



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

**“Determinación de la actividad antioxidante del extracto clorofórmico de la
planta *Justicia spicigera*”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

PRESENTA:

P.Q.F.B. KATIA CECILIA GARCÍA ESTRADA

ASESOR: DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

CO-ASESOR: MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

JORGE ARTURO MEJÍA BARAJAS

MORELIA MICHOCÁN

MARZO 2016

DEDICATORIA.

A mi padre Sergio García Ambriz por haber tenido confianza en mis decisiones y por su apoyo en cualquiera de ellas, por su sabiduría al aconsejarme ante cualquier circunstancia y sobre todo, su esfuerzo para poder permitirme concluir con mi carrera.

A mi madre Cecilia Estrada Cuevas por estar conmigo en los momentos difíciles por los cuales curse en este trayecto, su cariño y amor para darme fuerzas y seguir adelante por sus consejos y apoyo en cada momento.

A mis hermanos Sergio David García Estrada y Claudia Carolina García Estrada por su apoyo, cariño, consejos y por haber contribuido en este proceso importante para mí.

A mi novio Francisco Pimentel Luna por su gran apoyo, compañía y paciencia al permanecer conmigo en todo momento.

A mis amigos por acompañarme en esta aventura y haber formado parte de mi familia; hasta el final 11:11.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en especial a la facultad de Químico Farmacobiología por haberme proporcionado el conocimiento ahora obtenido, por sus instalaciones y materiales brindados, y por grandes profesores que fueron un gran apoyo.

Al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, en especial al D.C. Alfredo Saavedra Molina por su asesoría y aceptación para poder desarrollar este proyecto. A mi co-asesor M.C. Jorge Arturo Mejía Barajas por su gran apoyo y comprensión.

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE GRÁFICAS	III

INDICE GENERAL I

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. Estrés oxidativo	3
3.1.1. Factores que contribuyen a generar estrés oxidativo patológico	3
3.1.2. Efectos del estrés oxidativo	4
3.2. Especies reactivas de oxígeno	4
3.2.1. Características de ERO:	5
3.2.2. Generación de radicales libres y ERO	5
3.3. Enfermedades relacionadas con estrés oxidativo	6
3.3.1. Envejecimiento	6
3.3.2. Aterosclerosis	6
3.3.3. Diabetes	7
3.3.4. Hipertensión arterial (HTA)	7
3.4 Antioxidantes y tipos de antioxidantes	8
3.4.1. Antioxidantes endógenos	8
3.4.2. Antioxidantes exógenos	9
3.5. Plantas como antioxidantes	10
3.5.1. Planta Justicia spicigera	10
3.5.2 Botánica y ecología de J. spicigera	12

3.5.3. Información farmacológica de <i>J. spicigera</i>	12
3.5.4. Información fitoquímica de <i>J. spicigera</i>	12
3.6.- Evaluación de la actividad antioxidante	13
3.6.1. Pruebas in vitro	13
3.6.1.1 Antilipoperoxidación	13
3.6.1.2. Reducción del radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	14
3.6.1.3 Capacidad de reducción de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	15
3.6.1.4 Capacidad antioxidante total	15
3.6.1.5 Poder reductor	15
3.6.2. Pruebas en levaduras	16
3.7. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
3.7.1. Características de <i>S. cerevisiae</i> que la hacen un modelo de células eucariotas	16
3.8. Evaluación de la actividad antioxidante en levaduras	17
3.8.1. Lipoperoxidación celular.....	17
3.8.2. Viabilidad mediante el ensayo MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico)	19
4. JUSTIFICACIÓN	20
5. HIPÓTESIS	21
6. OBJETIVOS	22
6.1. Objetivo general	22
6.2. Objetivos particulares.....	22
7. MATERIAL Y MÉTODOS	23
7.1. Obtención del extracto clorofórmico de <i>J. spicigera</i>	23

7.2. Evaluación de la actividad antioxidante in vitro	23
7.2.1. Antilipoperoxidación	23
7.2.2. Reducción del radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	24
7.2.3. Capacidad de reducción del peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	25
7.2.4. Capacidad antioxidante total	25
7.2.5. Poder reductor	26
7.3. Obtención de levaduras	27
7.3.1. Precultivos y cultivos de la levadura <i>S. cerevisiae</i> (W303-1A)	27
7.3.2. Lipoperoxidación celular	27
7.3.3. Viabilidad celular mediante ensayo MTT	27
8. RESULTADOS	28
8.1. Evaluación de la actividad antioxidante in vitro del extracto clorofórmico de <i>J. spicigera</i>	28
8.1.1. Antilipoperoxidación	28
8.1.2. Reducción del radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	29
8.1.3. Determinación de la capacidad de reducción del peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	30
8.1.4. Capacidad antioxidante total	31
8.1.5. Poder reductor	32
8.2. Pruebas realizadas en levaduras	33
8.2.1. Lipoperoxidación celular	33
8.2.2. Viabilidad determinada mediante ensayo MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) al adicionar peróxido de hidrógeno o menadiona	35
9. DISCUSIÓN	37
10. CONCLUSIÓN	39
11. PERSPECTIVAS	40

12. REFERENCIAS.....	41
----------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS II

Figura 1. Hojas de <i>J. spicigera</i>	11
Figura 2. Flor de <i>J. spicigera</i>	11
Figura 3. Planta completa de <i>J. spicigera</i>	11
Figura 4. Reacción entre el ácido 2-tiobarbitúrico y malondialdehído (MDA) bajo condiciones ácidas y calor	13
Figura 5. Principio de ensayo del método DPPH•	14

ÍNDICE DE GRÁFICAS III

Gráfica 1. % de índice antioxidante a partir de la prueba de antilipoperoxidación por el extracto clorofórmico de <i>J. spicigera</i>	28
Gráfica 2. % de reducción del radical DPPH• por el extracto clorofórmico de <i>J. spicigera</i>	29
Gráfica 3. % de reducción de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) por el extracto de <i>J. spicigera</i>	30
Gráfica 4. % de capacidad antioxidante total del extracto de <i>J. spicigera</i>	31
Gráfica 5. Determinación de poder reductor por el extracto clorofórmico de <i>J. spicigera</i>	32
Gráfica 6. Lipoperoxidación celular en <i>S. cerevisiae</i> con peróxido de hidrógeno	33
Gráfica 7. Lipoperoxidación celular en <i>S. cerevisiae</i> con menadiona	34
Gráfica 8. Porcentaje de sobrevivencia en presencia de peróxido de hidrógeno determinada mediante el ensayo MTT	35
Gráfica 9. Porcentaje de sobrevivencia en presencia de menadiona determinada mediante el ensayo MTT	36

1. RESUMEN

El tabaquismo, alcoholismo, mala alimentación, contaminación, radiación, son algunos de los factores por los cuales se desencadena el estrés oxidativo, el cual es el causante de varios efectos patológicos sobre los organismos. El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción acelerada de especies reactivas de oxígeno (ERO) y una mala respuesta del organismo de contrarrestar o estabilizar estas sustancias. Las ERO se han relacionado con algunas de las enfermedades como hipertensión, diabetes, Párkinson, Alzheimer, entre otras. Los antioxidantes son moléculas encargadas de retardar o prevenir la oxidación, los cuales además de encontrarse en frutas y verduras se presentan en plantas. Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de plantas que contienen antioxidantes es benéfico para la salud. Diferentes pruebas (*“in vitro”* e *“in vivo”*) han sido desarrolladas para evaluar la actividad antioxidante de extractos de plantas. *Justicia spicigera* es una planta a la que se le atribuyen propiedades farmacológicas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar su actividad antioxidante in vitro y en una levadura como modelo biológico.

Palabras claves: Estrés oxidativo, antioxidantes, *Justicia spicigera*, *Saccharomyces cerevisiae*.

2. ABSTRACT

Smoking, alcoholism, poor diet, pollution, radiation, are some factors by which oxidative stress is generated. The oxidative stress is responsible of several pathological effects on organisms, and it is defined as an imbalance between the accelerated production of reactive oxygen species (ROS) and poor response of the body to offset or stabilize these substances. ROS have been linked to certain diseases such as hypertension, diabetes, Parkinson's, Alzheimer's, among others. Antioxidants are molecules responsible for delay or prevent oxidation, which besides being in fruits and vegetables are present in plants. Epidemiological studies have shown that consumption of plants that contain antioxidants is beneficial to health. Different tests ("in vitro" and "in vivo") have been developed to evaluated the antioxidant activity of plant extracts. *Justice spicigera* is a plant with attributed pharmacological properties. Therefore, the aim of this study was to determined the antioxidant activity in vitro and in yeast as a biological model.

Keywords: Oxidative stress, antioxidants, *Justice spicigera*, *Saccharomyces cerevisiae*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo patológico es causado por un desequilibrio entre la producción de oxígeno reactivo y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Este entorno reductor es preservado por las enzimas que mantienen este estado a través de un constante aporte de energía metabólica. Desbalances en el estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, lípidos y ADN. En el ser humano, el estrés oxidativo patológico se ha relacionado con algunas enfermedades, como la arterosclerosis, el Parkinson y el Alzheimer. (Laboratorio de estrés oxidativo. 2008).

3.1.1. Factores que contribuyen a generar estrés oxidativo patológico

- ❖ Malos hábitos alimenticios
- ❖ Humo de tabaco
- ❖ Depresión
- ❖ Radiación
- ❖ Alcohol
- ❖ Ansiedad
- ❖ Sedentarismo
- ❖ Contaminación

3.1.2. Efectos del estrés oxidativo

Los efectos del estrés oxidativo dependen de la magnitud en la reducción del potencial celular, disminución de la capacidad reductora de los pares redox celulares como el glutatión, así como de la capacidad de la célula de superar las perturbaciones y recuperar su estado original. El estrés oxidativo severo puede causar la muerte celular mediante necrosis, mientras que una oxidación moderada desencadena la apoptosis. Un aspecto particularmente destructivo del estrés oxidativo es la producción de ERO, que incluyen los radicales libres y los peróxidos. Algunas de las especies menos reactivas pueden ser convertidas por una reacción redox, junto con metales de transición u otros compuestos de ciclo redox, en quinonas; la especie radical más agresiva que puede causar extenso daño celular. La mayoría de estas especies derivadas del oxígeno se producen en bajas concentraciones en condiciones normales de metabolismo aeróbico y el daño que causan a las células es reparado constantemente. Sin embargo, en los niveles de estrés oxidativo que causa la necrosis, el daño produce agotamiento de ATP impidiendo la muerte celular por apoptosis controlada. (Laboratorio de estrés oxidativo. 2008).

3.2. Especies reactivas de oxígeno

Aunque generalmente las reacciones de oxidación aseguran que el oxígeno molecular sea reducido completamente a agua, los productos de la reducción parcial del oxígeno son altamente reactivos. Estos productos son conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO) o ROS (por sus siglas en inglés de Reactive Oxygen Species). Algunos compuestos generados a través del oxígeno son considerados radicales libres, sin embargo, producen estrés oxidativo. Los siguientes compuestos derivados del oxígeno son generados de estrés oxidativo:

- ❖ Radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)
- ❖ Radical hidroperoxil ($HOO^{\bullet}$)
- ❖ Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- ❖ Radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$)
- ❖ Radical lípido peróxido ($ROO^{\bullet}$)

- ❖ Singulete de oxígeno ($^1\text{O}_2$)

3.2.1. Características de ERO:

- ❖ Extrema reactividad
- ❖ Tiempo de vida corto
- ❖ Generación de nuevas ERO por una reacción en cadena
- ❖ Daño a diferentes tejidos

3.2.2. Generación de radicales libres y ERO

- ❖ Los radicales libres se están constantemente produciendo durante la oxidación de los productos alimenticios.
- ❖ Algunas enzimas como la xantina oxidasa y aldehído oxidasa forman el radical de anión superóxido o peróxido de hidrógeno.
- ❖ La NADPH oxidasa en las células inflamatorias (neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos), producen el anión superóxido por un proceso de estallido respiratorio durante la fagocitosis. El superóxido se convierte en peróxido de hidrógeno y después en ácido hipocloroso (HClO) con la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y la mieloperoxidasa (MPO). El superóxido y los iones hipoclorosos, son los efectores finales de la acción bactericida. Esta es una producción deliberada de los radicales libres en el cuerpo. Con la activación de los macrófagos, el consumo de oxígeno por la célula se incrementa drásticamente, por lo que se llama estallido respiratorio.
- ❖ La radiación ionizante daña a los tejidos mediante la producción de radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno y anión superóxido.
- ❖ La luz de longitudes de onda adecuada puede causar fotólisis de oxígeno para producir singulete de oxígeno.
- ❖ La capacidad de producir daño tisular por el peróxido de hidrógeno es mínima en comparación con otros radicales libres, sin embargo, en presencia de hierro libre puede generar el radical hidroxilo, que es altamente reactivo.

- ❖ La inhalación de contaminantes en el aire aumenta la producción de radicales libres. (Vasudevan DM, Sreekumari S. y Kannan V. 2011).

3.3. Enfermedades relacionadas con estrés oxidativo

3.3.1. Envejecimiento

El envejecimiento puede ser el resultado de la activación de genes específicos en un momento determinado del ciclo celular. La teoría de los radicales libres y envejecimiento supone que éste resulta de la acumulación de lesiones orgánicas, aunado a una menor actividad proteolítica, disminución de las concentraciones de antioxidantes e inactivación de las enzimas detoxificadoras de radicales libres y una acumulación de proteínas oxidadas no degradadas. (Camps, D. 2010).

3.3.2. Ateroesclerosis

La formación de la placa aterosclerótica se inicia con la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos que se transforman así en células espumosas. Estas células son captadas por el endotelio mediante moléculas de adhesión y se acumulan en el espacio subendotelial, donde inducen la migración de células musculares, su proliferación e hipertrofia. En determinadas condiciones oxidativas las lipoproteínas se fragmentan y se alteran determinados residuos de aminoácidos de la apoproteína de las LDL. Estas LDL oxidadas o productos liberados de ellas, van a tener mayor poder aterogénico, ya que son captadas más ávidamente por los macrófagos, son citotóxicas para el endotelio y estimulan la producción de factores vasoactivos de adhesión, trombóticos y proliferación de células musculares lisas de la vasculatura, iniciando o extendiendo la lesión aterosclerótica. Factores de riesgo de la aterosclerosis ampliamente identificados, como la hipertensión, hipercolesterolemia y tabaquismo, pueden actuar induciendo un desequilibrio entre pro oxidación y anti oxidación. (Camps, D. 2010).

3.3.3. Diabetes

Los altos niveles de glucosa característicos de la diabetes inducen la glicosilación no enzimática de proteínas. Esta glicosilación no enzimática altera la estructura y la función de las proteínas. La vía del poliol es un posible mecanismo por el que la hiperglucemia puede alterar la función y estructura de las células afectadas por las complicaciones diabéticas. La activación de la vía del poliol disminuiría el NADPH y los niveles de glutatión, aumentando de esta manera el estrés oxidativo (Camps, D. 2010). Ya que el aumento de estrés oxidativo descrito en los diabéticos está relacionado con la disminución de antioxidantes como el glutatión.

3.3.4. Hipertensión arterial (HTA)

La HTA puede ser considerada como un conjunto de resultados sistémicos de las lesiones (vasculares, parenquimatosas, etc.) producidas por los radicales libres. En la HTA se ha observado un aumento de la peroxidación de lípidos, tanto en plasma como en las membranas celulares, así como un aumento en la cantidad total de lípidos y una disminución de la capacidad antioxidante. La HTA predispone a acelerar la aterosclerosis, al menos en parte a causa de la sinergia entre elevación de presión sanguínea y otros estímulos aterogénicos que inducen estrés oxidativo en los vasos arteriales (Camps, D. 2010).

3.4 Antioxidantes y tipos de antioxidantes

Un antioxidante es toda sustancia que retrasa o previene el deterioro, daño o destrucción provocados por una oxidación (Youngson, R. 2003). Los antioxidantes que se encuentran naturalmente en el organismo y en ciertos alimentos, son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los radicales libres, actuando algunos a nivel intracelular y otros en la membrana de las células, siempre en conjunto para proteger a los diferentes órganos y sistemas. (Benito Peinado PA, Calvo Bruzos SC, Carmen Gómez C y Iglesias Rosado C. 2014).

3.4.1. Antioxidantes endógenos

En el organismo existen antioxidantes endógenos que evitan las reacciones en cadena que generan los radicales libres. (Fernández P y Montoya P. 2003).

Enzimas antioxidantes capaces de inhibir a las especies reactivas de oxígeno:

❖ Superóxido dismutasa (SOD)

La SOD mitocondrial es dependiente de manganeso; la enzima citoplasmática es dependiente de cobre y zinc. (Vasudevan DM, Sreekumari S. y Kannan V. 2011). La SOD elimina el anión superóxido mediante su conversión a peróxido de hidrógeno. (Fernández P y Montoya P. 2003)

❖ Glutatión peroxidasa

El H_2O_2 se elimina por la glutatión peroxidasa (POD), la cual es una enzima dependiente de selenio. (Vasudevan DM, Sreekumari S. y Kannan V. 2011). Esta enzima transforma el glutatión reducido (GSH) en glutatión oxidado (GSSG). (Fernández P y Montoya P. 2003)

❖ Glutatión reductasa

El glutatión oxidado, a su vez, se reduce por la glutatión reductasa (GR) en presencia de NADPH. Este NADPH se genera con la ayuda de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (GDP) en la vía de derivación del HMP. Por lo tanto, en la deficiencia de GDP, los hematíes son susceptibles a la lisis, sobre todo cuando se

administran agentes oxidantes (anemia hemolítica inducida por drogas). (Vasudevan DM, Sreekumari S. y Kannan V. 2011).

❖ Catalasa

Cuando el H_2O_2 se genera en grandes cantidades la enzima catalasa también se utiliza para su eliminación. (Vasudevan DM, Sreekumari S. y Kannan V. 2011). Esta enzima se encuentra presente en los peroxisomas que transforman el H_2O_2 en H_2O y O_2 . (Fernández P y Montoya P. 2003)

3.4.2. Antioxidantes exógenos

❖ Polifenoles

El consumo de frutas, verduras y bebidas ricas en polifenoles, es benéfico para la salud humana. Los polifenoles de la dieta representan una amplia variedad de compuestos que se producen en las frutas, hortalizas, vino, té y chocolate. Contienen flavonas, isoflavonas, flavonoides, catequinas y ácidos fenólicos. Actúan como agentes que tienen efectos anti-oxidantes, anti-apoptosis, anti-envejecimiento, anti-cancerígeno, anti-inflamatorio y anti-aterosclerótico. (Vasudevan DM, Sreekumari S. y Kannan V. 2011).

❖ Vitaminas

La vitamina E o α -tocoferol, es un antioxidante liposoluble, supresor del daño oxidativo en membranas biológicas, lipoproteínas y tejidos. (Pérez Jiménez J. 2007). Esta vitamina tiene la capacidad de reaccionar con radicales peroxilo ($ROO\bullet$); durante esta reacción se genera un nuevo radical más estable que el que había inicialmente, debido a la existencia de un anillo aromático. Por esta capacidad para evitar la propagación de la oxidación lipídica tiene una función importante en el mantenimiento de la integridad de la membrana. (Fernández P y Montoya P. 2003).

La vitamina C es un antioxidante soluble en agua. (Vasudevan DM, Sreekumari S. y Kannan V. 2011). Su capacidad para actuar como antioxidante se debe a que al reaccionar con radicales libres, fundamentalmente radicales peroxilo, los neutraliza y

se transforma en el radical dehidroascorbato, menos reactivo que los radicales libres que existían previamente. (Fernández P y Montoya P. 2003).

Los carotenoides son pigmentos naturales, tetraterpenoides sintetizados en plantas y otros organismos fotosintéticos, así como en algunas bacterias no fotosintéticas y levaduras. Pueden captar radicales peróxido, mediante transferencia de electrones o sustracción de átomos de hidrógeno, mecanismo que lleva a la formación de una gran variedad de carotenoides radicalicos. (Fernández P y Montoya P. 2003) En tejido humano existen el β -caroteno, α -caroteno, licopeno y luteína. (Pérez Jiménez J. 2007). El beta-caroteno puede actuar como antioxidante en la fase de rompimiento de la cadena, pero son menos eficaces que el α -tocoferol. (Vasudevan DM, Sreekumari S. y Kannan V. 2011).

3.5. Plantas como antioxidantes

Las plantas son una de las fuentes más prometedoras para descubrir nuevos agentes antioxidantes. (Martin y Ernst, 2003; Ziech *et al.*, 2012; Saavedra-Molina *et al.*, 2014). Entre los compuestos presentes en las plantas con mayor actividad antioxidante informada se encuentran: polifenoles (taninos, flavonoides, derivados del ácido cinámico, xantonas, cumarinas, lignanos, quinonas, rotenoides, estilbenos, etc.), aceites esenciales (terpenoides y aromáticos), ácidos grasos (saturados e insaturados), algunos alcaloides (derivados de la isoquinoleína) y otros compuestos como los carotenos, los ácidos benzoicos y ascórbico, tocoferoles, el sitosterol y elementos minerales. (Bhaskar y Balakrishnan, 2009; Ebrahimzadeh *et al.*, 2009). Estas sustancias sirven a la planta como mecanismo de defensa ante el ataque de microorganismos, insectos y herbívoros. (Dixon, 2001).

3.5.1. Planta *Justicia spicigera*

- ❖ Familia: Acanthaceae.
- ❖ Sinonimia popular: Añil de piedra, hierba purpura, limanin, micle, muele, muelle, muille, multe y muiltle.
- ❖ Sinonimia botánica: *Jaconina spicigera* (Schlegel) L.H. Bailey; *Justicia atramentaria* Benth.; *Sericographis mohintli* Nees; *Justicia mohintli* Hemsley y *Jaconina scarlatina* Blake.



Figura 1. Hojas de *J. spicigera*



Figura 2. Flor de *J. spicigera*



Figura 3. Planta completa de *J. spicigera*.

3.5.2. Botánica y ecología de *J. spicigera*

J. spicigera es una planta que se encuentra como arbusto de 1 a 1.5 m de altura, densamente ramificado, con hojas más largas que anchas. Las flores se encuentran agrupadas en la unión del tallo y la hoja en la parte terminal de la planta, comúnmente de color anaranjado, pero algunas veces rojo pálido en forma de tubos que terminan rasgándose, formándose un labio. Los frutos son en forma de capsulas. *J. spicigera* es originaria de México a Colombia, presente en zonas con climas cálidos. (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009)

3.5.3. Información farmacológica de *J. spicigera*

En los estados de México, Hidalgo, Michoacán, Morelos y Quintana Roo se emplea el conocimiento de las hojas o ramas en problemas de la sangre en general. En Michoacán es utilizada en casos de eripisela, sífilis, tumores o granos, así como en problemas de presión arterial. El cocimiento de las hojas o ramas y en ocasiones de la flor, se ingiere para malestares relacionados con el aparato digestivo, como dolor de estómago, diarrea, y disentería. Se utiliza también para padecimientos respiratorios como tos, bronquitis y constipación. (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009)

3.5.4. Información fitoquímica de *J. spicigera*

En la planta se han identificado diversos compuestos como: carbohidratos (mucilagos, pectinas, glucósidos), materia colorante (resina alcalina), aceites esenciales, sales minerales (potasio, acetato, oxalato de calcio, sulfatos, cloruros de sodio), de las hojas se han aislado flavonoides como camferitrin, triamnosido de camferol y en los retoños se encuentran taninos. (Peña Agüero B. 2010).

3.6.- Evaluación de la actividad antioxidante

Existen diferentes ensayos para determinar la capacidad antioxidante, en donde cada ensayo se basa en reacciones químicas diferentes y por lo tanto, la actividad antioxidante de un mismo extracto puede variar dependiendo del método de análisis empleado. (Huang *et al.*, 2005).

3.6.1. Pruebas in vitro

3.6.1.1 Antilipoperoxidación

La prueba de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) está diseñada para determinar sustancias reactivas a este ácido generadas durante el estrés oxidativo. La degradación oxidativa de los lípidos por ERO, llamada peroxidación lipídica, se traduce en la formación de peróxidos de lípidos altamente reactivos e inestables. En presencia de calor y ácido, el malondialdehído (MDA) reacciona con ácido tiobarbitúrico (ATB) para producir un producto coloreado, la intensidad del color corresponde al nivel de peroxidación de lípidos en la muestra. (R&D Systems, 2015). Las sustancias reactivas del ATB se miden a través de un tipo de condensación cromogénica entre este ácido con el MDA a 532 nm. (Oxford Biomedical. 2013).

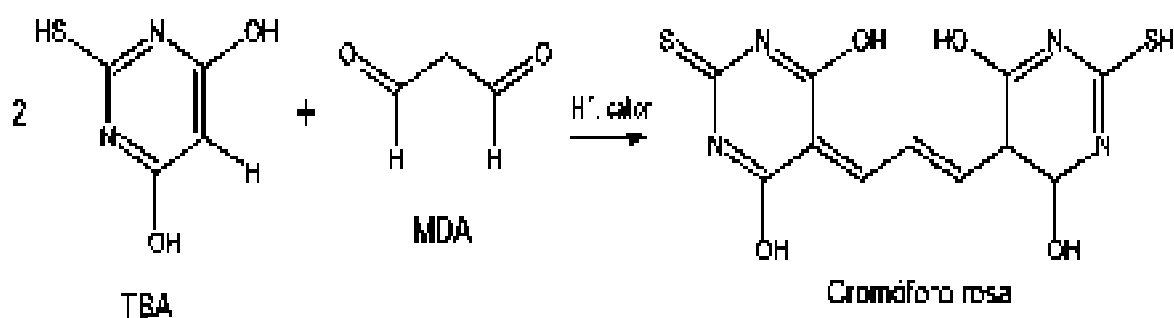


Figura 4.- Reacción entre el ácido 2-tiobarbitúrico (ATB) y el malondialdehído (MDA) en condiciones ácidas y calor.

3.6.1.2. Reducción del radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

El radical DPPH• conocido como 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, es un radical libre estable, que se utiliza comúnmente para evaluar la capacidad de los compuestos para actuar como captadores de radicales libres o donantes de hidrógeno y para medir la actividad antioxidante de tejidos. La reacción de DPPH• con un antioxidante o compuesto reductor, produce el DPPH₂ hidracina correspondiente, que puede ser seguido por el cambio de color de púrpura (absorbencia a 515-528 nm) a amarillo (Cayman Chemical. 2015.) Este método es rápido, simple, de bajo costo y ampliamente utilizado para medir la capacidad de los compuestos para actuar como eliminadores de radicales libres o donantes de hidrógeno, y para evaluar la actividad antioxidante de los alimentos. También se puede utilizar para cuantificar los antioxidantes en sistemas biológicos complejos, para muestras sólidas o líquidas. La ventaja de este método es que el DPPH• se deja reaccionar con la muestra el tiempo suficiente, lo que permite reaccionar lentamente incluso con antioxidantes débiles. La eficacia antioxidante se mide a temperatura ambiente de manera que el riesgo de degradación térmica de las moléculas ensayadas se elimina. (National Center for Biotechnology Information, U.S. 2011).

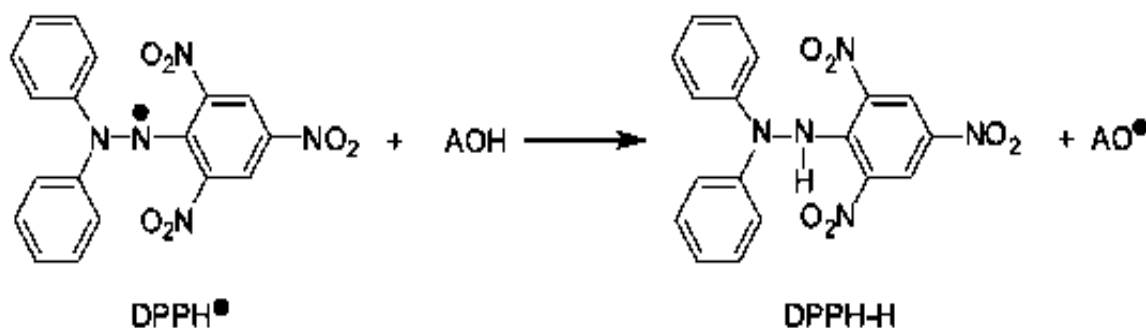


Figura 5.- Principio de ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•)

3.6.1.3 Capacidad de reducción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

En el organismo el H_2O_2 se descompone rápidamente en oxígeno y agua, lo cual puede producir radicales hidroxilos que inician la peroxidación lipídica y causan daño en el ADN. En esta prueba se evalúa la capacidad de compuestos para inhibir el H_2O_2 , el mayor poder de inhibición de este compuesto se registra en lecturas más bajas de absorbencia. (Barroso Moreno M. 2015).

3.6.1.4 Capacidad antioxidante total

El ensayo de capacidad antioxidante total está basado en la reducción de fosfato de molibdeno (VI) al fosfato-molibdeno (V). La incubación de los extractos con molibdeno (VI) le indicará la presencia de componentes antioxidantes en el extracto, que pueden ser evaluados mediante el registro de la absorbencia a 695 nm (para detectar el complejo de molibdeno verde reducido). El método del fosfomolibdeno se aplica rutinariamente en el laboratorio para evaluar la capacidad antioxidante total de extractos de plantas. (Pilar Prieto MP y Aguilar M. 1999).

3.6.1.5 Poder reductor

El hierro férrico (Fe^{3+}) se reduce inicialmente por antioxidantes donantes de electrones presentes en la muestra a su forma ferrosa (Fe^{2+}). El complejo sonda-hierro colorimétrica desarrolla un producto de color azul oscuro después de la reducción, el cual se puede medir espectroscópicamente de 540 a 600 nm. El incremento de esta variable (absorción) muestra un aumento en el poder reductor de los extractos. Cuanto mayor es la absorbencia de la mezcla de reacción, mayor será el poder reductor (Cell Biolabs. 2015).

3.6.2. Pruebas en levaduras

Aunque la actividad antioxidante se puede determinar mediante pruebas “in vitro”, este tipo de pruebas pueden alejarse considerablemente de la acción de tales agentes en sistemas biológicos (Antolovich *et al.*, 2002). Las células de levadura tienen muchas ventajas técnicas sobre las células humanas: son adecuadas para el desarrollo de métodos experimentales de alto rendimiento ya que su ciclo de vida es rápido; la disponibilidad de crecer en medios líquidos como células en dispersión, o en colonias en medios sólidos; y su cultivo, no requiere elaboradas técnicas estériles, aunado a el bajo costo de los medios de crecimiento. (Guthrie y Fink, 1991). En la levadura *S. cerevisiae*, las respuestas ante el estrés producido por diferentes agentes (temperatura, falta de nutrientes, etanol, oxidantes, metales pesados, pH, etc.) comparte mecanismos comunes con células eucariotas, aunque existen cambios genéticos y bioquímicos específicos dependiendo del agente causante del estrés. *S. cerevisiae* es capaz detectar el estrés oxidativo y generar una repuesta a nivel molecular induciendo los diferentes sistemas de defensa antioxidantes tanto primarios como secundarios. (Costa y Moradas-Ferreira, 2001).

3.7. *Saccharomyces cerevisiae*

3.7.1. Características de *S. cerevisiae* que la hacen un modelo de células eucariotas

El genoma de esta levadura fue el primero en ser secuenciado completamente, el cual fue completado 1996 y comprende 6000 genes, de los cuales más del 60 % tiene una función asignada. Se estima que alrededor del 30 % son genes ortólogos entre humanos con participación en enfermedades humanas. Debido a esta homología genética y a la alta conservación de las vías bioquímicas elementales, los estudios en la levadura han sido esenciales para entender procesos celulares fundamentales como la traducción del ARNm y su degradación, el mecanismo de reparación del ADN y el ciclo celular. (Morano *et al.*, 2012). La levadura *S. cerevisiae* es uno de los modelos eucariotas más simple, y numerosos procesos esenciales se conservan entre esta levadura y humanos. (Müller y Grossniklaus, 2010).

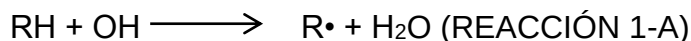
3.8. Evaluación de la actividad antioxidante en levaduras

3.8.1. Lipoperoxidación celular

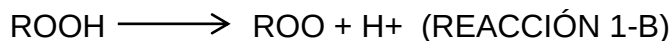
La peroxidación de lípidos (LP) es la degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados causados por ERO, que son los responsables de la degradación de lípidos de membrana. La lipoperoxidación es una reacción en cadena de radicales libres que sucede en tres pasos principales, iniciación, propagación y terminación, en las cuales surgen aldehídos, alcoholes, cetonas volátiles y polímeros de lípidos los cuales pueden ser perjudiciales. (Neda Mimica-Dukić, Nataša Simin, Emilija Svirčev, Dejan Orčić, Ivana Beara, Marija Lesjak and Biljana Božin. 2012).

❖ Fase de iniciación

Durante la fase de iniciación, el evento primario es la producción RH (radical con carbono central) (AGPI) o ROO (radical peróxido de lípidos) por la interacción de una molécula de AGPI con los radicales libres generados por otros medios:



Ion metálico



El R• y el ROO, a su vez son degradados a malondialdehído (3 carbonos). Esto es considerado como un indicador del rompimiento de ácidos grasos por los radicales libres. (Vasudevan DM, Sreekumari S. y Kannan V. 2011).

❖ Fase de propagación

El radical de carbono central (R•) reacciona rápidamente con el oxígeno molecular formando un radical peroxilo (ROO•) que puede atacar a otras moléculas de lípidos poliinsaturados. (Vasudevan DM, Sreekumari S. y Kannan V. 2011).





El resultado neto de las reacciones 2 y 3 es la conversión de $\text{R}\cdot$ a ROOH (un hidroperóxido). Pero hay una conversión simultánea de un radical de carbono central a un radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$). Esto podría llevar a la producción continua de hidroperóxido con el consumo de cantidades equimoleculares de AGPI. Un radical libre genera otro radical libre en la molécula vecina y se da inicio a una “reacción en cadena” o de “propagación”. La acumulación de tales daños en los lípidos conduce a la destrucción de la arquitectura fina y de la integridad de las membranas. (Vasudevan DM, Sreekumari S. y Kannan V. 2011).

❖ Fase de terminación

La reacción se continúa sin supervisión hasta que un radical peroxilo reacciona con otro radical peroxilo para formar productos inactivos. (Vasudevan DM, Sreekumari S. y Kannan V. 2011).



3.8.2. Viabilidad mediante el ensayo MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico)

Este método se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo. La viabilidad se mide mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico), es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazan. El producto de la reacción, el formazan queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido como consecuencia de la reacción de un cambio de coloración del amarillo al azul. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. (Arencibia Arrebola DF, Rosario Fernández LF y Curveco Sánchez DL. 2009).

4. JUSTIFICACIÓN

Los antioxidantes son importantes ya que diferentes enfermedades se han relacionado con el estrés oxidativo. A la planta *J. spicigera* se le atribuyen diferentes propiedades farmacológicas, sin embargo, se desconoce su actividad antioxidante. Por lo anterior, es necesario determinar la actividad antioxidante de la planta *J. spicigera* con diferentes ensayos “in vitro” al igual que con un modelo biológico como lo es la levadura *S. cerevisiae*.

5. HIPÓTESIS

El extracto clorofórmico de *J. spicigera* posee actividad antioxidante “in vitro” y reduce los procesos oxidativos en *S. cerevisiae*.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

- ❖ Analizar la capacidad antioxidante del extracto clorofórmico de la planta *J. spicigera* in vitro y en la levadura *S. cerevisiae*.

6.2. Objetivos particulares

- ❖ Estudiar la actividad antioxidante del extracto clorofórmico de la planta *J. spicigera* mediante pruebas in vitro.
- ❖ Analizar el efecto del extracto clorofórmico de la planta *J. spicigera* sobre los procesos oxidativos en *S. cerevisiae*.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Obtención del extracto clorofórmico de *J. spicigera*

Las plantas fueron obtenidas de la región de Nueva Italia, Michoacán, México. Almacenadas en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del IIQB. Se utilizaron las hojas, ramas y flores las cuales ya secas se cortaron en trozos más pequeños, y se trituraron con una licuadora (Oster industrial). Enseguida, se colocó la planta en un frasco ámbar y se adicionaron 10 ml de cloroformo; se dejó macerar durante 7 días en refrigeración. Después se filtró el extracto y se dejó evaporar el solvente durante 24 h. El producto se sometió a un proceso para eliminar la mayor parte del solvente utilizando un rotavapor Soxhlet. El resto del solvente se evaporó con flujo de nitrógeno.

7.2. Evaluación de la actividad antioxidante in vitro

7.2.1. Antilipoperoxidación

Se utilizó el ensayo modificado de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico descrita por Ohkawa *et al.* (1979), para lo cual 0.5 ml de homogenado de yema de huevo al 10% (p/v) fueron mezclados con 100 µL del extracto previamente disuelto en agua:metanol (8:2), se completó el volumen a 1 ml con agua destilada. Se adicionaron 5 µl de sulfato ferroso (FeSO_4) 0.07 M, se incubó por 30 min y posteriormente se adicionó 1.5 ml de ácido acético al 20% (pH 3.5 ajustado con NaOH), 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico (ATB) 0.8 % (p/v) en duodecil sulfato de sodio al 1.1% y 0.5 ml de ácido tricloroacético (ATC) al 20%. La solución se mezcló en vortex y después se calentó a 95°C por 60 min, se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 min a una temperatura de 15°C. Se determinó la absorbencia del sobrenadante a 532 nm, el porcentaje del índice antioxidante se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

*Tomando en cuenta como 100% el efecto generado por el ácido ascórbico.

$$(D.O. \text{ EXT} * 100) / D.O. \text{ ÁC. ASC.}$$

Dónde:

D.O. EXT: densidad óptica de la muestra tratada con el extracto

D.O. ÁC. ASC: densidad óptica de la muestra tratada con el ácido ascórbico

7.2.2. Reducción del radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

La actividad antioxidante del extracto basada en la reducción del radical libre estable DPPH• se determinó de acuerdo al método descrito por Lee *et al.* (2004) de la siguiente forma: 100 µl de extracto fueron añadidos en tubos y completando un volumen de 1 ml con agua destilada, 5 ml de la solución DPPH• (0.2 mM en metanol) se añadió a cada tubo, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad por 30 min. El control fue preparado por el mismo procedimiento sin el extracto. La absorbencia de la solución se midió a 517 nm. La inhibición del radical DPPH• fue calculada en % con la siguiente ecuación:

* Tomando en cuenta como 100% el efecto generado por el ácido ascórbico

$$(D.O. \text{ EXT} * 100) / D.O. \text{ ÁC. ASC.}$$

Dónde:

D.O. EXT: densidad óptica de la muestra tratada con el extracto

D.O. ÁC. ASC: densidad óptica de la muestra tratada con el ácido ascórbico

7.2.3. Capacidad de reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

La determinación de la capacidad de reducción de H₂O₂ se determinó de acuerdo al método descrito por Ruch *et al.* (1984). Para lo cual 100 µl de extracto se adicionaron en 3.4 ml de buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.4) y fueron mezclados con 600 µl de H₂O₂ 43 mM. Se determinó la absorbencia de la mezcla de la reacción a 230 nm, el porcentaje de capacidad de reducción de H₂O₂ se calculó con la fórmula:

* Tomando en cuenta como 100% el efecto generado por el ácido ascórbico

$$(D.O. \text{ EXT} * 100) / D.O. \text{ ÁC. ASC.}$$

Dónde:

D.O. EXT: densidad óptica de la muestra tratada con el extracto

D.O. ÁC. ASC: densidad óptica de la muestra tratada con el ácido ascórbico

7.2.4. Capacidad antioxidante total

La determinación de la capacidad antioxidante total fue evaluada por el método del fosfomolibdeno como lo describe Kumaran y Karunakaran (2007), para lo cual 100 µl de extracto se completaron a un volumen constante de 0.3 ml con agua destilada, se adicionó 3 ml de la solución reactiva: ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0.6 M, fosfato de sodio (Na₂HPO₄) 28mM y molibdato de amonio [(NH₄)₆Mo₇O₂ • 4H₂O] 4 mM, se mezclaron e incubaron a 95°C por 90 min, el blanco fue preparado por el mismo procedimiento sin el extracto. Después de enfriar a temperatura ambiente se midió la absorbencia a 695 nm.

* Tomando en cuenta como 100% el efecto generado por el ácido ascórbico

$$(D.O. \text{ EXT} * 100) / D.O. \text{ ÁC. ASC.}$$

Dónde:

D.O. EXT: densidad óptica de la muestra tratada con el extracto

D.O. ÁC. ASC: densidad óptica de la muestra tratada con el ácido ascórbico

7.2.5. Poder reductor

El poder reductor del extracto fue determinado por el método de Mathew y Abraham, (2006) de la siguiente forma: se añadió a cada tubo 100 µl de extracto y se completó el volumen a 1 ml con agua destilada, 2.5 ml de buffer de fosfatos (0.2 M, pH 6.6) y 2.5 ml de solución de ferrocianuro de potasio ($C_6N_6FeK_4$) al 1% (p/v) fueron adicionados y mezclados mediante vortex, la mezcla fue incubada a 50°C por 20 min, después se agregó 1.5 ml de la solución de ácido tricloroacético (ATC) al 10 % (p/v) a cada mezcla y posteriormente se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min. Se tomaron 2.5 ml de sobrenadante y se mezclaron con 2.5 ml de agua, se añadió 0.5 ml de cloruro férrico ($FeCl_3$) al 0.1% (p/v), se mezcló en vortex y se determinó la absorbencia a 700 nm. El blanco fue preparado por el mismo procedimiento sin el extracto.

* Tomando en cuenta como 100% el efecto generado por el ácido ascórbico

$$(D.O. \text{ EXT} * 100) / D.O. \text{ ÁC. ASC.}$$

Dónde:

D.O. EXT: densidad óptica de la muestra tratada con el extracto

D.O. ÁC. ASC: densidad óptica de la muestra tratada con el ácido ascórbico

7.3. Obtención de levaduras

7.3.1. Precultivos y cultivos de la levadura *S. cerevisiae* (W303-1A)

Los precultivos y cultivos de la levadura *S. cerevisiae* (W303-1A) se realizaron mediante la inoculación en medio YPD líquido (extracto de levadura 1 %, peptona 2 % y dextrosa 2 %) (ATCC, 2014).

7.3.2. Lipoperoxidación celular

Se adicionaron 100 µl de extracto, 100 µl de ácido ascórbico y 100 µl de agua en las levaduras obtenidas, mediante purificación y lavados utilizando centrifugación y agua destilada. Como oxidantes se utilizó peróxido de hidrógeno y menadiona, 2.5 mM y 10 mM, respectivamente. Después se incubaron durante 30 min, enseguida se cosecharon las células mediante centrifugación (3 min a 7,000 rpm) a una temperatura de 20°C, esto se realizó en 3 ocasiones desechando el sobrenadante y agregando 1 ml de agua. Después se resuspendió el pellet en 0.5 ml de ácido tricloroacético al 10 % (p/v) y se colocaron de 2 a 3 perlas de vidrio, se lisaron las células en 6 ciclos de 20 s en vortex y 20 s en hielo, se centrifugaron a 5,000 rpm durante 3 min, se tomó el sobrenadante y se mezcló con 0.1 ml de EDTA 0.1 M y 0.6 ml de ácido tiobarbitúrico al 1 % (p/v) en NaOH 0.05 M, se incubó a 90°C durante 15 min se dejó enfriar, se centrifugo nuevamente a 5,000 rpm durante 3 min y se midió la densidad óptica del sobrenadante a 532 nm.

7.3.3. Viabilidad celular mediante ensayo MTT

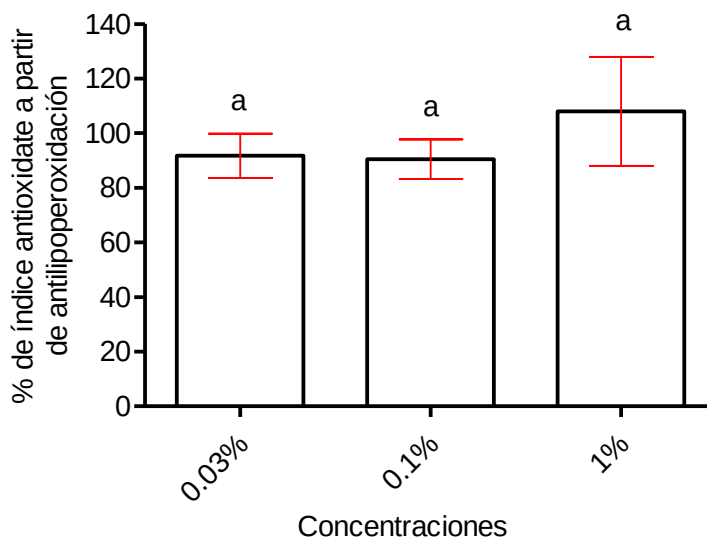
Se utilizaron 100 µl de extracto, 100 µL de ácido ascórbico o 100 µL de agua; como oxidantes peróxido de hidrógeno (2.5 mM) y menadiona (10 mM). A cada tubo se le adicionó 100 µl, se incubó durante 1 h a 180 rpm a 30 °C. Después se lavaron en 3 ocasiones y se desechó el sobrenadante, el resto se suspendió en 1 ml de agua desionizada y se le adiciona 0.150 ml de MTT (5 mg/ml), se homogenizo e incubó durante 2 h a 180 rpm y 30°C. Transcurrido el tiempo se adicionó 1.5 ml de HCl 0.04 M en 2-propanol y se homogenizó, enseguida se centrifugó a 5,000 rpm durante 3 min y enseguida se midió la densidad óptica a 570 nm.

8. RESULTADOS

8.1. Evaluación de la actividad antioxidante in vitro del extracto clorofórmico de *J. spicigera*

8.1.1. Antilipoperoxidación

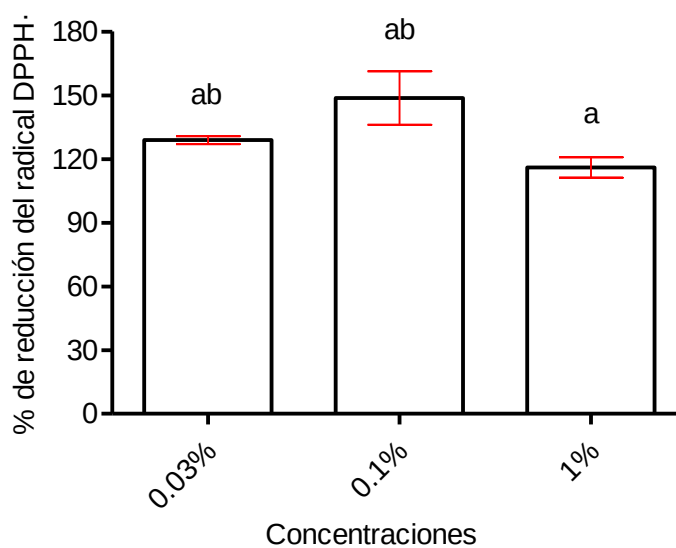
Los resultados se compararon con la actividad antilipoperoxidante del ácido ascórbico tomando ésta como el 100%. Utilizando una concentración de 0.03 % se observó una actividad alrededor del 100% con respecto al ácido ascórbico. Al aumentar la concentración del extracto a 0.1 y 1 %, no se observó un aumento significativo en el % de antilipoperoxidación (gráfica 1).



Gráfica 1. % de índice antioxidante a partir de la prueba de antilipoperoxidación por el extracto clorofórmico de *J. spicigera*. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media $\pm$ E.E.

8.1.2. Reducción del radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

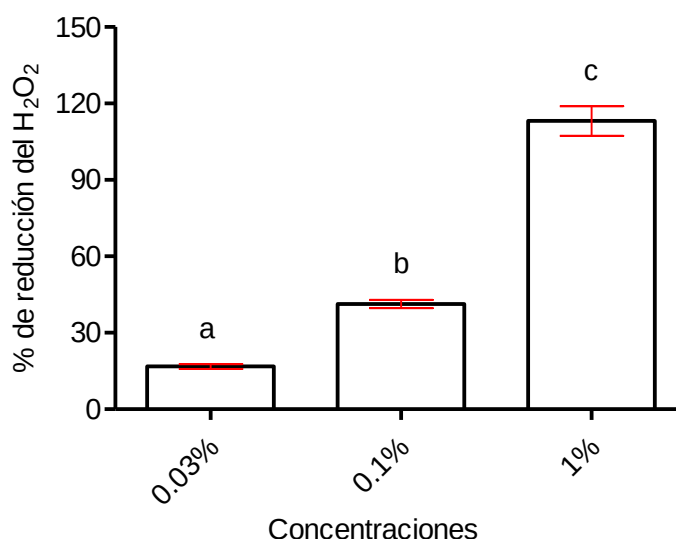
En la reducción del radical DPPH• los valores que se obtuvieron fueron comparados respecto a la actividad de reducción del ácido ascórbico (100%). Utilizando la concentración del extracto de *J. spicigera* al 0.03 % se redujo el DPPH• un 28 % más que con el ácido ascórbico, mientras que con la concentración de 0.1 % un 55 %, siendo éste el valor mayor. Con el extracto al 1 % aumento un 16 %.



Gráfica 2. % de reducción del radical DPPH• por el extracto clorofórmico de *J. spicigera*. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media $\pm$ E.E.

8.1.3. Determinación de la capacidad de reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

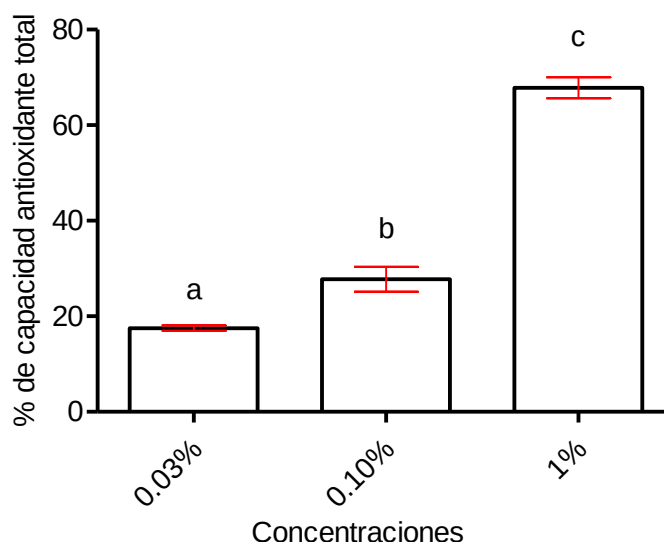
En la determinación de la capacidad de reducción del peróxido de hidrógeno se observó una diferencia significativa comparando cada una de las concentraciones. En la gráfica 3 se muestra como la reducción del H_2O_2 tiene un efecto exponencial al aumentar la concentración del extracto. Al utilizar la concentración del extracto de *J. spicigera* al 0.03 % se observó una reducción del 17%, en la concentración de 0.1 % un 43 % y en la concentración de 1 % de 117 %, siendo mayor que la reducción generada por el ácido ascórbico.



Gráfica 3. % de reducción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por el extracto de *J. spicigera*. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media $\pm$ E.E.

8.1.4. Capacidad antioxidante total

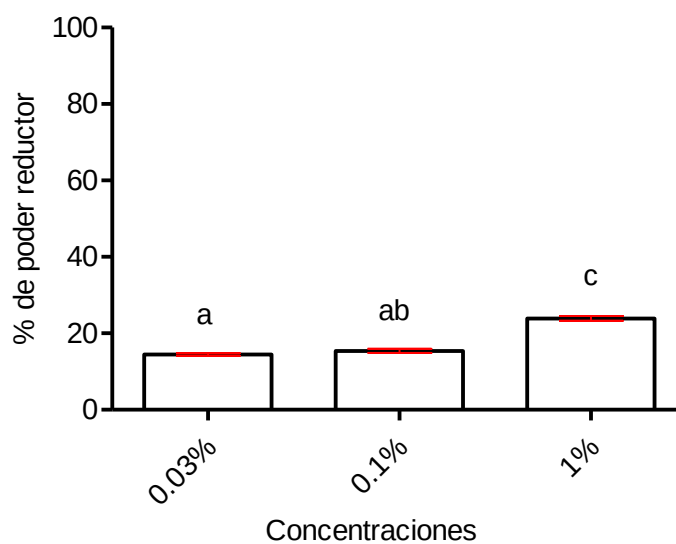
Determinando la capacidad antioxidante total de cada concentración de extracto de *J. spicigera* se observó una diferencia significativa al aumentar la concentración (gráfica 4). Al adicionar la concentración de 0.03% se generó un porcentaje de actividad del 17%, en la concentración de 0.1% del 27% y en la concentración de 1% del 67%. Se utilizó el ácido ascórbico como 100% de actividad antioxidante.



Gráfica 4. % de capacidad antioxidante total del extracto de *J. spicigera*. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media $\pm$ E.E.

8.1.5. Poder reductor

En la actividad reductora del extracto con las concentraciones de 0.03% y 0.1% no se observó una diferencia significativa, con porcentajes de reducción de un 14% y 15%, respectivamente. Comparando las concentraciones 0.03% con 1% y 0.1% con 1%, se observan diferencias estadísticamente (gráfica 5). Utilizando la concentración de 1 % se obtuvo un 23 % de reducción tomando la actividad del ácido ascórbico como 100%.

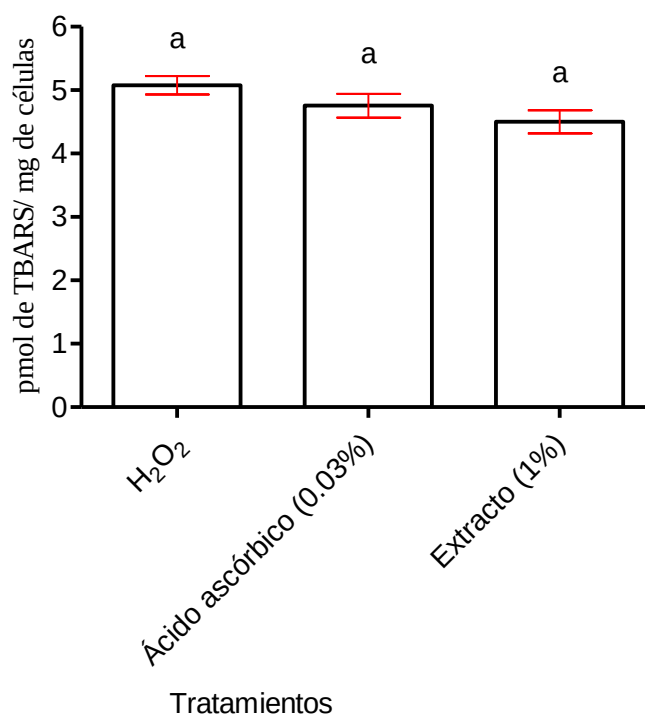


Gráfica 5. Determinación de poder reductor por el extracto clorofórmico de *J. spicigera*. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media $\pm$ E.E.

8.2. PRUEBAS REALIZADAS EN LEVADURAS

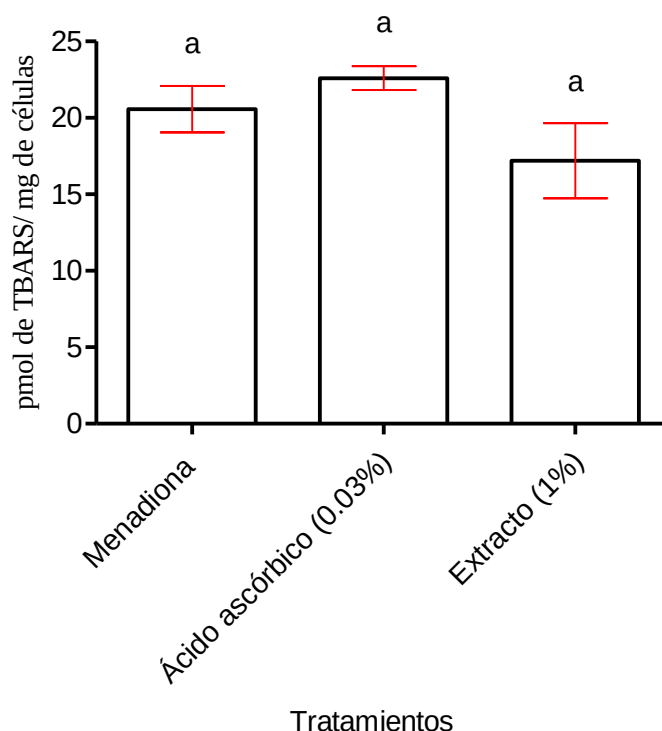
8.2.1. Lipoperoxidación celular

En esta prueba se calculó el grado de lipoperoxidación que puede ser reducido utilizando el extracto de *J. spicigera*. Se utilizaron como oxidantes el peróxido de hidrógeno 2.5 mM y menadiona 10 mM. Aunque existe una tendencia a una reducción en el grado de lipoperoxidación generado por la exposición al peróxido de hidrógeno, estadísticamente no se observó diferencia significativa al adicionar el ácido ascórbico o extracto al 1% (gráfica 6).



Gráfica 6. Lipoperoxidación celular en *S. cerevisiae* con peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media $\pm$ E.E.

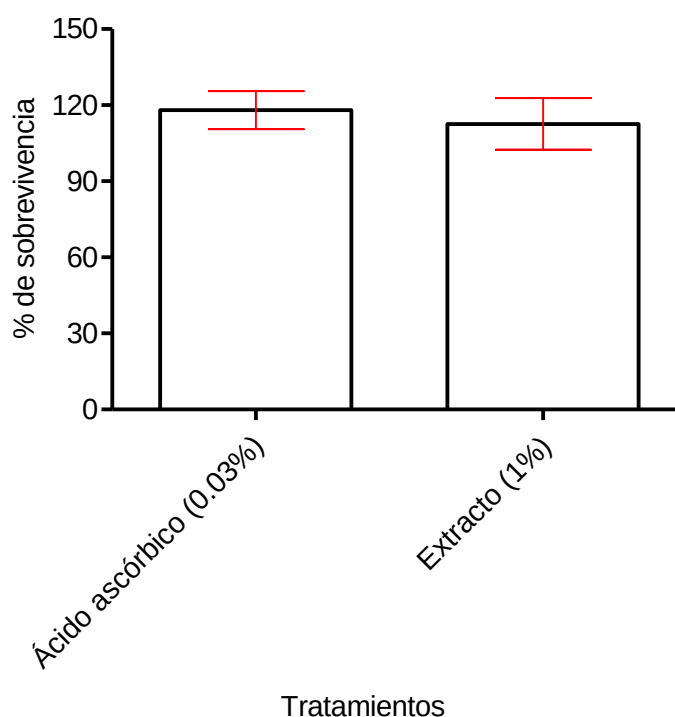
En la lipoperoxidación generada en células de *S. cerevisiae* al adicionar la menadiona, no se observaron diferencias significativas en presencia del ácido ascórbico (0.03%) o extracto al 1% (gráfica 7).



Gráfica 7. Lipoperoxidación celular en *S. cerevisiae* con menadiona. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media $\pm$ E.E.

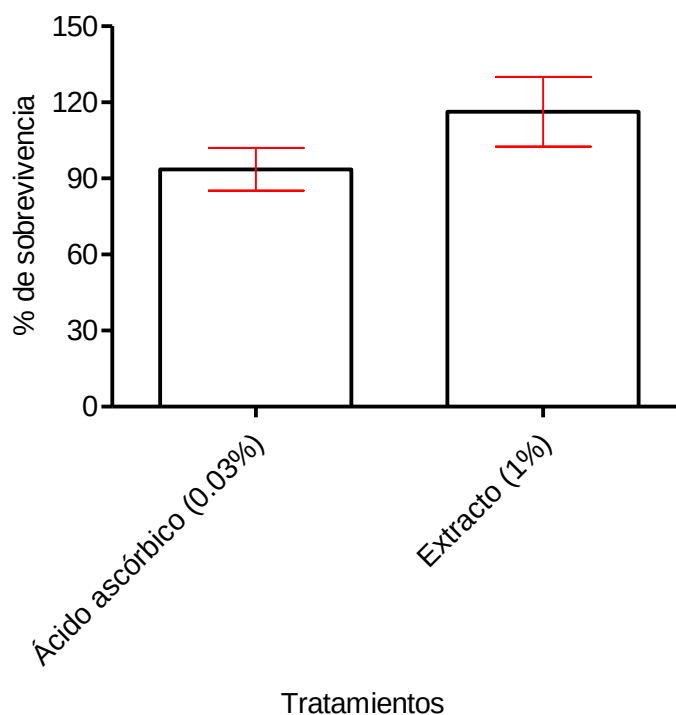
8.2.2. Viabilidad determinada mediante ensayo MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) al adicionar peróxido de hidrógeno o menadiona

En esta prueba se tomó como 100% de sobrevivencia el valor obtenido de las levaduras de *S. cerevisiae* en presencia del peróxido de hidrógeno sin algún antioxidante. Al adicionar el extracto al 1 % aumento el % de sobrevivencia un 12%, mientras que con el ácido ascórbico fue de 18%. Al realizar la comparación entre el % de sobrevivencia generado por el ácido ascórbico y el extracto de *J. spicigera*, no se observaron diferencias estadísticamente (gráfica 8).



Gráfica 8. Porcentaje de sobrevivencia en presencia de peróxido de hidrógeno determinada mediante el ensayo MTT. Como 100% se tomó la viabilidad en presencia del peróxido de hidrógeno. Los resultados se analizaron mediante la prueba t-student ($p < 0.05$). Cada valor representa la media $\pm$ E.E, de tres experimentos independientes por triplicado.

Para la determinación de la viabilidad se utilizó el valor generado en presencia de la menadiona como 100%. En presencia del extracto de *J. spicigera* aumentó la viabilidad un 16%, sin embargo, estadísticamente no hay diferencias significativas al adicionar el ácido ascórbico (gráfica 9).



Gráfica 9. Porcentaje de sobrevivencia en presencia de menadiona determinada mediante el ensayo MTT. Como 100% se tomo la viabilidad con menadiona. Los resultados se analizaron mediante la prueba t-student ($p < 0.05$). Cada valor representa la media $\pm$ E.E, de tres experimentos independientes por triplicado.

9. DISCUSIÓN

Estudios previos sobre el género *Justicia* han demostrado que presenta propiedades farmacológicas, sin embargo, se desconoce si la planta *Justicia spicigera* presenta actividad antioxidante. Para determinar la actividad antioxidante de *J. spicigera* en este trabajo se obtuvo su extracto clorofórmico y se realizaron diferentes pruebas “in vitro” y en la levadura *S. cerevisiae* como modelo biológico. Diferentes estudios relacionados con las propiedades farmacológicas de *J. spicigera* se han realizado en el grupo de trabajo, Sin embargo, se ha utilizado como solvente hexano y etanol, los cuales difieren en la polaridad del cloroformo, característica que puede alterar el tipo y concentración de compuestos extraídos de *J. spicigera*, y por ende sus propiedades farmacológicas. La actividad antioxidante de un compuesto ya sea puro o una mezcla compleja, está basada en la habilidad de donar átomos de hidrógeno o electrones, quelación de cationes metálicos o reduciendo radicales potencialmente nocivos (Huang *et al.*, 2005). Por lo que es necesario utilizar pruebas in vitro basadas en diferentes mecanismos de reacción. En base a lo anterior es que la actividad antioxidante del extracto clorofórmico de *J. spicigera* se evaluó mediante cinco ensayos in vitro que difieren en sus mecanismos de reacción. Con los resultados obtenidos en las pruebas se observó que en la capacidad para evitar la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, el extracto tiene una mejor actividad a una concentración de 0.03%. En la prueba de reducción del radical DPPH[•] se obtuvo que a la concentración de 1% presentó una reducción promedio de 155%. En las pruebas de capacidad de reducción del peróxido, capacidad antioxidante total y poder reductor, se obtuvo una mayor actividad antioxidante a la concentración de 1% del extracto de *J. spicigera*. Se puede sugerir que a una mayor concentración del extracto se obtendrán mejores resultados en la capacidad antioxidante, sin embargo, en las pruebas de antilipoperoxidación y reducción del radical DPPH[•], no fue así, ya que la concentración con una mayor actividad antioxidante fue de 0.03% y 0.1%, respectivamente. A *J. spicigera* se le atribuyen propiedades farmacológicas, por lo que es utilizada para el tratamiento de gonorrea, disentería, parasitismo, diabetes, cáncer, leucemia y como alternativas en otras terapias como para el VIH; mientras

que sus pigmentos son utilizados en la industria alimentaria, sin embargo, es la primera vez que se reporta actividad antioxidante in vitro de su extracto clorofórmico.

Para inducir estrés oxidativo en la levadura *S. cerevisiae* W303-1A como modelo biológico, se utilizó peróxido de hidrógeno y menadiona. El extracto y ácido ascórbico se utilizaron a una misma concentración (0.03%). En la prueba de reducción del grado de lipoperoxidación en levaduras se obtuvieron valores cercanos entre el ácido ascórbico y el extracto, demostrando así que el extracto puede actuar impidiendo la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Al determinar el porcentaje de sobrevivencia mediante el ensayo con MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico), que es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazan [21], se observó un aumento en el porcentaje de sobrevivencia. Con los resultados obtenidos se puede reportar una actividad antioxidante del extracto clorofórmico de *J. spicigera*, en donde podrán estar actuando sus compuestos. Entre los compuestos más relacionados por presentar actividad antioxidante, se encuentran los flavonoides como el camferitrin y el triamnósido de camferol, que se han aislado de las hojas *J. spicigera* [9]. Por lo cual es necesario determinar la concentración tanto de estos compuestos como de todos los presentes en el extracto utilizado, con el fin de conocer si la actividad antioxidante observada es debida específicamente a alguno de los compuestos presentes, o a un efecto sinérgico entre los compuestos presentes. De igual manera es importante evaluar si el efecto reportado se conservado en organismos multicelulares y si ése efecto presenta algún beneficio en padecimientos originados por el estrés oxidativo.

10. CONCLUSIÓN

El extracto clorofórmico de *J. spicigera* presenta actividad antioxidante in vitro y una tendencia a reducir el grado de lipoperoxidación, aumentando la viabilidad de células de *S. cerevisiae* expuestas a agentes oxidantes.

11. PERSPECTIVAS

Determinación de los compuestos químicos del extracto clorofórmico de *J. spicigera*, así como la evaluación de la actividad antioxidante de estos compuestos.

Estudio de la actividad antioxidante del extracto clorofórmico de *J. spicigera* y sus compuestos, en organismos multicelulares con padecimientos relacionados con la generación de estrés oxidativo, como hipertensión y diabetes.

12. REFERENCIAS

- [1] Laboratorio de estrés oxidativo. 2008. Estrés oxidativo y radicales libres.
<http://estresoxidativo.com>
- [2] Vasudevan DM, Sreekumari S. y Kannan V. 2011. Texto de bioquímica. 6; 236-241.
- [3] Camps, D. 2010. Bioquímica del estrés oxidativo. 1; 51-59.
- [4] Youngson, R. 2003. Antioxidantes y radicales libres. 1; 113-125
- [5] Benito Peinado PA, Calvo Bruzos SC, Carmen Gómez C y Iglesias Rosado C. 2014. Alimentación y nutrición en la vida activa: ejercicio físico y deporte. 1; 535-537
- [6] Fernández P y Montoya P. 2003. Alimentos de más interés en la población por su contenido antioxidante. 1; 20-29
- [7] Pérez Jiménez J. 2007. Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes. Efecto de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos. 1; 7-15
- [8] Martin K. W. y E. Ernst. (2003). Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. *J. Antimicrob. Chemother.* 51; 241-246.
- [8] Saavedra-Molina, A., Salgado-Garciglia, R., Noriega-Cisneros, R., Esquivel-Gutiérrez, E. R., Manzo-Avalos, S., Cortés-Rojo, C. y R. Montoya-Pérez (2014). Oxidative Stress in Diabetes and Hypertension Treated with Alternative Therapy of Medicinal Plants. In: *Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Protein Oxidation*, 1st ed. Angel Catalá, p.285.
- [9] Bhaskar, H. V. y N. Balakrishnan. (2009). *In Vitro* antioxidant property of *Laticiferous* plant species from Western Ghats Tamil Nadu, India. *Int. J. Health Res.* 2; 163-170.

[9] Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. F. y S. M. Nabavi. (2009). Antioxidant activity of leaves and inflorescence of *Eryngium Caucasianum* Trautv at flowering stage. *Pharmacogn Res.*1; 435-439.

[10] Dixon, R. (2001). Natural Products and Plant Disease Resistance. *Macmillan Magazines Ltd. Nature.* 411; 843-847.

[11] Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. Muicle.

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>

[12] Peña Agüero B. 2010. Usos y aplicaciones del muicle (*Justicia spicigera Schlect et Schdl*). 1; 2-4

[13] Huang, D., Ou, B. y R. Prior. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Agric. and Food chem.* 53; 1841-1856.

[14] R&D Systems. 2015. TBARS Parameter™ Kit for Measuring Oxidative Stress.

<https://www.rndsystems.com>

[15] Oxford Biomedical. 2013. Colorimetric Microplate Assay for 2-Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS).

<http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/OBR/FR40.pdf>

[16] Cayman Chemical. 2015. DPPH 2, 2-diphenyl-1-(2, 4, 6-trinitrophenyl)-hydrazine.

<https://www.caymanchem.com>

[17] National Center for Biotechnology Information, U.S. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3551182/>

[18] Barroso Moreno M. 2015. Basic Science applied to Chemical Engineering. Peróxido de hidrógeno.

<http://ciencia-basica-experimental.net/peroxido.htm>

[19] Pilar Prieto MP y Aguilar M. 1999. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. Elsevier. 1; 337-338

[20] Cell Biolabs. 2015. OxiSelect™ Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay Kit.

<http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-859-frap-assay-kit.pdf>

[21] Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, D. y K. Robards. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 127; 183-198.

[22] Guthrie, C. y G. R. Fink. (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol*. 194; 1–863.

[23] Costa V. y P. Moradas-Ferreira. (2001). Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Asp. Med*. 22; 217-246.

[24] Morano, K. A., Grant, C. M. y W. S. Moye-Rowley. (2012). The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 190; 1157-1195.

[25] Müller, B. y U. Grossniklaus. (2010). Model organisms a historical perspective. *J. Proteomics*. 73; 2054–63.

[26] Abubakar B. Aliyu, Mohammed A. Ibrahim, Aliyu M. Musa, Aisha O. Musa, Joyce J. Kiplimo and Adebayo O. Oyewale. 2013. Free Radical Scavenging and Total Antioxidant Capacity of Root Extracts of *Anchomanes Difformis* Engl. (Araceae). 1; 117.

[26] Neda Mimica-Dukić, Nataša Simin, Emilija Svirčev, Dejan Orčić, Ivana Beara, Marija Lesjak and Biljana Božin. 2012. The Effect of Plant Secondary Metabolites on Lipid Peroxidation and Eicosanoid Pathway.

[27] Arencibia Arrebola DF, Rosario Fernández LF y Curveco Sánchez DL. 2009. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. Retel (revista de toxicología en línea). Pág. 48-50.