el daño oxidativo. Tomando como referencia el presente estudio en donde se determinó la actividad antioxidante y por medio del tamizaje fitoquímico se encontró la presencia de compuestos de tipo flavonoide, al igual que utilizar otras pruebas cuantitativas para determinar la cantidad de total de este tipo de compuestos.

### XIII. Bibliografía

1. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Mucile&id=7981> Octubre 2009
2. 1996. Plantas medicinales del herbario del IMSS.
3. 1996. Plantas que curan En: *Guía México Desconocido*
4. Martínez M. 1996. In *Plantas Medicinales Mexicanas* Mexico: Botas
5. Villavicencio NMA, E PEB. 2005. Acacthaceae. In *Guía de la flora útil de la Huasteca y la zona Otomi-Tepehua, Hidalgo II* ed. CdIB UAEH, pp. 21, 151. México
6. United States Department of Agriculture (USDA) <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=JUSP4>. Abril 2008
7. Aguilar CA, Martínez AMA. 1993. Los herbarios medicinales de México. En: *La investigación científica de la herbolaria medicinal Mexicana*, ed. Sd Salud, México pp. 89-102
8. Cáceres-Cortés JR, Cantú-Garza FA, Mendoza-Mata MT, Chavez-González MA, Ramos-Mandujano G, Zambrano-Ramírez IR. 2001. Cytotoxic activity of *Justicia spicigera* is inhibited by bcl-2 proto-oncogene and induces apoptosis in a cell cycle dependent fashion. *Phytother Res* **15**:691-7.
9. Ponce-Macotela M; Rufino-Gonzalez Y; De la Mora-De la Mora JI; González-Maciel S; Reynoso-Robles R y Martinez-Gordillo MN. 2001. Mortality and Morphological Changes in *Giardia duodenalis* Induced by Exposure to Ethanolic Extracts of *Justicia spicigera*. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **44**:151-152
10. Bork M P, Lienhard M S, Kuhnt M, Escherb C, I Heinricha M. 1997. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-κB. *FEBS Letters* **402**:85-90
11. Downloaded by Univ Auto del Estado de Hidalgo UAEH on August 20, 2009. Published on March 1, 1982 on: <http://pubs.acs.org> | doi: 10.1021/np50020a020

12. Harman D. 1992. Role of free radicals in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci* **673**: 126-41
13. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 44-84
14. Wu D, Cederbaum AI. 2003. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* **27**: 277-84
15. Venereo G. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit* **31**: 126-33
16. Gutierrez ZA, Ledesma RL, Garcia GI, Grajales CO. 2007. Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Rev Cubana Salud Publica*. 33:1-7
17. Flora SJ. 2007. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **53**: 1-2
18. Valenzuela A. 1991. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci* **48**: 301-9
19. Freeman BA, Crapo JD. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* **47**: 412-26
20. Greenwald RA, Moy WW. 1980. Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum* **23**: 455-63
21. Kaur IP, Geetha T. 2006. Screening methods for antioxidants-a review. *Mini Rev Med Chem* **6**: 305-12
22. Canfield LM, Forage JW, Valenzuela JG. 1992. Carotenoids as cellular antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* **200**: 260-5
23. Packer L, Valacchi G. 2002. Antioxidants and the response of skin to oxidative stress: vitamin E as a key indicator. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **15**: 282-90
24. Logan BA, Korniyev D, Hardison J, Holaday AS. 2006. The role of antioxidant enzymes in photoprotection. *Photosynth Res* **88**: 119-32
25. Tyrrell RM, Keyse SM. 1990. New trends in photobiology. The interaction of UVA radiation with cultured cells. *J Photochem Photobiol B* **4**: 349-61

26. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross C. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* **119**: 598-620
27. Gutteridge JM, Halliwell B. 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* **899**: 136-47
28. Tyrrell RK, EC: M. 1991. Cellular defense against UVA (320-380nm) and UVB (290-320) radiations. *In Photobiology Edited by Riklis E. New York: Plenum Press: 861-71*
29. Walshe J, Serewko-Auret MM, Teakle N, Cameron S, Minto K, et al. 2007. Inactivation of glutathione peroxidase activity contributes to UV-induced squamous cell carcinoma formation. *Cancer Res* **67**: 4751-8
30. Gunzler WA, Steffens GJ, Grossmann A, Kim SM, Otting F, et al. 1984. The amino-acid sequence of bovine glutathione peroxidase. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **365**: 195-212
31. Lysenko EP, Melnikova VO, Andina ES, Wunderlich S, Pliquet F, Potapenko AY. 2000. Effects of glutathione peroxidase and catalase on hemolysis and methemoglobin modifications induced by photooxidized psoralen. *J Photochem Photobiol B* **56**: 187-95
32. Nanji AA, French SW. 2003. Animal models of alcoholic liver disease--focus on the intragastric feeding model. *Alcohol Res Health* **27**: 325-30
33. Nohl H. 1981. [Physiological and pathophysiological significance of superoxide-radicals and the regulatory role of the enzyme superoxide dismutase (author's transl)]. *Klin Wochenschr* **59**: 1081-91
34. Sun Y. 1990. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* **8**: 583-99
35. Darr D, Fridovich I. 1994. Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* **102**: 671-5
36. Cerimele D, Celleno L, Serri F. 1990. Physiological changes in ageing skin. *Br J Dermatol* **122** Suppl **35**: 13-20
37. Rojas MC, Brewer MS. 2007. Effect of natural antioxidants on oxidative stability of cooked, refrigerated beef and pork. *J Food Sci* **72**: S282-8
38. Herrero M, Ibanez E, Cifuentes A. 2005. Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. *J Sep Sci* **28**: 883-97



39. Connor A, Luby J, Hancock J, Berkheimer S, Hanson E. 2002. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *J Agric Food Chem* **50**: 893-8
40. Wang SY, Lin HS. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J Agric Food Chem* **48**: 140-6
41. López-Herranz GP. 2006. Interacción entre hierbas medicinales y agentes anestésicos. *Rev Med Hosp Gen Mex* **69**: 108-12
42. Akula SU y Odhav B. 2008. In vitro 5 Lipoxigenase inhibition of polyphenolic antioxidants from undomesticated plants of South Africa. *J. Med.Plant Res* **2(9)**:207-212
43. Choi CW; Kim CS; Hwang SS; Choi BK; Ahn HJ; Lee MY; Park SH; Kim SK. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay guided comparison. *Plant Science* **163**:1161-1168
44. Joon-Kwan M y Shibamoto T. 2009. Assays for plant and food components. *J Agric Food Chem* **30** (Epub)
45. Re R; Pellegrin N; Proteggente A; Pannala A; Yang M y Rice-Evans C. 1999. Antioxidant Activity applying on improved ABTS radical cation decolorization assay free radical. *Biology & Medicine*. **26**:1231-1237
46. Dominguez X A en: Metodos de Investigación Fitoquímica. Centro Regional de Ayuda Técnica: México/Buenos Aires 1979.ed. Limusa pp. 91-229
47. Miller LG y Murray JW. En: Herbal Medicinal: A Clinicians Guide EUA editorial Pharmaceutical products
48. Miranda M M, Cuéllar A C. Manual de Practicas de Laboratorio de Analisis Farmacognostico. U.H. IFAL; 1992:58-68
49. MINSAP: Guías Metodológicas para la investigación en plantas Medicinales.
50. [http://www.gelifesciences.co.jp/catalog/pdf\\_attach/18110722AB.pdf](http://www.gelifesciences.co.jp/catalog/pdf_attach/18110722AB.pdf) Agosto 2009
51. Chirinos R, Campos D, Costa N, Arbizu C, Pedreschi, Larondelle Y. 2008. Phenolic profiles of andean mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón)

- tubers: Identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity. *Food Chemistry* **106**: 1285–1298
52. Calderon M, Baumann W J. 1970. Gel permeation chromatography of neutral hydroxy lipids on Sephadex LH-20. *Journal of Lipid* **11**:167-169
53. Roybal J E , Pfenning A P, Turnipseed S B, Gonzales S A. 2003. Application of size-exclusion chromatography to the analysis of shrimp for sulfonamide residues. *Analytica Chimica Acta* **483**:147–152
54. Yang C, Li D, Wan X. 2008. Combination of HSCCC and Sephadex LH-20 methods An approach to isolation and purification of the main individual theaflavins from black tea. *J. Chromatogr. B* **861**: 140–144
55. <http://www.ebiotrade.com/GE/AKTAclub7/1.PDFs/18110722.pdf> Agosto 2009
56. Sepulveda-Jimenez G; Reyna-Aquino C; Chaires-Martínez L; Bermudez-Torres K y Rodriguez-Monroy N. 2009 Antioxidant activity and content of phenolic compounds and flavonoids from *Justicia spicigera*. *J. Biol. Sci.*:1-4
57. Armano M, Cano A. 1999. Methods to measure the antioxidant activity in plant material a comparative discussion. *Free Reserch.* **3**:589-596
58. Gino JM. 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *The Journal of the American Oil Chemists Society.* **45**: 594-598
59. Sanchez-Moreno C. 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Tech Int* **8**:121-770.
60. Andrade-Cetto A y Heinrich M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology.* **99**:325-348
61. Varon YA; Ospina SF; Murillo E; Mendez JJ. 2007 Tamizaje fitoquímico y actividad antioxidante de extractos acuosos y orgánicos de *Justicia pectoralis jacq* (amansa toros ) y de volátiles y no volátiles de *Lippia alba Mill* (pronto alivio) cultivadas en diferentes pisos térmicos. *Scientia et Technica* **13**:349-350

62. Montero ACR, Hurtado VY, Ferrer PJ Chanfrau JR. 2008. Genotoxicity of *Justicia pectoralis* Jacq. (tilo). *Rev Cubana de plantas medicinales*. **13**(2):1-6
63. Bacallo GL, Gómez GLV, Domínguez RDM, García SE. 2001. Plantas con propiedades antioxidantes. **20**:231-5
64. Sawadogo WR, Meda A, Lamien EC, Kiendrebeogo M, Guissou PI y Nacoulma GO. 2006. Phenolic content and antioxidant activity of six acanthaceae from Burkina Faso. *J. Biol. Sci.* **6**:249-252
65. Asano J, Chiba K, Tada M and Yosmil T. 1996. Antiviral activity of lignans and their glycosides from *Justicia procumbens*. *Phytochemistry* **42**(3):713-717
66. Chien-Chih C, Wen-Chi H, Feng-Nien K,† Yu-Lin H, Jun-Chih O, and Che-Ming T†. 1996. Antiplatelet aryl naphthalide lignans from *Justicia procumbens*. *J. Nat. Prod* **59**: 1149-1150
67. Telefo PB, Moundipa PF, Tchana AN, Dzickotze TC y Mbiapo FT. 1998. Effects of an aqueous extract of *Aloe buettneri*, *Justicia insularis*, *Hibiscus macranthus*, *Dicliptera verticillata* on some physiological and biochemical parameters of reproduction in emature female rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **69**:193-200

## Glosario

**Antioxidante:** es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas

**Ácidos grasos poliinsaturados:** son ácidos grasos que poseen más de un doble enlace entre sus carbonos. Dentro de este grupo encontramos el ácido linolénico (omega 3) y el linoleico (omega 6) que son esenciales para el ser humano.

**Alcóxilos:** son aquellos compuestos del tipo ROM, siendo R un grupo alquilo, O un átomo de oxígeno y M un ion metálico u otro tipo de catión.

**Cadenas peptídicas:** La estructura cuaternaria deriva de la conjunción de varias cadenas peptídicas que, asociadas, conforman un ente, un multímero, que posee propiedades distintas a la de sus monómeros componentes.

**Caducifolia:** hace referencia a los árboles o arbustos que pierden su follaje durante una parte del año.

**Cardenólidos:** son compuestos que derivan de la *digital*, sustancia obtenida de la planta *digitalis purpurea* usada ampliamente en medicina en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

**Carotenoides:** son pigmentos orgánicos que se encuentran de forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias.

**Ceruloplasmina:** La Ceruloplasmina (Cp) es la principal proteína transportadora de cobre en circulación. Su concentración es abundante en plasma; se considera un reactante de fase aguda y su función fisiológica no se encuentra fehacientemente establecida. Fundamentalmente se sintetiza en los hepatocitos.

**Citocromos:** son proteínas de color oscuro que desempeñan una función vital en el transporte de energía química en todas las células vivas.

**Desoxiazucars:** son azúcares en los cuales un radicalhidroxilo ha sido reemplazado por un hidrógeno.

**Despolimerización:** es tanto la reacción contraria a la polimerización como un mecanismo alterno a una reversión, pero que disminuye el peso molecular de los polímeros. El proceso de despolimerización más común es el iniciado por radicales libres, los cuales inician una reacción en cadena, la cual afecta gravemente al

polímero en cuestión en todas sus propiedades. Comúnmente es iniciado este mecanismo por influencia de radiación ultravioleta

**Dismutación:** se denominan las reacciones redox donde un elemento es al mismo tiempo oxidado y reducido cuando la suma de potenciales de los correspondientes pares redox es mayor de 0. Un ejemplo es la descomposición del agua oxigenada los productos de este proceso son el oxígeno molecular y el agua.

**Eluato:** solución o sustancia obtenida de un proceso de elución.

**Enzima.** son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, siempre que sea termodinámicamente posible.

**Especies reactivas de oxígeno:** incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada.

**Estequiometría:** es el cálculo de las relaciones cuantitativas entre reactivos y productos en el transcurso de una reacción química.

**Estrés oxidativo:** es causado por un desequilibrio entre la producción de oxígeno reactivo y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante.

**Fitonutrientes:** carecen de valor nutricional pero actúan como unos auténticos antioxidantes.

**Flavonoides:** es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los flavonoides", cuyo producto, la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa.

**Genotoxicidad:** La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos.

**Glutación:** es un tripéptido constituido por tres aminoácidos: glicina, cisteína y ácido glutámico. Es 2-amino-5-[[2-[(carboximetil)amino]-1-(mercaptometil)-2-oxoetil]amino]-5-ácido oxopentanoico, una  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina. Es un antioxidante intracelular para lo cual usa el grupo tiol de la cisteína como agente

reductor. Actúa reduciendo especies reactivas del oxígeno como peróxido de hidrógeno gracias a la enzima glutatión peroxidasa.

**Metabólito:** es cualquier molécula utilizada o producida durante el metabolismo.

**Metaloproteínas:** es un término genérico para una proteína que contiene un ion metálico como cofactor.<sup>1</sup> Las funciones de las metaloproteínas son muy variadas en las células, actuando como enzimas, proteínas de transporte y almacenamiento, y en la transducción de señales.

**Mutagénesis:** la producción de mutaciones sobre DNA, clonado o no.

**Oxidación:** La oxidación es una reacción química donde un metal o un no metal ceden electrones, y por tanto aumenta su estado de oxidación.

**Oxiradicales:** productos de la reducción monovalente del oxígeno.

**Peroxidación lipídica:** hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos. Es el proceso a través del cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares. Este proceso es iniciado por un mecanismo de reacción en cadena de un radical libre.

**Peroxisomas:** son orgánulos citoplasmáticos muy comunes en forma de vesículas que contienen oxidasas y catalasas. Estas enzimas cumplen funciones de detoxificación celular.

**Polimerización:** es un proceso químico por el que los reactivos, monómeros (compuestos de bajo peso molecular) se agrupan químicamente entre sí, dando lugar a una molécula de gran peso, llamada polímero, bien una cadena lineal o una macromolécula tridimensional.

**Prooxidante:** Sustancia que puede producir subproductos del oxígeno del metabolismo que pueden dañar las células.

**Agente quelante:** es una sustancia que forma complejos con iones de metales pesados.

**Radical libre:** es una molécula (orgánica o inorgánica), en general extremadamente inestable y, por tanto, con gran poder reactivo. Se pueden sintetizar en el laboratorio, se pueden formar en la atmósfera por radiación, y también se forman en los organismos vivos (incluido el cuerpo humano) por el contacto con el oxígeno y actúan alterando las membranas celulares y atacando el material genético de las células, como el ADN.

**Radical tiol:** Los tioles o mercaptanos presentan el grupo -SH unido a un radical. Se nombran de forma análoga a los alcoholes.

**Reacción de fenton:** es la que se produce al catalizar el peróxido de hidrógeno con hierro, dando como resultado la generación de radicales altamente reactivos del oxhidrilo (OH).

**Selenoproteína:** es cualquier proteína que incluya un residuo de selenocisteína. Las selenoproteínas existen en todas las principales formas de vida, eucariotas, bacterias y arqueas.

**Sinergistas:** Acción conjunta de varios órganos en la realización de una función.

**Singulete:** es un conjunto con un único elemento.

**Supergenes:** es un grupo de genes vecinos en un cromosoma que se heredan juntos debido a la vinculación genética estrecha y están en relación funcional en un sentido evolutivo, aunque rara vez regulan genéticamente.

**Taninos:** son compuestos polifenólicos muy astringentes; metabolitos secundarios de las plantas fenólicos, no nitrogenados, solubles en agua y no en alcohol ni solventes orgánicos.

**Tiorredoxina:** son proteínas que actúan como antioxidantes, facilitando la reducción de otras proteínas a través de un intercambio tiol-disulfuro en la cisteína. Las tiorredoxinas se encuentran en casi todos los organismos y son esenciales para la vida en los mamíferos.

**Vitaminas:** son compuestos heterogéneos imprescindibles para la vida, que al ingerirlas de forma equilibrada y en dosis esenciales puede ser trascendental para promover el correcto funcionamiento fisiológico.

## Anexos

### FORMA DE PREPARACION DE REACTIVOS

- 1. Solución reactiva de Dragendorff:** Mezclar 21.3mL de ácido nítrico ( $d=1.42$ ) con suficiente agua destilada para hacer 62mL. En 20mL de esta solución se disuelven 5g de subnitrito de bismuto. Por separado se disuelven 31.2g de yoduro de potasio en 69mL de agua. Mezclar luego ambas soluciones
- 2. Solución reactiva de Mayer:** 1.356g de cloruro mercuríco se disuelven en 60mL de agua. Por otro lado se disuelven 5g de yoduro de potasio en 20mL de agua, se mezclan ambas soluciones y se enrasa a 100mL con agua.
- 3. Solución reactiva de Wagner:** Se disuelven 20g de yodo y 2g de yoduro de potasio en 20mL de agua y se enrasa a 100mL con agua. La mayoría de las soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados fluoculentos de color marrón

#### **4. Solución reactiva de Baljet:**

**Solución A:** 1g de ácido pícrico (2,4,5-trinitrofenol) en 100mL de etanol

**Solución B:** 10g de hidróxido de sodio en 100mL de agua

Las soluciones se preparan de forma independiente y se mezclan igual cantidad de volumen de cada una de ellas en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar

- 5. Solución reactiva de Car-Price:** Disolver 25g de tricloruro de antimonio (III) en 75g de cloroformo o tetracloruro de carbono al 20% (el  $\text{HCCl}_3$  no debe contener alcohol) o disolver 27g de tricloruro de antimonio (III) en 100mL de  $\text{HCCl}_3$  (libre de etanol) y se calienta de 40-50°C, después de adiciona 5-10g de sulfato de sodio anhidro y se deja 20 minutos. Preparar inmediatamente antes de usar

#### **6. Solución reactiva de Fehling:**

**Solución A:** se pesan 35g de sulfato cúprico hidratado cristalizado y se disuelven con agua hasta un volumen total de 100mL.

**Solución B:** se pesan 150g de tartrato de sodio y potasio y 40g de NaOH, disolviéndolo con agua hasta un volumen total de 1000mL.



Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezclan iguales cantidades en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar

**7. Solución reactiva de Benedict:**

**Solución A:** se prepara disolviendo 173g de citrato de sodio y 100g de carbonato de sodio anhídrido en unos 600mL de agua y diluyendo la solución a 850mL.

**Solución B:** Se prepara disolviendo 17.3g de sulfato de cobre cristalino ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) en 100mL de agua y diluyendo la solución de 150mL

Para la preparación de la solución de Benedict se añade la solución B sobre la A y ambas se mezclan bien

**8. Solución salina Fisiológica:** cloruro de sodio el 0.9% en agua

**9. Solución reactiva de Kedde:**

**Solución 1:** Acido 3,5-dinitrobenzoico al 2% en metanol

**Solución 2:** Hidróxido de potasio al 5.7% en agua

Se mezcla igual volumen de ambas soluciones en el momento de realizar el ensayo y dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar

**10. Solución de picrato de Sodio:** 5g de carbonato de sodio mas 0.5g de acido pícrico y cantidad suficiente de agua para 1000mL. Conservé esta solución en un frasco seco. La solución debe ser recién preparada.