



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Ensayos de actividad biológica y
búsqueda de metabolitos secundarios de
Justicia spicigera

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Q.F.B. Juan Carlos Gómez Verjan

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

COMITÉ TUTOR: Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Dra. Rachel Mata Essayag de Espindola

MÉXICO, D.F.

Septiembre, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Ensayos de actividad biológica y
búsqueda de metabolitos secundarios de
Justicia spicigera

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Q.F.B. Juan Carlos Gómez Verjan

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

COMITÉ TUTOR: Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Dra. Rachel Mata Essayag de Espindola

MÉXICO, D.F.

Septiembre, 2010



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/442/10

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de junio de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) del (la) alumno (a) GOMEZ VERJAN JUAN CARLOS con número de cuenta 300592737 con la tesis titulada "Ensayos de actividad biológica y búsqueda de metabolitos secundarios de Justicia Spicigera", realizada bajo la dirección del (la) DRA. MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS:

Presidente: DR. RICARDO REYES CHILPA
Vocal: DR. GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO
Secretario: DRA. MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS
Suplente: DRA. MARTHA LYDIA MACIAS RUBALCAVA
Suplente: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG DE ESPINDOLA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 31 de agosto de 2010.

Dr. Juan Nuñez Farfán
Coordinador del Programa



DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO

JNF/DCRV/ASR/mnm

AGRADECIMIENTOS

AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNAM POR PERMITIRME DESEMPEÑARME EN SU PROGRAMA DE MAESTRÍA OBTENIENDO UN ALTO NIVEL ACADÉMICO

EL TRABAJO DE ESTA TESIS SE REALIZÓ MEDIANTE LOS APOYOS ECONÓMICOS OTORGADOS A TRAVÉS DE LOS PROYECTOS DGAPA (DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO DE LA UNAM) IN210709 Y IN221010-2.

AL CONACYT POR LA BECA OTORGADA PARA LA REALIZACIÓN DE MIS ESTUDIOS DE MAESTRÍA.

A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL: DRES. RACHEL MATA ESSAYAG, MARÍA CRISTINA PÉREZ AMADOR, MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS Y RICARDO REYES CHILPA POR SUS IMPORTANTES APORTACIONES Y OBSERVACIONES DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO DE TESIS.

A LOS MIEMBROS DEL JURADO DESIGNADO POR LA REVISIÓN DEL MANUSCRITO DE TESIS Y POR SUS VALIOSOS COMENTARIOS Y OBSERVACIONES.

AL DR. GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO POR SU CONSTANTE INTERÉS, ASESORÍA, AMISTAD Y APOYO EN LA PARTE EXPERIMENTAL FARMACOLÓGICA DE ESTA TESIS.

AL DR. RICARDO REYES CHILPA POR SU VALIOSA AYUDA DURANTE LA DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE ALGUNOS DE LOS BIOENSAYOS DE ESTE TRABAJO Y POR SU VALIOSA ASESORIA ACADÉMICA EN TODO MOMENTO.

AL DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA POR LA REALIZACIÓN DE LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD ESPASMOLÍTICA DE LA ESPECIE VEGETAL DEL PRESENTE TRABAJO

AL DR. MIGUEL ÁNGEL CONTRERAS POR SU APOYO PARA LA REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS HISTOLÓGICAS.

AL DR. FERNANDO CALZADA BERMEJO POR SU APOYO PARA LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTI PARASITARIO DE LA ESPECIE OBJETO DE ESTUDIO.

A LA DRA. MARTHA LIDIA MACÍAS RUBALCAVA, POR SUS VALIOSOS COMENTARIOS DURANTE LA REVISIÓN DEL MANUSCRITO DE TESIS.

A LA M. EN C. ABIGAIL AGUILAR, POR LA IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DEL MATERIAL VEGETAL OBJETO DE ESTE ESTUDIO.

AL PERSONAL TÉCNICO DE LA USAI, EN PARTICULAR A LAS PROFESORAS MARISELA GUTIÉRREZ, GEORGINA DUARTE LISCI, MARGARITA GUZMÁN, ALEJANDRINA ACOSTA HUERTA Y ROSA ISELA DEL VILLAR POR LA DETERMINACIÓN DE LOS ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A LA DRA. MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS, POR SUS VALIOSAS ENSEÑANZAS, SU GUIA, SU PACIENCIA Y TIEMPO DEDICADO, PERO SOBRE TODO POR SU INVALUABLE AMISTAD BRINDADA DURANTE TODOS ESTOS AÑOS QUE HEMOS COLABORADO JUNTOS:GRACIAS.

A LA DRA. ELENA RAMIREZ POR SU APOYO Y AMISTAD DURANTE ESTOS AÑOS

A MIS PADRES; POR SU ENORME APOYO INCONDICIONAL EN TODO MOMENTO

ÍNDICE GENERAL

Índice General.....	A
Índice de Tablas.....	C
Índice de Gráficas.....	D
Índice de Figuras.....	E
Índice de Esquemas.....	F
Resumen.....	I
Abstract.....	III
I.-Introducción.....	1
II.-Antecedentes.....	3
III.- Objetivos e Hipótesis.....	30
IV.-Material y Metodología Experimental.....	32
IV.1.-Búsqueda Bibliográfica.....	32
IV2.-Material y Equipo Utilizado.....	32
IV.3.-Ensayo Previos de Métodos de Extracción.....	33
IV.4.-Determinación de Polifenoles.....	34
IV.5.-Marcha Fitoquímica.....	36
IV.6.-Preparación de Extractos y Fraccionamiento en Gran Escala.....	41
IV.7.-Análisis Químico del Extracto de Acetato de etilo (AcOEt).....	42
IV.8.-Determinación del Efecto Tóxico en el ensayo de <i>Artemia salina</i>	44
IV.9.-Determinación del Efecto Antimicrobiano.....	45
IV.10.-Determinación del Efecto Antiprotozoario.....	46
IV.11.-Determinación del Efecto Espasmolítico.....	48
IV.12.-Determinación del Efecto sobre Transcriptasa Inversa de VIH-1.....	50
IV.13.-Determinación del Efecto Citotóxico sobre líneas celulares cancerosas.....	55
IV.14.-Determinación de la Toxicidad Aguda por vía intraperitoneal (i.p.).....	57
IV.15.-Histopatología.....	58

IV.16.-Perfil Neurofarmacológico.....	60
IV.17.-Determinación de la Toxicidad Aguda por vía oral.....	62
V. Resultados y Discusión.....	63
V.1.-Busqueda Bibliográfica.....	63
V.2.-Ensayos de Métodos de Extracción.....	66
V.3.-Marcha Fitoquímica y Polifenoles.....	66
V.4.-Prueba de Folin.....	68
V.5.-Asilamiento e Identificación del ácido vainílico.....	71
V.6.-Ensayos de Toxicidad en <i>Artemia salina</i>	73
V.7.-Pruebas Antimicrobianas.....	73
V.8.-Efecto Antiprotozoario (Ensayo en placa).....	75
V.9.-Determinación del Efecto Antiprotozoario (Ensayo en Tubo).....	77
V.10.-Determinación del Efecto Espasmolítico.....	79
V.11.-Determinación del Efecto sobre Transcriptasa Inversa de VIH-1.....	80
V.12.-Determinación del Efecto Citotóxico sobre líneas celulares cancerosas.....	81
V.13.-Determinación de la Toxicidad Aguda vía i.p.....	82
V.14.-Pruebas Histopatológicas.....	87
V.15.-Perfil Neurofarmacológico de Irwin.....	97
V.16.-Determinación de la Toxicidad Aguda por vía oral.....	103
VI.-Conclusiones y Perspectivas.....	109
VII.-Bibliografía.....	112
Anexo 1.....	126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunos Géneros de la Familia Acanthaceae.....	4
Tabla 2. Compuestos Químicos aislados en las especies de <i>Justicia</i> en América.....	28
Tabla3. Fraccionamiento Cromatográfico del extracto de Acetato de Etilo.....	43
Tabla 4. Microorganismos utilizados en la Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria(CMI).....	45
Tabla 5. Principales Usos y Formas de usos de <i>Justicia spicigera</i>	63
Tabla6. Marcha Fitoquímica y Determinación.....	67
Tabla 7. Extracto Metanólico (MeOH) obtenido por Maceración.....	68
Tabla 8. Extracto Etanólico (EtOH) obtenidos por Soxhlet.....	69
Tabla 9. Infusión.....	69
Tabla 10. Resultados Finales de la Extracción.....	70
Tabla 11. Constantes Espectroscópicas y Espectrométricas del ácido vainílico.....	72
Tabla 12. Ensayo de Toxicidad en <i>Artemia salina</i>	73
Tabla 13. Efecto Antimicrobiano de <i>Justicia spicigera</i>	74
Tabla 14. Resultados del Efecto contra <i>Entamoeba histolytica</i> a las 24 hrs en el ensayo en placa	75
Tabla 15. Resultados del Efecto contra de <i>Entamoeba histolytica</i> a las 48 hrs en el ensayo en placa.....	75
Tabla 16. Evaluación Antiprotozoaria de Extractos <i>J. spicigera</i>	77
Tabla 17. Evaluación Antiprotozoaria de Fracciones derivadas del Extracto Metanólico de <i>Justicia spicigera</i>	78
Tabla 18. Promedio de Resultados de lectura de Ensayo lenti-RT®.....	80
Tabla 19. Evaluación Citotóxica de <i>Justicia spicigera</i>	81
Tabla 20. Dosis Letal Media (DL ₅₀) y Intervalos confianza.....	83
Tabla 21. Dosis Extrapolada a Humanos (DEH).....	84
Tabla 22. Resultados de la Evaluación de la Toxicidad Aguda por vía oral de <i>Justicia spicigera</i>	103

INDICE DE GRÁFICAS

Grafica 1. Resultados de Inhibición contra <i>Entamoeba histolytica</i> a las 24hrs.....	76
Grafica 2. Resultados de Inhibición contra <i>Entamoeba histolytica</i> a las 48hrs.....	76
Grafica 3. Efecto Relajante de la Infusión y del Extracto Metanólico de <i>Justicia spicigera</i>	79
Grafica 4. Resultados de Inhibición para Ensayo Lenti-RT®.....	80
Grafica 5. Curva de Evaluación de la Letalidad de la Infusión de <i>Justicia spicigera</i>	82
Grafica 6. Curva de Evaluación de la Letalidad del Extracto Metanólico de <i>Justicia spicigera</i>	83
Grafica 7. Comparación de Pesos de Bazos de animales tratados.....	85
Grafica 8. Comparación de Pesos de Hígados de animales tratados.....	85
Grafica 9. Tono Muscular y Prueba de la Cuerda Tirante de animales tratados con Infusión de <i>Justicia spicigera</i>	98
Grafica 10. Prueba del Plano Inclinado de animales tratados con Infusión de <i>Justicia spicigera</i>	99
Grafica 11. Prueba de Catatonía de animales tratados con Infusión de <i>Justicia spicigera</i>	99
Grafica 12. Tono Muscular y prueba de la Cuerda Tirante de animales tratados con Extracto Metanólico de <i>Justicia spicigera</i>	100
Grafica 13. Prueba del Plano Inclinado de animales tratados con Extracto Metanólico de <i>Justicia spicigera</i>	101
Grafica 14. Prueba de Catatonía de animales tratados con Extracto Metanólico de <i>Justicia spicigera</i>	101
Grafica 15. Variaciones de Peso Corporal a las 24hrs de animales tratados con Infusión de <i>Justicia spicigera</i>	104
Grafica 16. Variaciones de Peso Corporal a los 7 días de animales tratados con Infusión de <i>Justicia spicigera</i>	104
Grafica 17. Variaciones de Peso Corporal 14 días de animales tratados con Infusión de <i>Justicia spicigera</i>	105

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Justicia magnifica</i>	3
Figura 2. <i>Justicia procumbrens</i> Linn.....	7
Figura 3. Estructuras de algunos de los principales Compuestos Químicos de Especies del Género <i>Justicia</i> en el mundo	10
Figura 4. <i>Adhatoda vasica</i>	13
Figura 5. Estructuras Químicas de los principales Alcaloides aislados de <i>Adhatoda vasica</i>	14
Figura 6. Ejemplo de Preparados con <i>Adhatoda vasica</i> en el mercado.....	16
Figura 7. <i>Justicia pectoralis</i>	19
Figura 8. <i>Justicia secunda</i>	21
Figura 9. <i>Justicia spicigera</i>	23
Figura 10. Distribución Geográfica de <i>Justicia spicigera</i>	25
Figura 11. Reacción del Ensayo Lenti-RT®.....	50
Figura 12. Diagrama de Inclusión y Corte.....	59
Figura 13. Metodología de Tinción y Montaje.....	60
Figura 14. Comparación por Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	65
Figura 15. Estructura de ácido vainílico.....	71
Figura 16. Esplenomegalia y Hepatomegalia.....	86
Figura 17. Fotomicrografía 20X de Hígado de animal tratado con Extracto Metanólico (MeOH) de <i>Justicia spicigera</i>	87
Figura 18. Fotomicrografía 20X Hígado de animal tratado con Solución Salina Isotónica (SSI).....	87
Figura 19. Fotomicrografía 100X de Hígado de animal tratado con Extracto Metanólico (MeOH) de <i>Justicia spicigera</i>	88
Figura 20. Fotomicrografía 100X de Hígado de animal tratado con Solución Salina Isotónica (SSI).....	88
Figura 21. Fotomicrografía 20X de Bazo de animal tratado con Extracto Metanólico (MeOH) de <i>Justicia spicigera</i>	89

Figura 22. Fotomicrografía 20X de Bazo de animal tratado con Solución Salina Isotónica (SSI).....	89
Figura 23. Fotomicrografía 100X de Bazo de animal tratado con Extracto Metanólico (MeOH) de <i>Justicia spicigera</i>	90
Figura 24. Fotomicrografía 100X de Bazo de animal tratado con Solución Salina Isotónica (SSI).....	90
Figura 25. Fotomicrografía 100X de Hígado de animal tratado con Infusión de <i>Justicia spicigera</i>	91
Figura 26. Fotomicrografía 100X de Hígado de animal tratado con Solución Salina Isotónica (SSI).....	91
Figura 27. Fotomicrografía 20X de Hígado de animal tratado con Infusión de <i>Justicia spicigera</i>	92
Figura 28. Fotomicrografía 10X de Hígado de animal tratado con Solución Salina Isotónica (SSI).....	92
Figura 29. Fotomicrografía 20X de Bazo de animal tratado con Infusión de <i>Justicia spicigera</i>	93
Figura 30. Fotomicrografía 20X de Bazo de animal tratado con Solución Salina Isotónica (SSI).....	93
Figura 31. Fotomicrografía 100X de Bazo de animal tratado con Infusión de <i>Justicia spicigera</i>	94
Figura 32. Fotomicrografía 100X de Bazo de animal tratado con Solución Salina Isotónica (SSI).....	94
Figura 33. Parámetros del Perfil Neurofarmacológico.....	98
Figura 34. Sistema Gastrointestinal y Flora Habitual.....	107
Figura 35. Uniones Estrechas	108

RESUMEN

En el presente trabajo se describen los estudios químicos y farmacológicos realizados en torno a *Justicia spicigera* (Acanthaceae) conocida como “Muitle”, una especie vegetal empleada como medicina tradicional en México. Los estudios incluyeron pruebas de eficacia y seguridad, así como el análisis químico de sus extractos y de la infusión. Los datos obtenidos de la información etnobotánica indicaron que para los preparados medicinales se utilizan las partes aéreas es decir, hojas, flores, tallos en forma de infusión y se recomiendan principalmente contra la disentería, las infecciones de la piel y los riñones, así como para tratar la anemia, (la infusión de color rojiza característica se toma varias veces a lo largo del día).

Dados los usos medicinales de *J. spicigera* contra la disentería, se realizó un monitoreo de potencia antimicrobiana, antiparasitaria, un ensayo espasmolítico, así como un ensayo contra hongos levaduriformes y filamentosos de acuerdo a su uso contra infecciones de la piel y riñones. Como resultados de estos estudios se comprobó que no existe actividad relevante en el caso del monitoreo antimicrobiano como tampoco en el ensayo espasmolítico, no así con el monitoreo antiparasitario en el cual se apreció actividad contra todos los parásitos, y determinada especificidad tanto del extracto como las fracciones contra *Entamoeba histolytica*.

Como pruebas de seguridad se realizaron los siguientes ensayos:

A) La prueba con *Artemia salina* L. la cual indicó una concentración letal media (CL₅₀) de 100 µg/mL para la infusión e inocuo para los extractos.

B) La prueba de toxicidad aguda en ratones CD-1 por vía intraperitoneal y oral tanto para el extracto metanólico como para la infusión. Como resultados, la infusión fue la más sobresaliente con una dosis letal media (DL₅₀) de 63.3 mg/kg

por vía intraperitoneal, y >5g/kg por vía oral. En el caso de la vía intraperitoneal los resultados obtenidos para ambos extractos, fueron complementados con un análisis histopatológico de los principales órganos blanco (observando el mayor efecto toxicológico en hígado y bazo), además de un perfil neurofarmacológico preliminar.

Por otro lado, la literatura científica relativa a esta especie informa que el género *Justicia* (Acanthaceae) es rico en moléculas antivirales y citotóxicas, por lo que se realizó un estudio de inhibición de transcriptasa reversa del VIH-1, observando el mayor efecto inhibitorio del 40% para la infusión de partes aéreas de esta especie, y un ensayo contra 6 líneas tumorales (Cáncer de próstata, pulmón, mama, colon, glía de sistema nervioso central, y leucemia) observando determinada especificidad contra células de leucemia.

En cuanto al análisis químico, se realizó un perfil de grupos de metabolitos secundarios de los extractos hexánico y metanólico, así como de la infusión, el cual demostró la presencia de carbohidratos, aminoácidos y polifenoles (antocianidinas y flavonoides glicosilados) en altas concentraciones, los cuales pueden ser responsables del color rojo de la infusión y tener relación con su uso popular contra la anemia, ya que las antocianidinas y los flavonoides son moléculas atrapadoras de radicales libres. Por otro lado, de una de las fracciones del extracto metanólico se logró aislar ácido vainillínico.

ABSTRACT

The present text describes the project done around *Justicia spicigera* (Acanthaceae) known in the Traditional Medicine of Mexico as "Muitle". These studies included efficacy and security proofs as well as chemical analysis of extracts and infusion. The data obtained from the ethnobotanical information indicated, that for medicinal preparations used aerial parts (stem, flowers, leaves) mainly shaped like infusion recommended mainly for dysentery, infections of the skin and kidneys, as well as treat anemia, (red color infusion of property taken several times throughout the day).

Given the medicinal uses of *J. spicigera* against dysentery we performed a power monitoring antimicrobial, antiparasitic and spasmolytic test as well as a test against yeasts and molds according to their use against infections of the skin and kidneys. As a results, of these studies we found no significant activity in the case of monitoring antimicrobial nor spasmolytic tests but not with parasite monitoring in which activity was observed against all parasites tested, and certain specificity both extract and fractions against *E. histolytica*

As safety test we performed the following tests

A) The test with *Artemia salina* L. which indicated a median lethal concentration (LC₅₀) of 100 µg/mL for infusion and harmless to the extracts.

B) The acute toxicity test in CD-1 mice by intraperitoneal and oral ways for both the methanol extract and the infusion. As a result, the infusion was the most outstanding with a median lethal dose (LD₅₀) of 63.3 mg/kg intraperitoneally, and >5g/kg orally. In the case of intraperitoneal results for both extracts, were supplemented by histopathological analysis of the main target organs (the major

toxicological effect observed in the liver and spleen), and a preliminary neuropharmacological profile.

On the other hand, the scientific literature on this species, reported that the genus *Justicia* (Acanthaceae) is rich in antiviral and cytotoxic molecules, so a study of reverse transcriptase inhibition of HIV-1 was carried out, having the greatest inhibitory effect of 40% for the infusion of aerial parts of this species, and a trial against six tumor cell lines (Cancer of the prostate, lung, breast, colon, central nervous system glia, and leukemia) observing certain specificity against leukemia cells.

As the chemical analysis, it was carried out a profile of groups of secondary metabolites of hexane and methanol extracts as well as infusion, which showed the presence of carbohydrates, amino acids and polyphenols (anthocyanidins and flavonoids glycosylated) at high concentrations, which may be responsible for the red color of the infusion and be related to its popular use for anemia, since flavonoids and anthocyanidins are free radical scavenging molecules. On the other hand, from one of the fractions of the methanol extract vanillinic acid was isolated.

- I.-INTRODUCCIÓN -

Las plantas constituyen un recurso muy valioso dentro de la medicina tradicional de los diferentes países. México no es la excepción, ya que en nuestra medicina popular, la herbolaria goza de una gran tradición debida principalmente a la gran abundancia y biodiversidad de especies vegetales, que tenemos.

Los estudios químicos, etnobotánicos, farmacológicos y bioquímicos de la flora medicinal del país, resultan importantes tanto para la obtención de extractos biológicamente activos, como para la obtención de fármacos novedosos clínicamente útiles para el tratamiento de enfermedades de importancia epidemiológica. Las plantas superiores proveen compuestos que pueden ser modificados químicamente para la elaboración de nuevos principios activos, o para emplearse como modelos o prototipos para producción de fármacos semisintéticos o biotecnológicos. También dichos estudios han proporcionado sustancias que sin tener una aplicación directa en la terapéutica, constituyen herramientas valiosas en investigación. Además, algunos extractos activos de provenientes de plantas, pueden llegar a ser utilizados como componentes de fitomedicamentos, coadyuvantes o nutracéuticos.

En la industria farmacéutica existe una fuerte competencia en la fabricación de medicamentos probablemente debido a la gran cantidad de patentes existentes, secretos industriales, y al incremento de empresas de este sector en el mundo, lo cual provoca un elevado costo en el desarrollo de nuevos fármacos y medicamentos. Es en este contexto la investigación de nuevos productos naturales con moléculas innovadoras que sean de fácil síntesis, formulación y mayor eficacia terapéutica, ha demostrado tener más frutos que la química combinatoria y la química de síntesis racional, tan solo hay que analizar el número de patentes mundiales de productos naturales producidas en los últimos años. (McChesney et al., 2007).

En Latinoamérica la medicina herbolaria es ampliamente utilizada, por lo que las drogas vegetales representan una fuente extremadamente rica para la obtención de extractos activos mediante los cuales se puedan aislar moléculas que puedan ser precursoras de potenciales moléculas bioactivas o futuros fármacos. En este contexto, dentro del género *Justicia* perteneciente a la familia Acanthaceae existen tres especies altamente importantes para la medicina tradicional: *Justicia spicigera*, *Justicia secunda* y *Justicia pectoralis*.

En particular, en nuestro país, *Justicia spicigera* es de ampliamente utilizada en la medicina popular para diferentes patologías, por lo que el presente trabajo pretende generar parámetros de eficacia y seguridad para contribuir al uso racional de esta especie y en su caso al uso de sus extractos para contribuir en su integración a la formulación de un fitomedicamento o nutraceutico.

II.-ANTECEDENTES

Acanthaceae

Las acantáceas (Acanthaceae) son una familia botánica que reúne 256 géneros y unas 2,770 especies de zonas tropicales y subtropicales (Ezcurra, 1993a). Deben su nombre a uno de sus representantes, el acanto, una herbácea altamente empleada en jardinería antigua de zonas templadas, sus hojas inspiraron en la Grecia antigua la decoración del capitel corintio. Se trata fundamentalmente de plantas herbáceas y arbustivas, con hojas opuestas y desprovistas de estípulas. Las flores se agrupan en espigas o racimos con brácteas axilares. Son flores hermafroditas, zigomorfas, tetracíclicas pentámeras. El cáliz está formado por 5 sépalos casi libres; la corola está constituida por 5 pétalos completamente soldados, y es de aspecto bilabiado. Los estambres son 5, de los cuales uno ha quedado reducido a estaminodio estéril. El gineceo, formado por 2 carpelos, constituye un ovario súpero bilocular, con 2 óvulos en cada lóculo y un estilo único con un estigma (Ezcurra, 2002c) en la Figura 1 se puede apreciar a *Justicia magnifica* una especie que ejemplifica bastante esta familia.



Figura 1. *Justicia magnifica*

Algunos de los géneros que constituyen la familia Acanthaceae se presentan en la Tabla 1 (Angiosperm Group, 2003).

Tabla 1. Algunos géneros de la familia Acanthaceae

Géneros de Acanthaceae	
<i>Adhatoda</i>	<i>Satanocrater</i>
<i>Blechum</i>	<i>Gymnophragma</i>
<i>Calophanoides</i>	<i>Tarphochlamys</i>
<i>Ionacanthus</i>	<i>Warpuria</i>
<i>Justicia</i>	<i>Zygoruella</i>

Historia y Taxonomía del Género *Justicia*

El género *Justicia* fue propuesto por Linneo en 1753. Un siglo después Nees, en su "Tratado de las Acanthaceae" a nivel mundial (1847), delimitó el género excluyendo más de 600 especies que se habían descrito bajo el nombre de *Justicia*, reduciéndolo a solo 12 especies de Asia y África. Por otro lado, creó varios géneros nuevos afines a *Justicia* para ubicar un gran número de especies del Nuevo Mundo recientemente descubiertas. Bentham (1876) y Lindau (1893) ampliaron el concepto de *Justicia* de Nees y redujeron a la sinonimia muchos de los géneros creados por este último autor. Actualmente, la mayoría de los autores tratan a *Justicia* en su sentido más amplio siguiendo la propuesta de Graham en 1988. Este concepto amplio ha resultado en estimaciones de 600-700 especies para todo el género en los últimos años (Graham, 1988; McDade, 1982). Análisis moleculares preliminares realizados por Daniel en 1999, indicarían que *Justicia s. lat.* conforma un linaje separado del resto de la tribu *Justicieae*, y que la gran

diversificación morfológica y la alta tasa de especiación en este género, se ha dado concomitantemente con muy poco cambio a nivel molecular en los locus analizados hasta el momento. Siguiendo el concepto de Graham (1988) el género *Justicia* comprende especies caracterizadas por corolas bilabiadas con surco estilar en la parte posterior interna, presencia de 2 estambres exertos bajo el labio posterior, con 2 tecas (raramente 1), ausencia de estaminodios, polen subprolado a perprolado 2- o 3(4)-porado o colporado, y cápsulas 4-seminadas.

El género *Justicia* es uno de los más grandes y complejos dentro de la familia *Acanthaceae* a nivel mundial, y el que presenta el mayor número de especies tropicales en el continente americano (Ezcurra, 2002c). Este género contiene cerca de 600 especies de hierbas y arbustos perennifolios que se han utilizado ampliamente como forrajeras u ornamentales (Graham, 1988). En México se conocen aproximadamente 75 especies (Daniel, 1990), en Colombia 85 (Leonard, 1951-1958), en Ecuador 27 (Jorgensen y Leon-Yanez, 1999), en Perú 50 (Brako y Zarucchi, 1993), y en Argentina 28 (Ezcurra, 1999b). Muchas de sus especies tienen importancia no solo ecológica al ser abundantes en el sotobosque de selvas, bosques húmedos y ser frecuentes en ambientes semiáridos (Ezcurra, 2002c), también tienen importancia etnofarmacológica, pues muchas poblaciones humanas, de las regiones donde habitan las distintas especies de este género las han utilizado, para el tratamiento de diferentes patologías.

Principales especies de *Justicia* estudiadas en el mundo

Las especies del género *Justicia* se han investigado no sólo a nivel farmacológico, sino también a nivel químico. *Justicia procumbrens* (Figura 2) es una de las más estudiadas a la fecha y se localiza principalmente en el sureste de Asia y China, se utiliza como antipirética, para tratar infecciones de las vías respiratorias, para el dolor y para tratar el cáncer, principalmente en China (Day et al., 2002). Se han aislado lignanos como neojusticina-A, neojusticina-B, y taiwanina E así como los justicidanos A, B, C y D (Ohta et al., 1970). La neojusticina-A induce agregación plaquetaria (Chen et al., 1996), mientras que la neojusticina-B presenta actividad antiarrítmica en ratas (Lin et al., 1982). Una de las ramas de investigación mas prometedoras es la antiviral pues se ha encontrado una importante actividad contra el virus de la estomatitis vesicular por parte de los lignanos justicidano A, B, C, y D; justicidinósido A, B, y C así como el apiosdido de difilina aislados de partes aéreas de esta planta (Figura 3). En este estudio, también se descubrió que poseen actividad citotóxica importante en células de pulmón de conejo (Yoshi, 1996).

Por otro lado, en un estudio realizado por Day y colaboradores en el 2002, también se encontró una importante actividad citotóxica, además de efecto sobre la producción de óxido nítrico y factor de necrosis tumoral- α de ratón por parte de los siguientes compuestos aislados de partes aéreas de *J. procumbrens*. : justicidanos C, E, D, A, procumbenósido, tuberculatina, difilina, y secoisolariciresinol (Day et al., 2002). También, se han aislado peonidina 3-glucósido, justicidina-A, y difilina (Fukamiya et al., 1986) los cuales han demostrado tener una potente actividad antiviral contra el virus de la estomatitis vesicular (Asano et al., 1996). Es importante destacar que dadas las actividades anteriormente descritas se puede considerar a los lignanos antes mencionados como potenciales principios activos de futuros fitomedicamentos antivirales.



Figura 2. *Justicia procumbens* Linn.

De las especies europeas que han sido ampliamente estudiadas, entre otras, se encuentra *J. hyssopifolia*, endémica de las Islas Canarias, de la cual han sido aislados dos lignanos denominados J1 y J2 (Trujillo et al., 1990) así como un importante lignano de tipo arilnaftaleno llamado elenósido (Figura 3) que se ha observado que actúa como depresor del sistema nervioso central (Navarro et al., 2004) y además presenta un efecto de inhibición en la motilidad intestinal (Navarro et al., 2006).

De las partes aéreas de la especie endémica de la india *J. prostrata* Schlecht., se han aislado los lignanos arilnaftálicos protalidina A, B y C así como retroquinensina (Ghosal, et al. 1979a), los cuales demostraron actividad antidepressiva en ratones albinos (Ghosal et al., 1980b). Además, los extractos acuoso y alcohólico de sus partes aéreas mostraron actividad antiinflamatoria importante en modelos de inflamación aguda y subaguda (Sammugapriya et al., 2005).

Por otro lado, *J. simplex* D. que crece también en la India, ha demostrado tener actividad hepatoprotectora por parte de los extractos menos polares de las partes aéreas (Singh, 2007). De esta especie se han aislado los lignanos de tipo furofurano simplexolina, sesamolina, sesamina, asarinina, además de β -sitosterol (Ghosal et al., 1979a), los lignanos 3-arilnaftálica, justicina C y E (Sastry et al., 1979), los lignanos furofuranos, justisolina y simplexósido (Ghosal et al., 1980b) y una saponina triterpénica llamada justicisaponina-I, que ha demostrado una fuerte actividad como agente antifertilidad en ratas hembra (Ghosal et al., 1980b). Este efecto es contrario a lo observado para el extracto acuoso de partes aéreas de *J. insularis* T. Anderson en ratas hembra (Telefo et al., 1998).

De otras especies hindúes como *J. gendarussa*, también se ha aislado β -sitosterol y aminas aromáticas, además de presentar un efecto antiartrítico en dos modelos fisiológicos diferentes por parte del extracto etanólico de partes aéreas (Paval, 2009). Otras especies a las que también se les ha encontrado una actividad relevante son: *J. ciliata* V.A.W. Graham de la cual se han aislado lignanos con una potente actividad citotóxica contra diferentes líneas tumorales *in vitro* (Day et al., 2002). La infusión de *J. extensa* T. Anderson presentó alta toxicidad en el ensayo contra el pez *Tilapia nilotica* Linn. (Ibrahim et al., 2000).

Es importante mencionar que en numerosas especies de *Justicia* se ha encontrado diversos lignanos como por ejemplo en el caso de *J. tranquebariensis* de la cual se han aislado los lignanos aritetralina; (+)-lariciresinol, y (+)-medioresinol (Raju et al., 1989) o el caso de *J. glauca* Roth de la cual se han aislado lignanos furanoides como justiciresinol (Subbaraju et al., 1991) y otros lignanos como jusglacucinol (Rajendiran et al., 1991).

Además, en el caso de *J. flava* Vahl. se encontraron los lignanos justicinol helioxantina y (+)-isolariciresinol, así como otros compuestos esteroideos tales como β -sitosterol, estigmasterol y campesterol (Olaniyi, 1980).

Con base en lo antes mencionado es notorio que este género es quimiotaxonómicamente definido y rico en lignanos, responsables de sus propiedades biológicas citotóxicas y antivirales principalmente, por lo que será importante analizar las especies de este género en América en busca de actividades farmacológicas semejantes y metabolitos secundarios con características semejantes (Figura 3).

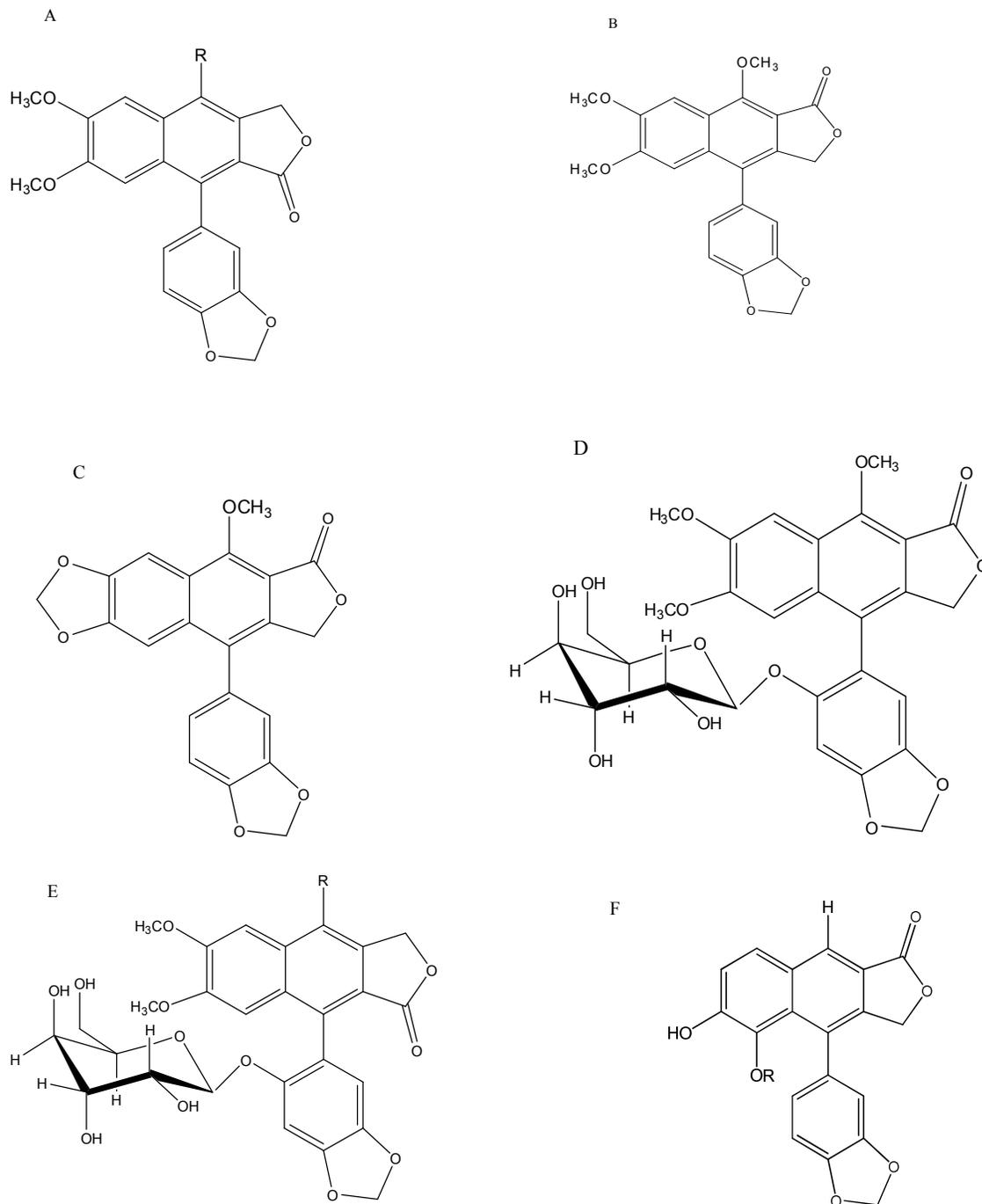


Figura 3.- Ejemplos selectos de compuestos químicos con actividades antivirales y citotóxicas aislados de las principales especies de Justicia en el mundo. A)R = OCH₃-Justicidina A, R = H-Justicidina B, R = OH-Difilina; B)Justicidina C; C)Justicidina D; D)Justicinosido A; E)R = OCH₃-Justicinosido B, R = H-Justicinosido C. F)Elenosido R= glucósido.

El caso de *Adhatoda vasica*

Adhatoda vasica también llamada *Justicia adhatoda* L. (Claeson et al., 2000) es la especie más estudiada y prometedora de este género (Figura 4). Es ampliamente utilizada en el sureste de Asia principalmente en la India en la medicina Unani y Ayurvédica desde hace casi 2000 años (Atal, 1980). Se le conoce como árbol del Malabar en la medicina hindú tradicional (Claeson, et al., 2000) y en sánscrito como Vasaka (WHO, 1990). Debido a sus propiedades farmacológicas tan sobresalientes, se le menciona de forma importante en el manual “*The Use of Traditional Medicine in Primary Health Care*”, editado por la Organización Mundial de la Salud, en el cual se recomienda tanto para jóvenes como para adultos en el tratamiento de la tos, asma, flemas, y hemorroides sangrantes, por largos periodos de tiempo (WHO, 1990).

De esta especie se han aislado: el alcaloide quinazolínico vasicina (Figura 5), tanto en flores, hojas, y raíz (Dymock et al., 1890). En las hojas y la raíz también se han encontrado otros alcaloides, como vasicinona, vasicinol, adhatodina, adhatonina, adhvasinona, anisotina, y peganina; (Huq et al., 1967; Willaman and Li, 1970; Bhat et al., 1978; Atal, 1980; Chowdhury, 1987). En las flores también se han encontrado compuestos importantes como los flavonoides astragalina, camperol y quercetina así como el triterpeno α -amirina (Huq et al., 1967).

Dentro de los numerosos estudios farmacológicos realizados con esta planta, se encuentran: actividad relajante importante sobre músculo liso vascularizado de tráquea de cobayo, inducida por el aceite esencial obtenido de partes aéreas (D’Cruz et al., 1979), actividad hipoglucémica en ratones y conejos por parte del extracto etanólico de partes aéreas (Modak et al., 1966, Dhar et al., 1968), así como actividad antialérgica y antiasmática en cobayo, después de su administración intragástrica por parte del extracto metanólico de toda la planta (Muller et al., 1993).

En cuanto a las actividades antimicrobianas de esta especie, la infusión de partes aéreas, ha demostrado ser activa sobre microflora aislada de pacientes con gingivitis (Patel, 1984). Sin embargo, Naovi y colaboradores, no observaron actividad alguna sobre bacterias gram (+) y gram (-), hongos filamentosos, levaduriformes y nemátodos por parte de un extracto etanólico de hojas (Naovi et al., 1991). También se ha descrito el efecto inhibitorio contra *Mycobacterium tuberculosis* por los extractos acuosos y metanólico de las partes aéreas (Chopra et al., 1955 y Kamilia et al., 2003). Además, es importante destacar, que el extracto etanólico de la raíz, ha presentado actividad antihelmíntica, demostrando que no solo las partes aéreas son responsables de las propiedades medicinales atribuidas a esta especie (Jabbar et al., 2003). Existen además, estudios donde se demostró un importante efecto protector del daño inducido por radiaciones en cromosomas (Kumar et al., 2007).

Uno de los compuestos más prometedores y estudiados de esta especie es el alcaloide vasicina (Figura 5). Este compuesto ha demostrado tener una actividad relevante como broncodilatador tanto *in vivo* como *in vitro* (Atal, 1980). De este compuesto se obtuvo por semisíntesis la bromhexina y su principal metabolito en el hombre el ambroxol, que han demostrado tener una actividad mucolítica significativa (Figura 5). Cabe destacar que actualmente ambos son altamente utilizados en diferentes preparados farmacéuticos (Grange et al., 1996). La vasicina además ha demostrado iniciar contracciones rítmicas en miometrio humano de efecto comparable como la oxitocina y la metergina (Atal, 1980).



Figura 4. *Adhatoda vasica*

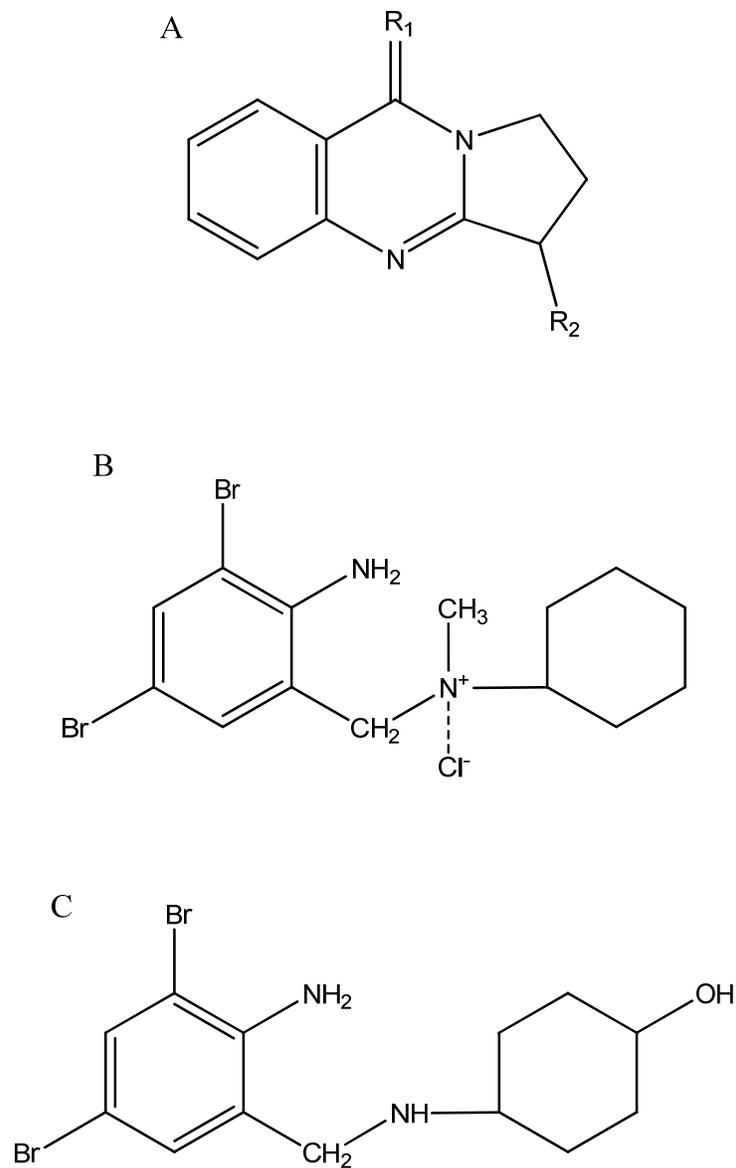


Figura 5. Estructuras químicas de los principales alcaloides aislados de *Adhatoda vasica* A) Vasicina ($R_1=H$, $R_2=OH$) y Vasicinona ($R_1=O$, $R_2=OH$) así como de los derivados semisintéticos obtenidos de estos, B) Bromhexina y C) Ambroxol.

En estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos se ha visto que la vasicina tiene una vida media de 5-7 minutos por administración vía intravenosa y de 1.5-2 horas por vía intramuscular (Zutshi et al., 1980), además se ha visto que en el hígado es metabolizada a vasicinona y otros metabolitos, que son excretados principalmente por la orina (Atal, 1980).

Por otro lado, a pesar de que se han hecho numerosos estudios de toxicidad aguda, así como de otros parámetros referentes también a la toxicidad en general por diferentes vías y tras una administración repetida, con diferentes preparados, extractos, y vasicina pura, una revisión crítica a estos estudios, indica que no existe ningún dato que demuestre algún tipo de peligro (Claeson, 2000), además, en estudios de teratología, abortivos y de reproducción tanto clínicos como preclínicos, tanto para la vasicina como para los extractos de *A. vasica*, no reportan ningún dato suficientemente concluyente de que ésta o sus metabolitos induzcan efectos abortivos, embriotoxicidad o fetotoxicidad, por el contrario, en estudios elaborados con ratas y ratones durante la gestación se vio que estos no interfieren con el embarazo, (Hancke y Burgos, 1993; Burgos y Hancke, 1994; Burgos y Hancke, 1995). Finalmente, en tres estudios clínicos con cerca de 130 pacientes, con diferentes preparados que contenían *A. vasica* como el Kang Jang o el Himalaya (Figura 6), no se detectó ningún tipo de efecto adverso (Shete, 1993; Iyengar, 1994; Thom y Wollan, 1997).



Figura 6. Ejemplo de Preparados con *Adhatoda vasica* en el mercado

Actividad farmacológica de las especies de *Justicia* más utilizadas en América

Aunque el género *Justicia* está representado en América por aproximadamente 200 especies, una revisión de la literatura científica indicó que únicamente 3 de ellas cuentan con estudios farmacológicos y químicos serios a saber: *Justicia spicigera*, *Justicia pectoralis* y *Justicia secunda*.

Justicia pectoralis

Justicia pectoralis Jacq. es una especie nativa de los trópicos de América, se encuentra tanto en las Antillas como en la zona continental de Sudamérica (Figura 7). En Cuba es conocida como “tilo o tila, carpintero o té criollo” y en Brasil es conocida como “chambá” su uso etnomédico más común es como sedante, aunque también ha sido utilizada como "pectoral" es decir expectorante. Lino y colaboradores en 1997 demostraron que la presencia de cumarina y umbeliferona (Tabla 2) en *J. pectoralis* es responsable de las propiedades antiinflamatorias y analgésicas que popularmente se le atribuyen en diferentes regiones del Caribe y Centroamérica. Existen otros trabajos en los que se evalúa genotoxicidad a través de la prueba de Ames para mutación génica y el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón, en donde se demostró su inocuidad y potencialidad para utilizarla como materia prima de un fitomedicamento. El uso de esta especie es importante sobre todo en Brasil; Martins y colaboradores mencionan que se utiliza ampliamente en diversas comunidades densamente pobladas de Río de Janeiro (Martins et al., 2005) como antipirética y analgésica.

En un estudio etnobotánico en Trinidad y Tobago se observó que se utilizaba contra problemas de la próstata, para el tratamiento de infecciones de vías respiratorias y aliviar la tos (Mills, et al., 1986). Recientemente se ha encontrado actividad broncodilatadora por parte de los extractos alcohólicos en cobayos (Leal et al., 2000). Por otra parte, los extractos alcohólicos de esta planta han mostrado actividad insecticida contra la larva del mosquito transmisor del dengue *Aedes aegypti*. Finalmente, cabe destacar que *J. pectoralis* es el componente principal de un preparado alucinógeno de algunas tribus indígenas de Sudamérica, sin embargo, no existen estudios sobre estos aspectos a la fecha (MacRae et al., 1984, de Smet et al., 1985).

Química de *Justicia pectoralis*

Esta especie americana es la más estudiada, químicamente hablando. En un análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas se encontraron principalmente cumarinas, dihidrocumarinas y umbeliferona (de Vries et al., 1988). También se aisló el Justicidiano B al cual posteriormente se le demostró actividad citotóxica y una glicosilflavona. En otro estudio realizado por Lino y colaboradores en 1997, se analizó el efecto del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas así como de sus constituyentes (cumarina y umbeliferona), sobre el modelo de edema en pata de rata inducido por carragenina, observando que tanto el extracto como los dos compuestos producían efectos antinociceptivos, (probablemente actuando sobre el sistema de óxido nítrico) y además que la cumarina disminuía significativamente el volumen del edema (Lino et al., 1997) demostrando con esto su posible actividad analgésica y antiinflamatoria.

Por otro lado, en uno de los estudios fitoquímicos más completos sobre esta planta realizado por Olveira y colaboradores en el 2000, en el cual se analizó el extracto metanólico de las hojas (parte utilizada popularmente), se aislaron las cumarinas 1,2-benzopirona y umbeliferona, así como los flavonoides quercetina, camperol y el esteroil estigmasterol (Tabla 2) sugiriendo que las propiedades biológicas de esta planta se deben a la presencia de dichos compuestos (Olveira et al., 2000). Recientemente se ha propuesto un método cromatográfico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), para cuantificar cumarinas en extractos secos de *J. pectoralis* para un posible control de calidad o prueba farmacopéica y además se ha propuesto la obtención de materia prima de calidad farmacéutica a partir de un extracto hidroalcohólico al 30% mediante secado por aspersión (Rodríguez-Chanfrau et al., 2008).

Con base en lo anterior es claro que las cumarinas son probablemente los principios activos más importantes de *J. pectoralis*, pues además de los estudios previamente reseñados (Lino et al., 1997) las mismas cumarinas pero aisladas de

otras especies, han demostrado actividad anticancerígena, antiedema, y moduladora de la inflamación (Yarnell, 2009).



Figura 7. *Justicia pectoralis* "Chamba"

Justicia secunda

Justicia secunda es una planta de la familia *Acanthaceae* distribuida ampliamente en América central y el norte de Sudamérica utilizada en medicina tradicional para el tratamiento de cálculos renales principalmente (Figura 8). En Venezuela donde se le conoce como "Sanguinaria" es empleada como antipirética (Herrera-Mata *et al.*, 2002). En Colombia por otra parte es utilizada para trastornos glicemicos y diferentes tipos de patologías infecciosas (Rojas *et al.*, 2006).

En Trinidad y Tobago se utiliza para aliviar diferentes patologías dérmicas y dolores inespecíficos durante la menstruación (Lans, 2007); también se le adjudica un uso etnoveterinario para el tratamiento diferentes problemas como

lastimaduras, mordeduras de serpiente y problemas disentéricos en perros de caza (Lans et al., 2001).

Dentro de los estudios farmacológicos que se han realizado sobre la eficacia de esta especie se encuentran estudios toxicológicos con *Artemia franciscana*, por parte del extracto acuoso ($CL_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$), el extracto metanólico ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$) así como del extracto de diclorometano ($CL_{50} = 42.23 \mu\text{g/mL}$) de las partes aéreas (Cantillo et al., 2007). También se realizó el estudio toxicológico con *Artemia salina* probando únicamente con el extracto acuoso ($CL_{50} = 37.93 \mu\text{g/mL}$) (Herrera-Mata et al., 2002). En un estudio de actividad antimicrobiana se probó que el extracto metanólico de partes aéreas tiene actividad contra *E. coli* y *C. albicans* con una CMI = $0.6 \mu\text{g/mL}$ para ambos microorganismos (Herrera-Mata et al., 2001). Por otro lado, en un estudio bioprospectivo de 11 plantas de Panamá en las que destaca *J. secunda* se probó la citotoxicidad de los extractos de diclorometano y metanólico de hojas, raíz, tallo, contra 3 líneas celulares cancerosas, MCF-7 (cáncer de mama), H460 (carcinoma de pulmón), SF-268 (carcinoma de SNC), resultando la actividad más relevante en el extracto de diclorometano de raíz con un $IC_{50} = 47 \mu\text{g/mL}$ (MCF-7), $40 \mu\text{g/mL}$ (H460), $42 \mu\text{g/mL}$ (SF-268) (Calderón et al., 2003).

Química de *Justicia secunda*

Posee pigmentos rojizos y azules que se obtienen de extractos acuosos y alcohólicos que son utilizados en algunos productos farmacéuticos y estéticos (Cantillo, 2007); dentro de los pocos compuestos aislados de esta planta se ha obtenido la 4,6-difenil-2-pirimidinilamina, además se han aislado de diferentes fracciones ácidos carboxílicos y eicosanoicos, y como componente de las principales fracciones activas, taraxasterol, esqualeno (Tabla 2), así como ácido 11-hexadecanoico (Herrera-Mata et al., 2002).



Figura 8. *Justicia secunda* "Sanguinaria"

Justicia reptans

Únicamente existe un estudio bioprospectivo sobre esta especie realizado en Guatemala en donde se distribuye ampliamente y es endémica (Alcami, et al. 2008). Dicho estudio se basó en la relación filogenética de esta especie con otras especies de *Justicia* asiáticas en las que se ha encontrado una importante actividad antiviral contra VIH-1 (Asano et al., 1996). El estudio fue realizado con dos modelos, el ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y el ensayo de virus recombinantes. Se probaron el extracto etanólico de partes aéreas, así como sus fracciones. Los efectos antivirales más sobresalientes fueron los correspondientes al extracto etanólico en el ensayo del MTT con una $IC_{50} = 34.6 \mu\text{g/mL}$ y en el ensayo de virus recombinantes con una $IC_{50} = 41.3 \mu\text{g/mL}$. Dichas propiedades fueron atribuidas a los flavonoides contenidos en esta especie, que sin embargo no se aislaron en dicho estudio (Alcami, 2008).

Justicia spicigera

-Botánica-

Justicia spicigera corresponde a la especie en estudio, también pertenece a la familia Acanthaceae (Figura 9) (Ezcurra, 2002c). Es de distribución pantropical, (Graham, 1988); es un arbusto que mide entre 1 y 2 metros de altura, con hojas color verde oscuro y flores tubulares de color rojo o naranja, se caracteriza por sus hojas ovales de color verde oscuro, con las nervaduras bien marcadas, y con inflorescencias tubulares de color naranja o rojo, principalmente en verano (Angiosperm Group, 2003).

Sinonimias: *Justicia atramentaria*, *Drejera willdenowiana*, *Sericographis mohintli*, *Jacobiana scarlatina*, *Jacobiana spicigera*, *Justicia mohintli*.



Figura 9. *Justicia spicigera* "Muitle"

-Distribución Geográfica-

Esta especie se distribuye en el centro y sur de México principalmente en los estados de Chiapas, Nayarit, Puebla, Estado de México, San Luis Potosí, Hidalgo, Morelos y Tlaxcala (Martínez, 1989), y en Guatemala y Centroamérica (Figura 10). *Justicia spicigera* se encuentra presente en climas cálidos, semicálidos, secos y templados, desde el nivel del mar hasta los 3000 metros, crece como ruderal y en bosque de encino, pino, pino-encino y otras latifoliadas. En México es conocida generalmente como “Muitle”, aunque también recibe otros nombres como; limalin (Oaxaca), hierba azul (Veracruz), charaitzicua (tarasco), mohutli (nahuatl), yich-kaan (maya), micle (Guerrero y Durango), etcétera. Se cultiva con fines de uso medicinal y comercial principalmente en Durango, Guerrero, Michoacán, Oaxaca, Estado de México, Veracruz, Morelos, Puebla, Hidalgo, San Luis Potosí, Tlaxcala, Chiapas, así como en Guatemala y Belice, es común en huertos familiares no recibe ningún tipo de manejo especial en su cultivo. Se comercializa en fresco y seco en mercados públicos.

En la medicina tradicional la infusión (color rojiza característica) de las ramas y las hojas de *Justicia spicigera*, se utiliza contra la diarrea, la disentería (que abarca problemas microbianos, parasitarios y efectos sobre la motilidad intestinal), estimulante para aliviar trastornos mentales y del sueño (Macotela, 1994), antipirético, antiespasmódico, antiinflamatorio y antihipertensivo (Meckes, 2004) recomendándose de manera general una taza de infusión por tres días en ayunas. El preparado de infusión de flores y hojas, se aplica como emenagogo y desinfectante de la piel, para jotes verrugas, y para controlar la anemia (FHEUM, 2001). Como “agua de día” se utiliza para limpiar la sangre, para tratar infecciones de riñones y males generalizados de la circulación (Martínez, 1989; Hernández, 1790). En Guatemala es utilizada en la medicina tradicional para tratar infecciones como erisipela, leucorrea y pielonefritis causadas por bacterias y levaduras (Cáceres et al., 1987).



Figura 10. Distribución geográfica de *Justicia spicigera* (indicada en un recuadro)

Principales estudios de *Justicia spicigera*

- Efecto antimicrobiano: En un estudio realizado por Cáceres en 1987, no se encontró actividad alguna del extracto metanólico de partes aéreas contra *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, en un estudio realizado por García y colaboradores en 1991 en México, se encontró actividad inhibitoria contra *S. aureus* y *Bacillus subtilis* de un extracto metanólico de partes aéreas (García et al., 1991). Estos estudios muestran resultados opuestos para *S. aureus*, lo cual puede ser debido a las diferentes condiciones ambientales de las diferentes regiones geográficas en la que los especímenes fueron recolectados (Guatemala y del centro de México).

- Efecto antiparasitario: Se ha encontrado en estudios de mortalidad contra trofozoítos de *Giardia duodenalis* que el extracto etanólico de partes aéreas de *J. spicigera* produce un porcentaje de inhibición del crecimiento de $91 \pm 0.5\%$ (Macotela, 1994), y que además puede inducir cambios en la morfología de dicho microorganismo (Macotela, 2001). Adicionalmente, se demostró que el extracto metanólico tiene actividad contra trofozoítos de *Giardia lamblia* con una $IC_{50} = 117.4 \mu\text{g/mL}$ (Peraza-Sánchez et al., 2005). También existe un estudio

bioprospectivo contra el parásito *Leishmania mexicana*; en este caso el extracto metanólico de partes aéreas presentó una $IC_{50} = 513 \mu\text{g/mL}$ (Peraza-Sánchez et al., 2007).

-Efectos citotóxicos: En un análisis del efecto tanto el extracto como de la infusión de partes aéreas de *Justicia spicigera*, en diferentes células hematopoyéticas (células leucémicas humanas, células progenitoras y de médula ósea de ratón), se observó que ambos indujeron apoptosis en células progenitoras y de leucemia, además la infusión provocó apoptosis en células de médula ósea de ratón, sugiriendo que esta especie posee compuestos citotóxicos (Cáceres-Cortes et al., 2000).

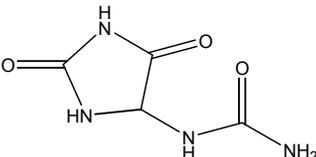
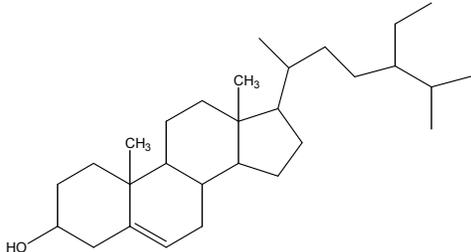
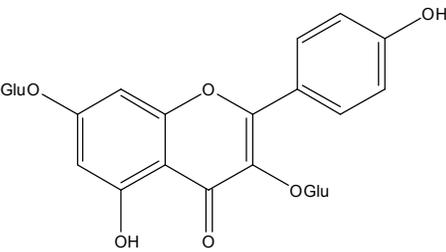
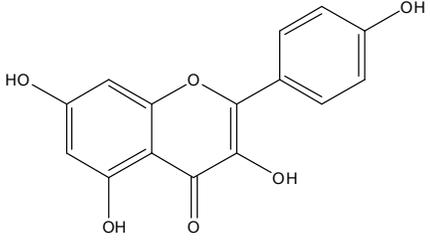
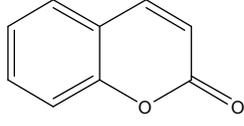
-Otros efectos: *Justicia spicigera* también se utiliza en el tratamiento de la anemia posiblemente por el color rojizo característico de la infusión y su contenido en antioxidantes. Cabe destacar que se han encontrado gran cantidad de polifenoles, por lo que se realizó un estudio de la actividad antioxidante del extracto metanólico de partes aéreas, el cual demostró una $IC_{50} = 48.9 \mu\text{g/mL}$ como agente neutralizante de especies reactivas de oxígeno (Sepúlveda-Jimenez, 2009).

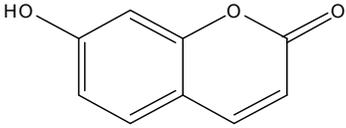
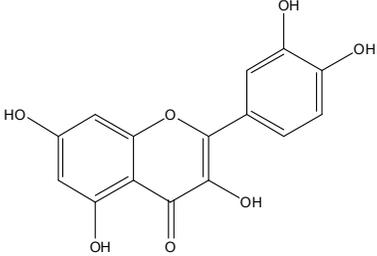
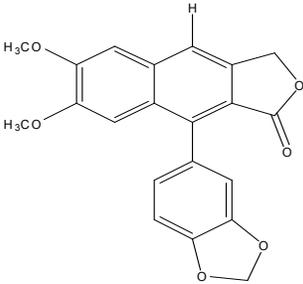
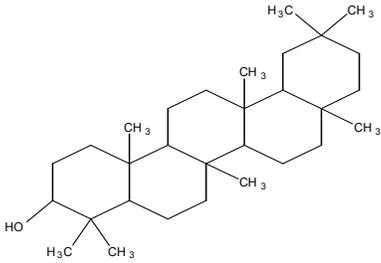
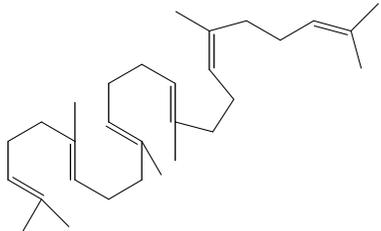
En un estudio bioprospectivo de actividad antiinflamatoria se encontró que los extractos hexánico y clorofórmico producían mortalidad en el ensayo de edema de pata de rata inducido por carragenina. El extracto etanólico produjo $39.0 \pm 2.6 \%$ y $40.3 \pm 4.8 \%$ de inhibición del edema en la primera y segunda fase del modelo respectivamente (Meckes et al., 2004). Cabe destacar existen varios estudios sobre sus propiedades farmacológicas para justificar sus usos etnomedicinales, sin embargo, dichos estudios no son lo suficientemente concluyentes hasta este momento (2010).

Química de *Justicia spicigera*

Se conoce muy poco acerca del contenido metabólico de *J. spicigera*, Euler y Alam aislaron en 1982 el flavonoide camferitrina; por otro lado Domínguez y colaboradores aislaron en 1990 el glucósido de 3- β -*o*-sitosterol, alantoína y criptoxantina (Tabla 2). En el estudio más completo realizado sobre esta planta a la fecha Sepúlveda-Jimenez y colaboradores en 2009 encontraron que el contenido total de polifenoles en extractos metanólicos y acuosos era de 1.33 a 5.01g equivalentes de ácido gálico/100g de planta, de los cuales los flavonoides representaban 0.18 y 1.3g equivalente de catequina/100g de planta, las hojas y el tallo fueron los órganos que mayor cantidad de flavonoides presentaron (Sepúlveda-Jiménez, 2009). A ninguno de los metabolitos aislados en esta especie hasta la fecha (2010) se le puede adjudicar alguna de las múltiples actividades terapéuticas de esta especie, sin embargo, la presencia de grandes concentraciones de polifenoles como flavonoides pueden participar en las actividades antioxidantes atribuidas en algunas enfermedades para las que se utiliza popularmente esta especie.

Tabla 2. Compuestos químicos aislados de las especies más estudiadas de *Justicia* en América

<i>Justicia spicigera</i>		Alantoina	Domínguez et al., 1990
		β -sitosterol	Domínguez et al., 1990
		Camferitrina	Alam et al., 1982
<i>Justicia pectoralis</i>		camperol	Olveira et al., 2000
		cumarina	de Vries. et al., 1988 Olveira et al., 2000

		<p>Umbeliferona</p>	<p>de Vries. et al., 1988 Oliveira et al., 2000,</p>
		<p>Quercetina</p>	<p>Oliveira et al., 2000</p>
		<p>Justicidiano B</p>	<p>Joseph et al., 1988</p>
<p>Justicia secunda</p>		<p>Taraxerol</p>	<p>Herrera-Mata et al., 2001</p>
		<p>Escualeno</p>	<p>Herrera-Mata et al., 2001</p>

III- OBJETIVOS e HIPÓTESIS

- Objetivos -

- General :

Determinar los efectos antimicrobianos, antiespasmódicos, antiparasitarios citotóxicos y antivirales, de los extractos orgánicos de *Justicia spicigera*, para establecer parámetros de eficacia de esta especie, aislar en lo posible las moléculas bioactivas responsables de dichas actividades y establecer parámetros preliminares de seguridad dado su uso recurrente.

- Particulares :

Establecer un perfil metabólico previo empleando la marcha fitoquímica para identificar núcleos de metabolitos secundarios importantes en los diferentes extractos e infusión trabajados.

Establecer la metodología adecuada para efectuar el aislamiento y caracterización de los compuestos químicos activos que se encuentren en *Justicia spicigera*.

Realizar la elucidación estructural de los mismos mediante técnicas espectroscópicas, espectrométricas, quiroópticas y cristalográficas.

Efectuar las evaluaciones de toxicidad y las pruebas antimicrobianas, antidisentéricas y antivirales, tanto en extractos como en fracciones y compuestos puros obtenidos durante el proceso de aislamiento.

- Hipótesis -

“Al existir un uso recurrente de *Justicia spicigera* en la Medicina Tradicional Mexicana para diversos padecimientos, entre los que destacan las afecciones gastrointestinales, y además relación quimiotaxonómica con otras especies vegetales que contienen metabolitos secundarios con actividades citotóxicas y antivirales comprobadas, entonces, deberán existir en los diferentes extractos provenientes de esta especie sustancias bioactivas con efectos antiespasmódicos, antimicrobianos, antiparasitarios, citotóxicos y antivirales que se manifestaran en los modelos biológicos pertinentes”.

IV. MATERIAL Y METODOLOGIA EXPERIMENTAL

IV.1 Búsqueda bibliográfica y obtención del material vegetal

La búsqueda bibliográfica se realizó en las bibliotecas digitales científicas Scopus, ScienceDirect, Bi-Di UNAM, TesiUNAM, MOBOT, Science Finder y en textos especializados en el tema (FHEUM, 2001; Márquez, 1999; Martínez, 1989).

El material biológico se adquirió con 3 diferentes proveedores (Proveedor de Yervas S.A. de C.V Colonia Merced, D. F. Puesto 12 Mercado Merced, D. F. Plantas Medicinales S.A. de C.V. Pasaje de la Catedral, D. F.); estos especímenes fueron comparados con un perfil cromatográfico en capa fina monodimensional con uno silvestre comprado en el puesto 13 del mercado de Nativitas, Xochimilco, e identificado en el herbario del IMSS por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras como *Justicia spicigera* (numero de voucher: 15, 532).

IV.2 Material y Equipo utilizado

Los análisis por cromatografía en capa fina se llevaron acabo en cromatofolios Alugram Sil G/UV₂₅₄ Macherey -Nagel Duren. Como reveladores cromatográficos se emplearon una lámpara de luz UV Spectroline modelo ENF240c de longitud de onda a 254 y 365 nm así como solución de sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_2\text{H}_2\text{O}]$ y vainillina al 1% en H₂SO₄ al 5% .

Para las cromatografías en columna abierta se utilizó como fase estacionaria gel de sílice 60 (malla 0.063-0.200 nm) Merck. Las cromatografías preparativas se realizaron en placas Merck de 1 mm de grosor y una superficie de 20 x 20 cm

Los espectros en el UV se determinaron en un espectrofotómetro Perkin–Elmer. Lambda 2

Los espectros en el IR se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer. Spectrum RX 1 FTIR.

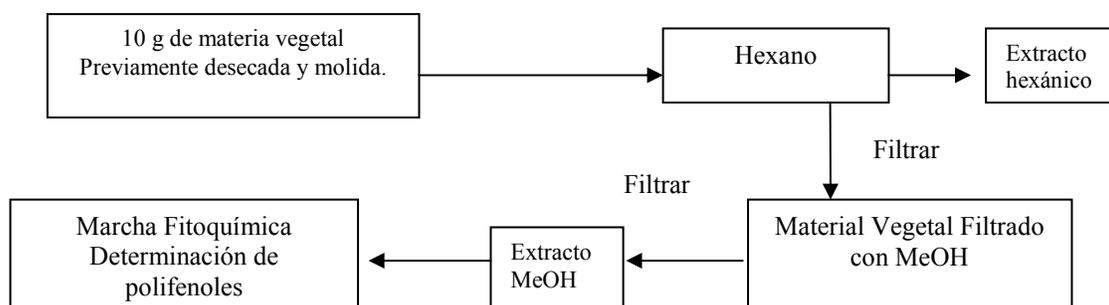
Los espectros de RMN se determinaron a 300 o 500 MHz para el caso de ^1H a 75.5, 200 y 300 MHz para el caso de ^{13}C . Para esto se utilizaron los espectrómetros de alta resolución Varian Unity Inova 300 y Varian Unity Inova 500, dependiendo del caso. Como disolventes se emplearon CDCl_3 , CD_3OD , DMSO y como referencia TMS.

Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro marca Thermo-Electron, modelo DFS (Double Focus Sector), utilizando la técnica de ionización por impacto electrónico.

IV.3 Ensayos previos de métodos de extracción

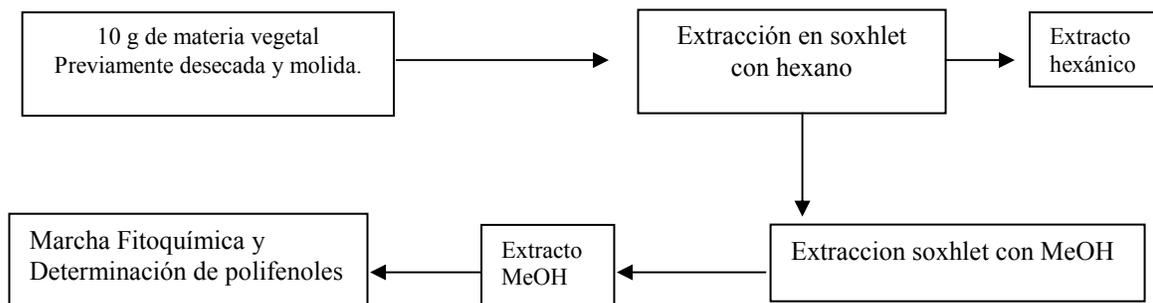
Se emplearon dos métodos para determinar cuál era el óptimo para la extracción, cada uno con 10 g de partes aéreas recolectadas, secas y molidas; se prepararon los extractos hexánico y de MeOH así como la infusión.

- a) Por el método de maceración continua durante ~72 horas (300 mL) cada uno de los disolventes (Esquema 1).



Esquema 1. Proceso de obtención de los extractos en pequeña escala vía maceración *J. spicigera*.

- b) La técnica de Jaiswal (1980), consistente en extracción con hexano (300 mL) seguida de una extracción con EtOH ambas mediante aparato de Soxhlet, por 72 horas cada uno (Esquema 2).



Esquema 2. Proceso de obtención de los extractos en pequeña escala vía soxhlet *J. spicigera*.

- c) Con base en los usos etnofarmacológicos de esta planta se preparó la infusión de partes aéreas (10 g), con 100 mL de agua destilada y el producto de extracción se llevo a sequedad por destilación.

PRUEBAS FITOQUIMICAS

IV.4 Determinación de Polifenoles Totales por el Método de Folin-Ciocalteu

(Barrow, 2006)

1.- Reactivos empleados:

- Folin-Ciocalteu (Catálogo Sigma #F-9252, 500 mL). Diluido en H₂O destilada (1:1)
- Carbonato de Sodio Anhidrido (Sigma, S-6139, 500 g)
- Ácido gálico

2.- Instrumento:

Placa de 96 pozos y un lector marca Benchmark Biorad

3.- Preparación de la Solución Estándar:

3.1.- Pesar 25 mg de ácido gálico y aforar a 25 mL con agua destilada (1000 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico).

3.2.- Realizar las diluciones necesarias para llegar a las concentraciones de: 100 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ y 12.5 $\mu\text{g/mL}$ del estándar para trazar la curva patrón y determinar las concentraciones de los extractos.

3.3.-Diluir los extractos en el disolvente en el cual sean solubles para alcanzar una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ y realizar las diluciones 1:5 y 1:10 para poder determinar las lecturas.

4.- Metodología empleada:

A) Colocar en cada pozo 20 μL de extracto a estudiar (tanto sus diluciones como el extracto original) y las diluciones correspondientes a la curva patrón. Como blanco se utiliza agua destilada. Cada ensayo y cada concentración de la curva patrón se realizan por triplicado. El blanco de reactivo representa 20 μL de agua destilada como muestra y se trata igual que los demás.

B) Añadir 100 μL del reactivo diluido de Folin-Ciocalteu a cada pozo.

C) Agregar 80 μL de una solución al 7.5% de Na_2CO_3 .

D) Incubar a temperatura ambiente por dos horas y media en obscuridad.

E) Leer a 720 nm.

5.- Tratamiento de datos:

a) Obtener la ecuación de la curva patrón.

- b) A la lectura de los ensayos del extracto restar el promedio de lectura del blanco de reactivo.
- c) La absorbencia obtenida en cada caso se sustituye en la ecuación de la curva patrón para obtener concentraciones de ácido gálico y se multiplica por 100%.
- d) Se reporta en porciento de equivalentes de ácido gálico (%EAG).

IV.5 Marcha Fitoquímica (Arteaga, 2007)

-Determinación del color y olor característicos, así como del pH de los extractos obtenidos en los puntos IV.3.A, IV.3.B y IV.3.C mismos con los que se trabajara durante toda la marcha.

-Diluir los extractos obtenidos en los puntos IV.3.A, IV.3.B y IV.3.C en el disolvente en el cual sean solubles a ~1000 µg/mL para emplearlos a lo largo de la marcha.

A) Determinación de la presencia de saponinas :

Se tomó 1 mL de cada uno de los extractos mencionados en el punto IV.3 en tubos de ensayo separados, se añadieron 9 mL de agua a cada uno. A partir de estas soluciones se tomo 1 mL y se colocó en un tubo de ensayo pequeño, se agito vigorosamente por 30 segundos y se dejó en reposo durante aproximadamente 15 minutos. Partiendo de que las saponinas tienen su efecto detergente y tienden a un acomodo de menor energía espacial se mide la altura de la espuma generada con una regla:

La interpretación se realizó con base en lo siguiente.- menos de 5 mm no se detectan saponinas, de 5-9 mm contenido bajo de saponinas, de 10-14 mm contenido moderado de saponinas, mayor de 15 mm contenido alto de saponinas

B) Presencia de polifenoles en general :

Colocar 0.5 mL de cada uno de los extractos respectivos en un tubo de ensayo (como control negativo se pone agua destilada), posteriormente se les agregaron 5 gotas del reactivo de Folin y 2 gotas de Na_2CO_3 al 7.5%.

La interpretación fue con base en lo siguiente.-

Coloración amarilla: indica que no existen fenoles de ningún tipo

Coloración verdosa: indicativo de fenoles en baja cantidad

Coloración azul clara: indicativo de fenoles en cantidad moderada

Coloración azul intensa: indicativo de fenoles en altas cantidades

C) Determinación de la presencia de taninos (hidrolizables y condensados):

Hidrolizables: Se agregaron 0.5 mL de cada uno de los extractos en un tubo de ensayo mas 0.5 mL de EtOH, posteriormente se añaden unos miligramos de nitrito de sodio y unas gotas de acido acético.

Un cambio de color rosado en la solución inicial a café , se considera reacción positiva para taninos hidrolizables.

Condensados: A 2 mL de los extractos respectivos se les añadió butanol, se agitaron y se separó la capa orgánica (superior), a la cual se le añadieron 0.5 mL de HCl concentrado y se calentó suavemente con un mechero.

Una coloración inicial rojiza es indicativa de taninos condensados o proantocianidinas, y al agregar NaHCO_3 al 20% se torna azul.

D) Determinación de la presencia de flavonoides :

Prueba de Shinoda;

A 1 mL del extracto respectivo se agregaron 0.5 g de limadura de Mg y gota a gota HCl concentrado hasta que termine el desprendimiento de hidrogeno.

La interpretación se basó en los cambios de color producidos durante los siguientes 10 minutos al término del desprendimiento de hidrogeno:

Coloración amarilla a roja, presencia de flavonas y flavonoles.

Coloración rojo a magenta, presencia de flavanones

Coloración rojo, magenta, violeta y azul, presencia de flavanonas

Sin coloración, isoflavonas, chalconas y auronas.

E) Determinación de la presencia de fenilpropanoides:

Se colocó 1 mL del extracto respectivo en un tubo de ensaye y se le añadieron 2 mL del HCl 0.5 N, 2 mL de nitrito de sodio al 10% (reactivo de Arnow) y finalmente se le añadió NaOH 2 N

La interpretación se realizó con base en que el reactivo de Arnow en presencia de fenilpropanoides, presenta coloración naranja y después de la adición de sosa se genera un rosado purpura.

F) Determinación de antraquinonas:

Reacción de Bornträger:

Se colocaron 0.20 g de la planta y se añadieron 5 mL de cloroformo, se agitó durante 5 minutos y se dejó en reposo durante 15 minutos más. Se filtró y se dividió en dos tubos. Al primero se le añadió 1 mL de NaOH al 5% en agua y al segundo tubo se le agregó acetato de magnesio al 0.5 % en MeOH (presencia de antraquinonas libres).

Una coloración rojiza en la fase acuosa (1er tubo) y coloración roja para el 2º tubo se interpretan como reacciones positivas.

G) Determinación de la presencia de Terpenos/Esteroides:

Reacción de Lieberman-Burchard:

Se colocó 1 mL del extracto respectivo en una placa excavada de vidrio y se adicionaron 3-4 gotas de cloroformo; en otro pozo se agregó agua destilada como

testigo. A ambos pozos se les añadió gotas de anhídrido acético seguido de ácido sulfúrico concentrado.

La interpretación se basó en los cambios de color:

Azul o verde, presuntivo de esteroides

Rojo, rosado o violeta, presuntivo de esteroides

Amarillo pálido, presuntivo de esteroides o triterpenoides saturados

H) Determinación de la presencia de carotenoides/esteroides:

Se agregaron 0.5 mL de cada uno de los extractos en tubos de ensayo y se mezclaron con cloroformo y con sumo cuidado se añadió 1mL de ácido sulfúrico concentrado.

La interpretación se basó en la formación de colores amarillo y rojo que significaron prueba positiva de esteroides y si se observan en la interfase colores rojo y azul se considerados positivos para la presencia de carotenoides.

I) Determinación de la presencia de iridoides:

Se colocaron 0.5 mL de cada extracto en un tubo de ensayo y en otro solamente agua destilada; se les agregaron a cada uno 3 mL de vainillina en H_2SO_4 y 1.5 mL de HCl concentrado y se dejaron reaccionar protegidos de la luz durante aproximadamente dos horas.

La interpretación se basa en que la presencia positiva de iridoides produce una coloración azul.

J) Determinación de la presencia de alcaloides:

Los extractos bajo estudio se eluyeron en una placa analítica de silica gel en los sistemas en los que mejor resolución presentaron sus contenidos metabólicos y se revelaron con el reactivo de Dragendorff.

La interpretación se basó en que la presencia de manchas rojo o naranja indican la presencia de alcaloides.

K) Determinación de la presencia de cumarinas :

Se colocaron 2 mL de cada extracto en tubos de ensayo, se taparon con papel impregnado de solución diluida de NaOH y se llevaron a baño de agua caliente por unos 10 minutos.

Si al remover el papel filtro y examinarlo al UV se observa una coloración amarilla indica la presencia de cumarinas.

L) Determinación de antocianidinas:

Ensayo de Rosenheim:

Solubilizar el extracto ~100 mg en H₂O (10 mL) del extracto en cuestión, tomar 1.0 mL de dicha disolución en un tubo de ensayo limpio. Añadir 0.5 mL de HCl concentrado y mezclar durante 5 minutos. Calentar 10 minutos dicha mezcla. Enfriar y pasar a otro tubo de ensayo, añadir 0.4 mL de alcohol amílico y agitar suavemente.

Interpretación de resultados.-

Será prueba positiva si aparece una coloración en la fase amílica que vaya de carmesí oscuro al rosado débil. Como control positivo se puede comparar con el mismo procedimiento para una cebolla morada.

M) Determinación de aminoácidos:

Ensayo de Ninhidrina :

Colocar una gota del extracto respectivo, en una tira de papel filtro y secar al aire. Añadir una gota de reactivo de ninhidrina (Solución al 0.002% en alcohol). Calentar sobre una plancha de calentamiento a 105°C.

Interpretación de resultados.-

El desarrollo de coloraciones violeta, azul o rosada se considera prueba positiva.

N) Determinación de la presencia de azúcares no reductores:

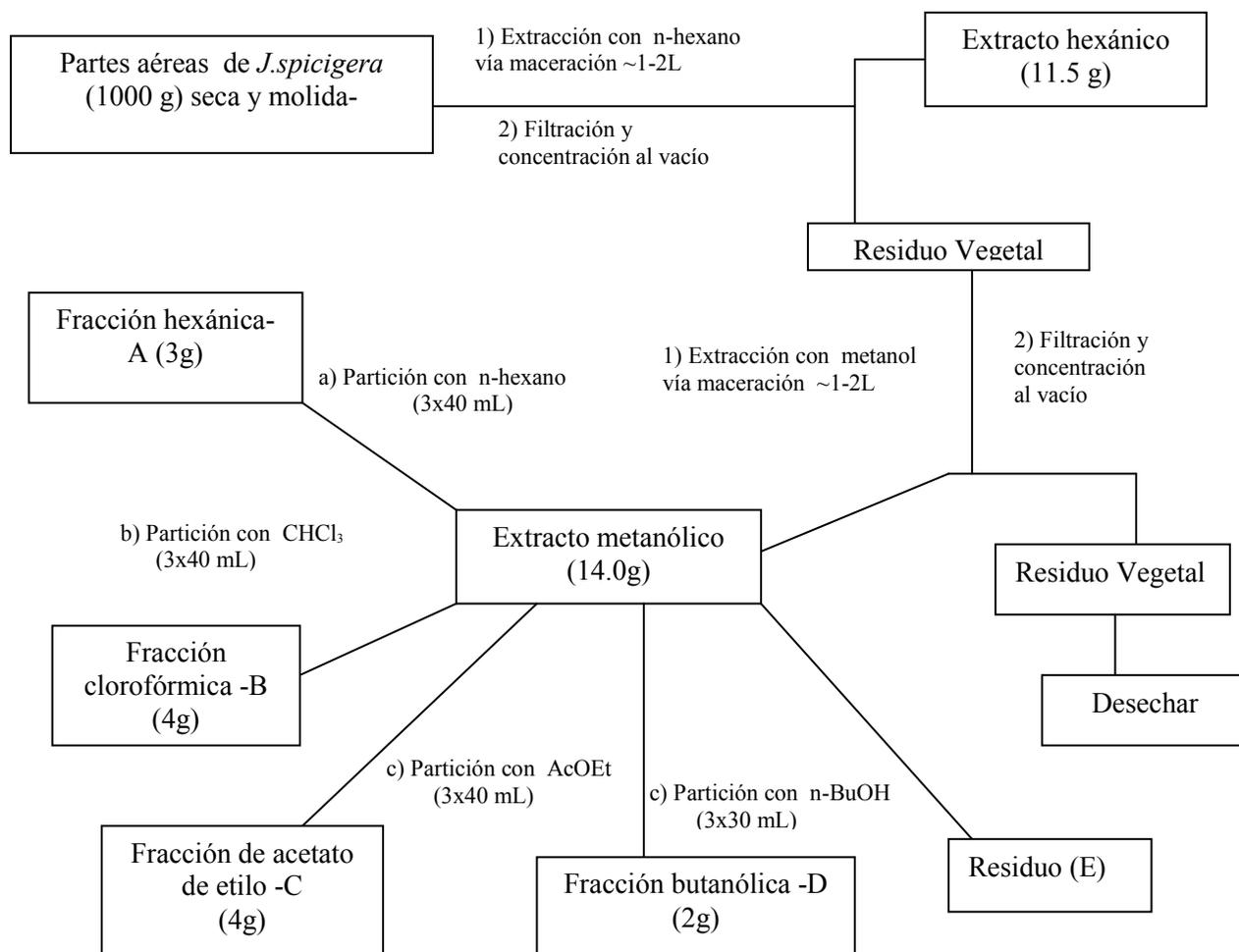
A 1.0 mL del extracto o infusión agregar 1.0 mL de resorcinol y 1.0 mL de HCl al 25%. Colocar dicha mezcla en baño maría.

Interpretación de resultados.-

Un color rojo cereza desarrollado de 2-10 minutos será positivo para carbohidratos no reductores (sacarosa, melicitosa, rafinosa).

IV.6 Preparación de extractos y fraccionamiento en gran escala

De acuerdo a los antecedentes encontrados en la literatura sobre estudios fitoquímicos realizados a diferentes especies de plantas del genero *Justicia* y con base en los resultados de la prueba de polifenoles totales (ver resultados) se decidió optar por la siguiente metodología con el material vegetal seco y molido (1000 g) se extrajo mediante un proceso de maceraciones sucesivas con dos disolventes en orden de polaridad ascendente (n-hexano y metanol) a temperatura ambiente (Esquema 3).



Esquema 3. Proceso de obtención de los extractos y fracciones de las partes aéreas de *J. spicigera*.

IV.7. Análisis químico del extracto de acetato de etilo

Fraccionamiento cromatográfico y por partición

Tres gramos del extracto de acetato de etilo derivado del extracto MeOH primario se adsorbieron en 7 g de sílice y se aplicaron a una columna cromatográfica abierta de vidrio conteniendo 45 g de sílica gel. La muestra se eluyó (recolectando fracciones de 50 mL cada una), con mezclas de hexano/CHCl₃ de polaridad creciente, posteriormente con mezclas de CHCl₃/Acetona en proporciones de menor a mayor polaridad y finalmente con MeOH 100%. Las fracciones obtenidas (50 fracciones) fueron agrupadas de acuerdo a la similitud que presentaban sus

características cromatográficas en capa fina obteniéndose 14 fracciones las cuales se muestran en la siguiente tabla 3:

TABLA 3. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo

Sistema de elución	Fracciones recolectadas	Clave	Cantidad (g)
Hexano	1-3	JS-A-1	0.823
Hexano/CHCl ₃ (9:1)	4-5	JS-A-2	0.930
Hexano/CHCl ₃ (8:2)	6-10	JS-A-3	1.010
Hexano/CHCl ₃ (7:3)	11-15	JS-A-4	0.503
Hexano/CHCl ₃ (6:4)	16-20	JS-A-5	0.401
Hexano/CHCl ₃ (5:5)	21-25	JS-A-6	0.310
Hexano/CHCl ₃ (3:7)	26-30	JS-A-7	0.222
Hexano/CHCl ₃ (2:8)	31-35	JS-A-8	0.520
Hexano/CHCl ₃ (1:9)	35-39	JS-A-9	0.347
CHCl ₃	40-43	JS-A-10	0.410
CHCl ₃ /Acetona (7:3)	44-45	JS-A-11	0.326
CHCl ₃ /Acetona (5:5)	46-48	JS-A-12	0.511
Acetona	48-49	JS-A-13	0.130
MeOH	49-50	JS-A-14	0.105

Aislamiento y purificación del Ácido Vanillico

De la fracción primaria JS-A-4 de la columna cromatográfica, eluida con Hexano/ CHCl_3 (3:7) cristalizó espontáneamente un producto de color blanco que fue purificado por recristalización con CHCl_3 100%. El producto de la recristalización fue separado de las aguas madres y lavado con MeOH R.A. De acuerdo a sus características físicas y espectroscópicas se caracterizó como ácido vainillíco.

PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

IV.8. Determinación de la actividad tóxica de los extractos y fracciones en el crustáceo *Artemia salina* (Meyer, 1982).

Preparación de los organismos

Se prepara una solución de sales de mar comercial (38 g de medio salino artificial por litro de agua destilada) en un vaso de precipitados, al cual se le acondicionó una bomba de oxígeno y se burbujeó durante 20 minutos. Posteriormente, se adicionaron los huevecillos de *Artemia salina* L., y se incubaron durante 48 horas en un baño de agua con temperatura controlada de 28-30 °C.

Preparación de las muestras

Se pesaron en diferentes tubos de ensayo 20 mg de cada extracto bajo estudio, se disolvieron en 2 mL de disolvente en el cual se diluyeran mejor, posteriormente se tomaron por triplicado de cada tubo de ensayo, alícuotas de 500, 50, y 5 mL y fueron depositadas de manera independiente en tubos de ensayo y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente.

Bioensayo

Pasado el tiempo de incubación descrito en el primer punto se depositan las 10 larvas de *A. salina* en cada uno de los tubos conteniendo la muestra por evaluar y

se aforó hasta tener un volumen final de 5 mL con la solución de agua de mar, obteniendo así concentraciones finales de 1000, 100 y 10 $\mu\text{g/mL}$; se dejaron las larvas 24 horas en contacto con la muestra a 28°C. Posteriormente, se contaron los crustáceos sobrevivientes y el resultado se expresó por medio de la CL_{50} (utilizando gráficas de cálculo de Excel, graficando el número de organismos vivos y muertos vs el logaritmo de la concentración).

IV.9. Determinación de la actividad antimicrobiana por medio del análisis de la concentración mínima inhibitoria (CMI, mg/mL)

La tabla 4 resume los microorganismos empleados en el presente estudio:

Tabla 4. Microorganismos utilizados en la determinación de la CMI

Microorganismos	Descripción
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteria Gram (+)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteria Gram (+)
<i>Escherichia coli</i>	Bacteria Gram (-)
<i>Salmonella tiphy</i>	Bacteria Gram (-)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacteria Gram (-)
<i>Candida albicans</i>	Hongo levaduriforme
<i>Trychophyton mentagrophytes</i>	Hongo filamentoso
<i>Trychophyton rubrum</i>	Hongo filamentoso

Preparación de las muestras

Los extractos bajo estudio fueron disueltos (10 mg) en 1 mL de DMSO. A partir de esta disolución, se preparan diluciones para obtener concentraciones finales en un rango de 0.750 a 3.0 mg/mL.

Preparación del inóculo

Para activar las cepas, las bacterias se desarrollaron en caldo nutritivo, la levadura y los hongos filamentosos se desarrollaron en agar Sabourad. Posteriormente, se

incubaron las bacterias durante 48 horas a 37°C y los hongos durante 7 días a 28°C en condiciones estáticas.

El inóculo de cada muestra de bacterias fue preparado a partir de cultivos que contenían 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC/mL). El inóculo de *Candida albicans* tenía una concentración final de 10^5 células/mL, y los hongos filamentosos de 10^6 esporas/mL. Las concentraciones de los inóculos fueron establecidas por comparación contra estándares turbidimétricos establecidos (escala de McFarland).

Bioensayo

Las muestras preparadas a diferentes diluciones se mezclaron con el medio de cultivo apropiado, en el cual se inoculó previamente el microorganismo de prueba; después de la incubación se examinó por comparación visual turbidimétrica la cantidad de crecimiento de microorganismos en cada tubo de ensayo, comparando en cada caso la turbidez existente con la de los patrones de turbidez de McFarland. Este procedimiento se efectuó por duplicado. La menor concentración de la muestra requerida para la inhibición de crecimiento visible será considerada la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Como controles positivos se utilizaron gentamicina para las bacterias Gram (+) y Gram (-), miconazol para los hongos filamentosos y nistatina contra el hongo levaduriforme. Adicionalmente se preparó un control de crecimiento negativo.

IV.10.Determinación de la actividad antiprotozoaria

Determinación de la actividad sobre *Entamoeba histolytica* en placa de 96 pozos.

Los parásitos se cultivaron durante 72 h a 37 °C (trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS) en medio de cultivo TYI-S33 con 10 % de suero fetal adulto.

Posteriormente, fueron pasados a dos placas estériles de 96 pozos, en una concentración de 1×10^4 trofozoítos por pozo (conteo en cámara de Neubauer) las cuales contenían previamente 200 μL de medio y la infusión en una concentración de 0.2, 2, 20, 200 $\mu\text{g/mL}$. Como control positivo se empleó metronidazol a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$, todas las concentraciones fueron realizadas por cuadruplicado, por placa (24 h, y a las 48 h).

Las lecturas se realizaron en una cámara de Neubauer realizando dos lecturas por pozo para las 24 h y para las 48 h y se calculó el porcentaje de inhibición tomando como parámetro de comparación la lectura de 4 pozos control los cuales no habían recibido ningún tratamiento para cada placa respectivamente.

Microorganismos utilizados (Actividad antiprotozoaria en tubo)

Los microorganismos utilizados para el monitoreo antiprotozoario fueron los siguientes: *E. histolytica*(HM1-IMSS), *Giardia lamblia*(IMSS:0989:1) y *Trichomonas vaginalis*(GT3). Las cepas de *E. histolytica* y *T. vaginalis* se mantuvieron en el medio TYI-S-33 suplementado con suero bovino al 10%. La cepa de *G. lamblia* se cultivó en el medio TYI-S-33 modificado y enriquecido con suero de ternera al 10%.

Ensayo de susceptibilidad

Las muestras a evaluar se prepararon de la siguiente forma: El extracto (1mg) se disolvió en 1 mL de DMSO y 19 mL de medio de cultivo TYI-S-33. De la solución resultante, se transfirieron 20, 40, 80, 120 y 160 μL a cinco tubos de manera independiente y cada uno se aforó a un volumen de 4 mL con medio de cultivo, para obtener así una concentración final de 25, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/mL}$. Cada concentración se ensayó por duplicado y se repitió un mínimo de tres veces.

Los tubos con la muestra incorporada se inocularon con *E. histolytica*, para obtener un inóculo de 6×10^3 trofozoítos/mL, con *G. lamblia* para un inóculo de 5×10^4 trofozoítos/mL y con *T. vaginalis* para obtener un inóculo de 4×10^4

trofozoítos/mL (estandarizados con cámara de Neubauer) respectivamente, y se incubaron a 37 °C durante 48 hr, Cada prueba incluyó metronidazol (Sigma) y emetina (Sigma) como controles positivos, un control con medio de cultivo, DMSO y trofozoitos, y un blanco únicamente medio de cultivo.

Transcurrido el tiempo de incubación, 50 µL de cada tubo de cultivo se subcultivaron en medio fresco y el número final de parásitos sobrevivientes se determinó por cuenta directa al microscopio (Calzada et al., 2001). Para el cálculo de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) se utilizó un programa de análisis probit.

IV.11. Determinación del efecto espasmolítico de *Justicia spicigera* sobre la contracción espontanea del íleon aislado de rata

El efecto relajante del extracto MeOH y la Infusión sobre la contracción espontanea del íleon aislado de rata se determinó de acuerdo a un diseño experimental previamente establecido (Estrada-Soto et al., 2009) y que se describe a continuación:

Aislamiento de íleon:

Para la obtención del tejido, se utilizaron ratas macho adultas (200-300 g) de la cepa Wistar alimentadas *ad libitum* con Purina Chow y mantenidas en un bioterio con libre acceso al agua. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Posteriormente, se realizó una disección en el abdomen del animal que permitió aislar el íleon, el cual se colocó en una solución Ringer Krebs-Heinseleit (Ringer KH), con la siguiente composición (mM): NaCl 119, KCl 4.6, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.5, NaHCO₃ 20 y glucosa 11.4. La solución se preparo con agua destilada, el pH se ajustó a 7.4 y se mantuvo constantemente burbujeada con una mezcla gaseosa de O₂/CO₂ (19:1). El íleon asilado se limpió y se cortó en segmentos de 1 cm.

Sistema de registro

Para determinar el efecto sobre la contracción espontánea de las muestras de prueba, se empleó un sistema de registro isométrico vertical para tejido aislado. Para ello, los segmentos de íleon se colocaron en una cámara de incubación con 20 mL de solución Ringer KH burbujeada constantemente con una mezcla gaseosa al 5 % de CO₂ en O₂ a una temperatura de 37°C que se mantenía mediante un baño recirculado. En estas condiciones, el tejido se sujetó de un extremo al piso de la cámara y del otro a un transductor de fuerza Grass Modelo FT 03, el cual registra señales mecánicas y las envía a un polígrafo Grass modelo 7 D de cuatro canales o a un sistema BIOPAC. La fuerza de tensión empleada para el tejido fue la correspondiente a 2 cm del desplazamiento de la pajilla en el BIOPAC.

Evaluación del efecto relajante

Con la finalidad de estabilizar el tejido a las condiciones *in vitro*, cada segmento del mismo se incubó y mantuvo en solución durante un periodo de 30 minutos con una tensión constante de aproximadamente un gramo. Para determinar el efecto de las diferentes concentraciones de las muestras de prueba, en primer lugar se registró la actividad espontánea del tejido durante un periodo de 10 minutos, el cual fue considerado como control (100% de actividad).

La evaluación del efecto de las diferentes concentraciones del extracto e infusión así como del control positivo, se registró inmediatamente después de transcurrido el periodo control. Para ello, se adicionaron al baño las muestras de prueba a las concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg/ml disolviendo el extracto MeOH en DMSO y la infusión en agua destilada (a una concentración por cada segmento de íleon) y el efecto de cada muestra fue registrado durante 10 minutos. El registro del efecto se realizó una vez transcurrido el periodo control adicionándose de manera acumulativa las diferentes concentraciones de las muestras prueba, después de cada experimento los tejidos fueron lavados tres veces con solución Ringer KH para permitir la recuperación a la acción de las muestras estudiadas.

Para determinar los efectos de los extractos bajo estudio, y el control positivo (papaverina) se construyeron curvas de concentración respuesta acumulativas, determinándose el efecto relajante mostrado después de tratamiento con cada concentración. Para ello, se utilizó el programa Acknowledge (BIOPAC, CO., USA) diseñado para tal fin.

IV.12. Determinación de la actividad sobre la enzima transcriptasa reversa (RT)

Para la determinación de dicha actividad se empleó el ensayo de actividad Lenti-RT[®]. Dicho ensayo es un método colorimétrico y se ha empleado para la búsqueda de compuestos inhibidores de la RT VIH-1. Este método consiste en determinar la incorporación de bromo-desoxiuridina (BrdUTP) a un molde de poliadenina (poli A) inmovilizado en microplacas de 96 pozos. La BrdUTP es reconocida posteriormente por un anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina. La adición del reactivo paranitrofenilfosfato ocasiona que la fosfatasa alcalina hidrolice el grupo fosfato a paranitrofenil. Esta reacción es colorida y puede registrarse en un Lector de ELISA a 405 nm Figura 11.

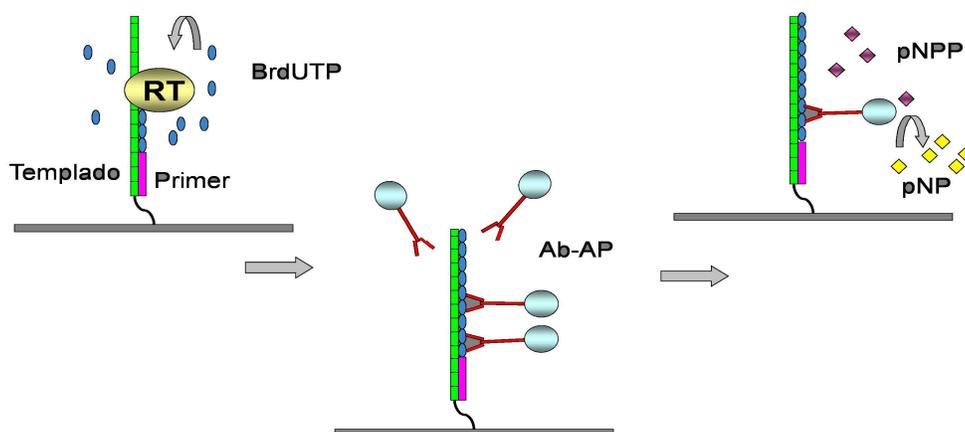


Figura 11. Figura del desempeño de la reacción de la transcriptasa reversa (RT). bromo-desoxiuridina (BrdUTP), Ab-AP(anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina), paranitrofenilfosfato (pNPP), paranitrofenil (pNP).

Para la evaluación de la actividad sobre la RT se realizaron dos ensayos, las sustancias se probaron a tres concentraciones de 2.5, 25.0 y 250 μM y cuando se desconocía el peso molecular se emplearon las concentraciones: 1.11, 11.5, 111.5 $\mu\text{g/mL}$, como disolvente se empleó DMSO a una concentración máxima de 1 a 10 % v/v. Como control positivo se usó nevirapine (inhibidor de la RT), bajo las mismas concentraciones.

Para determinar las condiciones bajo las cuales la actividad de la RT eran óptimas, se realizaron ensayos de prueba en los cuales se varió la temperatura y se observó que a temperatura ambiente (28 °C) la reacción procedía lentamente, mientras que a 33 °C es más rápida, alcanzando valores de absorbancia máximos de 2.5 a las 4 horas de haber agregado el paranitrofenil fosfato, no así a temperaturas inferiores, por lo que se decidió que la temperatura óptima era 33 °C. Cabe señalar que aún variando la temperatura el control de nevirapine siempre inhibió la actividad de la RT en función de la dosis. Lo anterior fue un dato que permitió determinar que la enzima se encontraba en óptimas condiciones. (Huerta-Reyes et al., 2004).

El protocolo para determinar actividad sobre la RT de los metabolitos de *J. spicigera* consistió en:

Un kit comercial que consta de los siguientes elementos:

- 2 Placas de Poli A
- 1 Frasco con amortiguador de dilución (B)
- 2 Frasco con componentes de reacción de la RT (C1)
- 1 Frasco con amortiguador de reconstitución (C2)
- 1 Frasco con Rtr-VIH estándar
- 2 Frasco con amortiguador de lavado concentrado (E)
- 2 Frasco con anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina (O)
- 1 Frasco con tabletas del substrato de la FA (P1)
- 1 Frasco con amortiguador del substrato de la FA (P2)

1. Dilución del amortiguador de dilución.

- Adicionar 30 mL del frasco B en un vaso de precipitado y adicionar 30 mL de agua destilada.

2. Dilución de las sustancias.

- Las sustancias se evaluaron en 3 concentraciones de 2.5, 25.0 y 250 μM ; cuando se desconocía el peso molecular se emplearon las concentraciones 1.11, 11.1, y 111.5 $\mu\text{g/mL}$. Cada sustancia se evaluó por triplicado y se realizó un segundo ensayo solo en aquellas sustancias que mostraron algún grado de actividad sobre la RT.

- Adicionar 135 μL de la solución diluida B en cada pozo de las dos placas de preparación de muestras (cada placa contiene 96 pozos).
- Adicionar 15 μL de la sustancia por analizar en el pozo A1.
- Adicionar 15 μL de la segunda sustancia por ser analizada en el pozo A2 y así continuar con las demás sustancias hasta completar A12.
- Transferir 15 μL desde los pozos A1-A12 a los correspondientes pozos de la fila B.
- Transferir 15 μL desde los pozos B1-B12 a los correspondientes pozos de la fila C y así continuar hasta la fila G (esto se realiza en ambas placas).
- La fila H se usa para referencias y controles.

3. Preparación de la mezcla de reacción.

- Adicionar 2 mL de amortiguador de reconstitución (C2) al frasco que contiene las componentes de reacción de la TR (C1).

4. Preparación de las placas de poli A con las muestras.

- Tomar las dos placas y adicionar 100 μL de la mezcla de reacción que se preparó en el 3er. punto.
- Transferir 50 μL de cada pozo de las placas de preparación de muestras.

- Cubrir las placas con el plástico adhesivo e incubar por 30 minutos a 33 °C.
5. Dilución de la rTR-VIH estándar (D).
- Adicionar 1.5 mL del amortiguador de dilución preparado en el punto 1 al frasco que contiene el liofilizado la rTR-VIH estándar (D) y mezclar vigorosamente.
 - Tomar un vaso de precipitado y etiquetarlo con el número 2, adicionar 12 mL del amortiguador de dilución preparado en el punto 1 y verter 1 mL de la rTR-VIH estándar diluida, mezclar vigorosamente.
6. Inicio de la reacción de la TR.
- Tomar las placas de poli A de la incubadora y adicionar 50 μ L de la enzima estándar en todos los pozos excepto H8-H12.
 - Adicionar 50 μ L del amortiguador de dilución en los pozos de H8-H12.
 - Sellar las placas con el plástico adhesivo e incubar durante 3 h a 33 °C con agitación constante.
7. Preparación de la solución de lavado.
- Adicionar 30 mL de tritón X-100 en un litro de agua destilada y agitar por 10 minutos.
 - Tomar del Kit el amortiguador de lavado concentrado (E) y adicionar 50 mL a un contenedor de 20 litros.
 - Adicionar el tritón X-100 disuelto al contenedor y ajustar el volumen a 20 litros con agua destilada y mezclar vigorosamente (dependerá de la cantidad que se utiliza).
8. Fin de la reacción de TR.
- Tomar las placas de poli A de la incubadora y lavarlas 4 veces. Eliminar el exceso de agua colocándolas hacia abajo sobre un papel absorbente.
9. Reconstitución del anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina.
- Tomar los dos frascos de que contienen el anticuerpo (O) y adicionar 12 mL de agua destilada conteniendo 1 % v/v de tritón X-100 a cada una, mezclar vigorosamente en un vortex durante 10 a 15 minutos.

- Tomar las placas recién lavadas y adicionar 100 μL a cada pozo de ambas placas de poli A, posteriormente cubrirlas con el plástico adhesivo e incubarlas durante 90 minutos a 33°C y con agitación constante.
10. Preparación del sustrato de la fosfatasa alcalina (FA).
 - Adicionar las tabletas de FA (P1) al amortiguador (P2) agitar aproximadamente por 20 minutos, mantener en oscuridad y a temperatura ambiente.
 11. Eliminar el exceso de anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina.
 - Después de 90 minutos de incubación remover de las placas de poli A los excesos de anticuerpo lavando 20 veces. Eliminar el exceso de agua colocándolas hacia abajo sobre un papel absorbente.
 12. Inicio de la reacción de la fosfatasa alcalina.
 - Adicionar 100 μL de la sustancia preparada en el punto 10 a cada uno de los pozos de ambas placas de poli A.
 - Cubrir las placas con el plástico adhesivo e incubar a temperatura ambiente y en oscuridad y con agitación constante.
 13. Lectura de las placas (para tal fin emplear un lector de placas).
 - Leer la absorbencia de ambas placas después de 30 minutos de incubación. Repetir la lectura en intervalos de tiempo hasta que la lectura de los pozos H1-H7 den valores de aproximadamente el 75 % del valor máximo de actividad.
 14. Procesar datos. Calcular el porcentaje de actividad (%A) y el porcentaje de inhibición (%I)

IV.13.Determinación citotóxica por el método de sulforrodamina B

Las pruebas se realizaron en 5 líneas celulares:

U251: Glía de sistema nervioso central, PC-3: Cáncer de Próstata, K652: Leucemia, HCT-15: cáncer de Colon, MCF-7: Cáncer de mama, y SKLU-1: Cáncer de pulmón.

El ensayo se llevó a cabo por el método de la sulforrodamina B, en placas de 96 pozos para determinar la viabilidad celular, el cual es un ensayo colorimétrico que se lee en un lector de Elisa a 515 nm.

DIA 1:

- a) Se toman las placas de crecimiento celular en el cual se observe una confluencia de 70 a 80%
- b) Se cuentan las células para obtener una solución de 5×10^4 células/mL
- c) Se inoculan dos placas con 100 μ L de la solución de células del paso anterior
- d) Se incuban a 37°C en 4.5% de CO₂

DIA 2:

- a) A las 24 horas se añaden 100 μ L de medio a la placa (que se denominará cero) y posteriormente se fijan con 50 μ L de TCA (ácido tricloroacético) al 50% durante 1 hora a 4°C.
- b) Transcurrida la hora se lava con agua corriente 5 veces, a temperatura ambiente y se somete a refrigeración.
- c) En la placa experimental (denominada uno) se añaden 100 μ L de las diluciones de las sustancias a probar y se incuban durante 48 horas.

DIA 3:

- a) Pasadas 24 horas, la placa experimental se fija con 50 μ L de una solución de TCA al 50% y se procede igual que en la placa cero.

DIA 4:

- a) Las placas cero y uno se tiñen con 100 μ L de una solución de sulforrodamina B al 0.4% en ácido acético al 1% durante 30 minutos.
- b) Se lavan con una solución al 1% de ácido acético 5 veces y se dejan secar a temperatura ambiente.

DIA 5:

- a) Se adicionan 100 μ L del tensoactivo TRIS base (pH = 10) y se agita
- b) Se mide la densidad óptica a 515 nm en un lector de placas
- c) Con los datos de densidad óptica se calcula el porcentaje de inhibición y/o IC_{50} con respecto al control.

FORMULAS:

Porcentaje de inhibición (%I) = $100 \times [T - T_0 / (C - T_0)]$ si T es mayor o igual a T_0

De lo contrario

Porcentaje de de inhibición (%I) = $100 \times [(T - T_0) / T_0]$ si T es menor a T_0

T = transmitancia del pozo

T_0 = transmitancia del pozo blanco

IV.14.Determinación de la toxicidad aguda por vía intraperitoneal

Para la evaluación de la toxicidad aguda se utilizaron 51 ratones macho de la cepa CD1 (Charles River) con pesos de 22 a 25 g, de dos meses de edad, para completar una $n = 6$ por dosis, para ensayar 4 o 5 dosis representativas calculadas en escala logarítmica para cada uno de los tratamientos, infusión (10, 38, 60, 102, 178 mg/Kg) y extracto metanólico (100, 177, 350, 550 mg/Kg). Se registró la aparición y duración de cualquier síntoma tóxico (aparte del análisis neurofarmacológico posteriormente mencionado) a las 1, 3, 5, 9, 12, 24, 48 y 72 h y transcurrida una semana y se trazaron las respectivas curvas dosis respuesta cuantales para cada uno de los tratamientos.

Los animales tratados con la mayor dosis de extracto metanólico y de infusión que presentaron el mayor efecto tóxico y murieron, fueron examinados macroscópicamente e histológicamente en los órganos y tejidos blanco: corazón, cerebro, riñón, hígado, bazo y testículo, para determinar la causa de muerte, registrando adicionalmente el peso de los mismos, y realizando posteriormente un estudio histológico. Finalmente, al concluir el período experimental se sacrificaron los animales control por dislocación cervical y posteriormente se les realizó la autopsia, el examen macroscópico de órganos y tejidos, además del estudio histológico y la determinación de los pesos. Los resultados de los pesos de los órganos antes mencionados fueron procesados estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA), seguida de una prueba confirmatoria de Dunnet, con una significancia de $p < 0,01$.

IV.15.Histopatología

Después de abrir al animal y realizar la necropsia respectiva se extrajeron de manera rápida los órganos blandos o los claramente afectados para realizar la siguiente técnica histopatológica (Junqueira, 2005):

A) Fijación: Este proceso permite conservar el tejido en condiciones tan naturales como sea posible y fue llevado a cabo con un fijador histoquímico (que conserva composición molecular y bioquímica) la formalina cuya formula clásica consistió en 10% de formol con solución buffer (que evita la acidez).

B) Lavado e identificación: Después de 24 horas de fijación de los órganos respectivos, se llevó a cabo este proceso el cual se realizó con agua destilada por 10 minutos, para eliminar el fijador y evitar que precipitara y provocara manchas en la preparación. A cada órgano específico se le asignó un número de identificación, y fue cortado en su eje transversal.

C) Deshidratación: Los tejidos no pueden ser colocados húmedos por lo que se sometieron a una técnica de deshidratación, cada uno de los segmentos de corte fue dispuesto en casetes y colocado en el Histokinete (Marca Histokinette 2000 y modelo YD-12G) el cual somete al tejido a pasar por alcoholes de concentración ascendente 30-100%, todos los tejidos son procesados de acuerdo al manual del equipo.

D) Inclusión: Los cortes de cada órgano fueron incluidos en parafina, esto consistió en colocar el tejido en un recipiente con parafina líquida con punto de fusión de 56 – 58 °C, dentro de una estufa a temperatura fija, y posteriormente elaborar bloques, colocando los tejidos en un molde de acero inoxidable con parafina y colocando sobre éste una cámara de plástico, vertiendo más parafina y llevándolo finalmente a la plancha refrigerante. Fue sacado cuando éste se encontraba frío y se desprendía fácilmente de la cámara de plástico, se utilizó

parafina ya que con ésta los cortes obtenidos son nítidos y se observa una morfología que permite un mejor diagnóstico (Figura 12).

E) Corte: Los tejidos inmersos en parafina fueron posteriormente cortados mediante el uso de un micrótomos eléctrico (Marca Microm y modelo HM335E) con un grosor de 5-8 micras. Estos cortes son colocados en el baño de flotación de agua caliente de 48-50 °C extendiendo y disolviendo los cortes, los cuales fueron finalmente colocados en el portaobjetos y acomodados en una canastilla de metal, la cual se dejó 15 minutos en la estufa para que el tejido fuera adherido al portaobjetos (Figura 12).

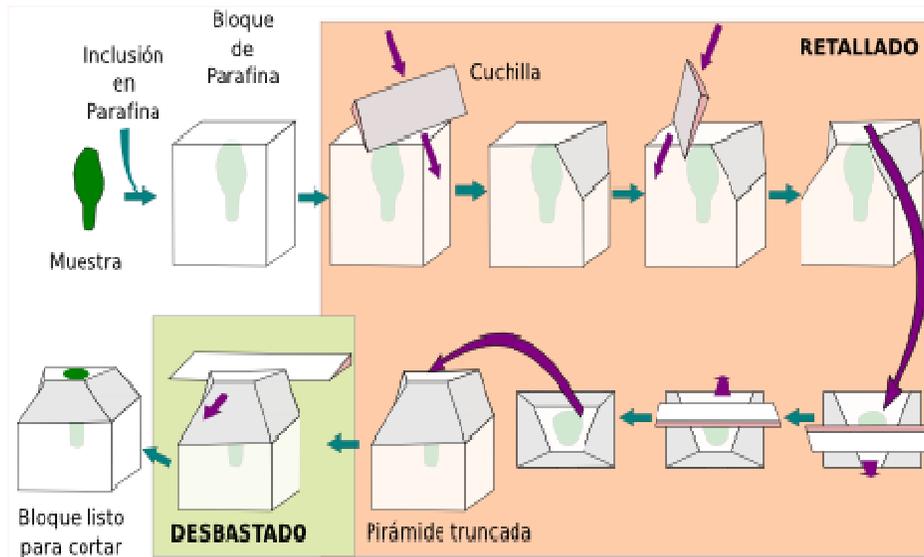


Figura 12. Diagrama de inclusión y corte de las muestras

F) Tinción y montaje: para dar características cromáticas a los tejidos se utilizó el método más clásico de hematoxilina-eosina, esto fue realizado pasando el portaobjetos por la caja con la solución de colorante respectiva, finalmente se elimina el exceso de colorantes y para hacer permanente la preparación se colocó una gota de medio de montaje (Bálsamo de Canadá) tapando ésta con un cubreobjetos y dejando secar 20 minutos (Figura 13).

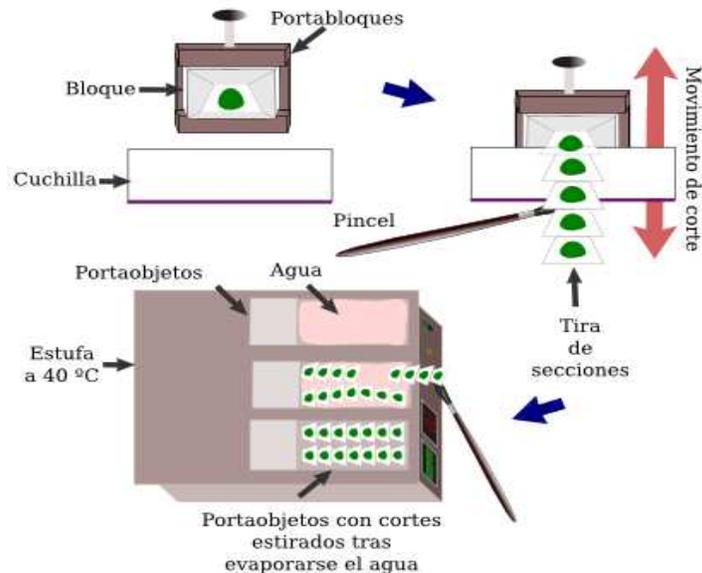


Figura 13. Metodología de tinción y montaje

G) Observación: fueron realizadas en el microscopio con el cual se le tomó las fotografías pertinentes y se refieren en discusión y resultados.

IV.16. Perfil neurofarmacológico

El procedimiento que se empleó es una adaptación del estudio validada por Irwin (1968) que consiste en analizar efectos observables y cuantificables a *grosso modo*, y que permite analizar en cada animal efectos producidos por los extractos a nivel de su comportamiento neurológico, autonómico y de toxicidad (Cifuentes *et al.*, 2001). Este involucra una fase inicial de observación sin manipulación del animal, y una fase tardía de manipulación, durante la cual cada animal es sujeto a una secuencia de manipulaciones. Todos los estudios realizados con animales de laboratorio se apegan a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y a la guía Internacional Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 1996.

-Desarrollo del experimento:

Para la evaluación del perfil neurofarmacológico se utilizaron seis ratones macho de la cepa CD1 (Charles River) con pesos de 22 a 25 g y dos meses de edad, para tres dosis representativas tanto del extracto MeOH, y la infusión resultando 18 animales y 3 más como controles.

A los 21 ratones se les asignó un número, se pesaron y se acomodaron al azar en cajas de 5 ratones. Previo al estudio, se analizaron con los parámetros posteriormente señalados de manifestaciones conductuales, y se procedió a administrar las dosis para cada tratamiento, dependiendo si se trataba de infusión (10, 60, 178 mg/Kg) o de extracto metanólico (100, 350, 550 mg/Kg), respectivamente y los animales control recibieron únicamente S.S.I. Todos los tratamientos administrados fueron por vía intraperitoneal (i.p.), y posteriormente se evaluaron las manifestaciones conductuales abajo señaladas a la 1, 3 y 5 horas, cabe destacar que se les asignó un valor de 0 a las manifestaciones presentadas en condiciones normales y de 4 cuando en condiciones anormales proporcionalmente transformadas a por ciento.

La siguiente lista de manifestaciones conductuales es una guía para la valoración del comportamiento y determinación del perfil neurofarmacológico:

Piloerección (0): enrizamiento del pelo

Temblor (0): movimiento discreto del cuerpo o una de sus partes

Pasividad (0): ausencia de respuesta a un estímulo

Fuerza muscular (4) y Cuerda Tirante (4): resistencia, permanencia y desplazamiento por medio de las patas delanteras en una cuerda durante 20 segundos, además de resistencia que opone el animal a la tracción

Plano inclinado (4): desplazamiento a lo largo de una superficie de 45 grados

Catatonía (0): inmovilidad en posición forzada

Abertura palpebral (4): grado en que mantienen su posición normal los párpados sobre el globo ocular.

Finalmente se graficaron los datos de plano inclinado, catatonía, fuerza muscular y cuerda tirante a las 1, 3 y 5 horas y para los demás parámetros únicamente se anotó lo observado (Ver resultados).

IV.17. Determinación de la toxicidad aguda por vía oral (Método de Lorke)

Después de observar que por la vía intraperitoneal la infusión produjo toxicidad y letalidad, se procedió a determinar la toxicidad de la misma por vía oral a través del método de Lorke (1983). Para de esta manera realizar una comparación de las dos vías empleadas, el ensayo se realizó con ratones macho cepa CD-1 (20-25 g) mantenidos en ayuno por 18 horas. La toxicidad aguda de la infusión se determinó en dos fases: en la primera se administraron dosis de 10, 100, 1000 mg/Kg de peso a grupos independientes de 3 animales respectivamente, y en la segunda fase se administraron dosis de 1600, 2900, 5000 mg/Kg de peso a grupos independientes de 3 animales. Como control se utilizó un grupo tratado con solución salina isotónica (SSI) por la misma vía. En las dos fases, los animales se observaron durante 14 días. Al término del ensayo, todos los animales sobrevivientes se sacrificaron, con la finalidad de aislar los órganos blancos vitales cerebro, hígado, riñón, corazón, pulmón, y bazo para analizarlos macroscópicamente y registrar posibles alteraciones. La dosis letal media (DL_{50}) es decir la dosis que produce la mortalidad del 50% de los animales evaluados se determinó mediante la metodología descrita por Lorke en 1983.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

V.1.- Búsqueda bibliográfica y recolección de Material Biológico:

El análisis bibliográfico del uso etnomedicinal de *Justicia spicigera*, muestra las partes aéreas son las más utilizadas popularmente, en forma de infusión o decocción, y que son empleadas en diversas entidades nosológicas de la circulación sanguínea principalmente (Tabla 5). Las fuentes de información fueron secundarias, (ver metodología para referencias), los usos fueron clasificados de acuerdo a Lozoya et al, 1987.

Tabla 5. Principales usos y formas de uso adjudicadas tradicionalmente a *Justicia spicigera*

Uso tradicional	Forma de utilización	Parte de la planta utilizada	Clasificación de uso
Limpiar la sangre	Infusión o decocción	Partes aéreas	Aliviar trastornos de la circulación sanguínea
Circulación	Infusión (Agua de uso)	Hojas y tallo	
Anemia	Infusión o decocción (Agua de uso y baño)	Partes aéreas	
Aumentar los globulos rojos	Infusión o decocción	Hojas	
Purificar la sangre	Infusión (Agua de uso)	Partes aéreas	Aliviar sintomas de un síndrome de filiación cultural
Problemas menstruales	Infusión	Tallo y hojas	Utilización en la biología de la reproducción de la mujer

Várices	Infusión o decocción	Tallo y hojas	Aliviar trastornos de la circulación sanguínea y lesiones de la piel
Disentería	Infusión (Agua de uso)	Partes aéreas	Tratamiento de trastornos del aparato digestivo
Parásitos	Infusión (Agua de uso)	Parte aéreas	Tratamiento de transtornos del aparato digestivo
Espanto	Infusión (Baños con leche)	Partes aéreas	Aliviar síntomas de un síndrome de filiación cultural
Problemas en los riñones	Infusión o decocción (Agua de uso)	Partes aéreas	Trastornos de vías urinarias
Leucorrea y pielonefritis	Decoccion e infusion	Partes aéreas	
Estimular transtornos mentales y del sueño	Decocción e infusión	Partes aéreas	Padecimientos del sistema nervioso
Antihipertensivo	Infusión	Hojas y flores	Aliviar trastornos de la circulación sanguínea
Desinfectante de la piel, jotes y verrugas	Decocción (Baños)	Partes aéreas	Tratamiento de lesiones de piel

El extracto metanólico empleado para todas las pruebas biológicas fue preparado a partir del material vegetal adquirido con el Proveedor de Yervas S.A. de C.V Colonia Merced, D.F. (denominado C en la Figura 14). Su contenido metabólico se comparo por cromatografía en capa fina (CCF) con otro extracto metanólico de un espécimen silvestre (denominado S en la Figura 14) en un sistema de elución de Acetato de etilo/MeOH-5:5. En donde se pudo apreciar que ambos especímenes presentaron un patrón cromatográfico semejante con el mismo frente de referencia (Rf) en al menos dos bandas (0.4 y 0.9). Las figuras 14 a y 14b) muestran las diferencias que resultan al emplear dos reactivos reveladores diferentes. Con vainillina se aprecia que una de las bandas presenta una coloración morada intensa (Rf 0.4, Figura 14b). Estos cromatogramas podrían utilizarse como prueba de identidad para un eventual control de calidad de la droga.

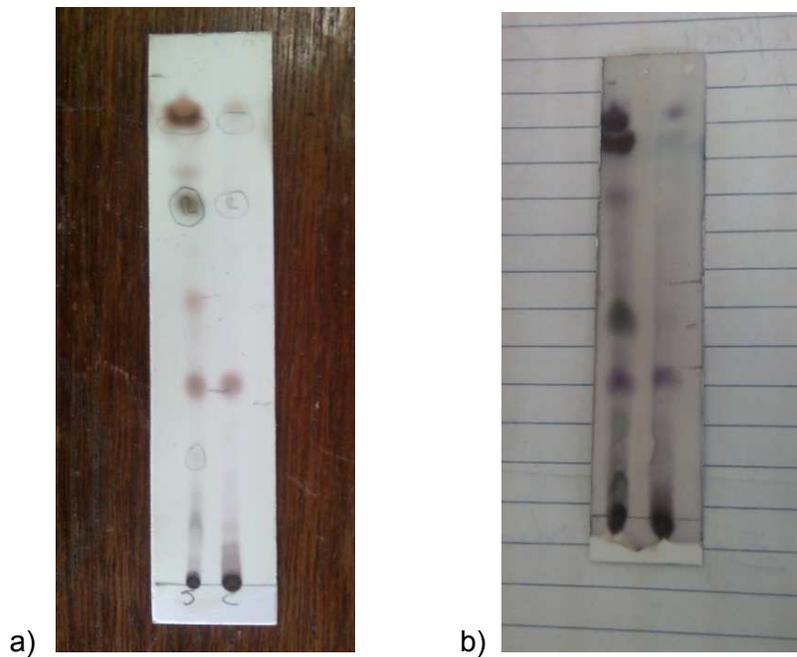


Figura 14. Comparación por CCF entre extractos. Lado izquierdo corresponde al espécimen silvestre (S), lado derecho espécimen comercial (C), a) Revelada con sulfato cérico y b) Revelada con vainillina.

PRUEBAS FITOQUÍMICAS

V.2.- Ensayos de métodos de extracción:

Se emplearon dos métodos, cada uno con 10 g de partes aéreas recolectadas, secas y molidas; se prepararon los extractos hexánico y de EtOH, a) por el método de maceración continua durante 72 horas (300 mL) cada uno y b) la técnica de Jaiswal (1980), consistente en extracción (300 mL) con hexano seguida de una extracción con EtOH ambas mediante aparato de Soxhlet, por 72 horas cada uno y c) con base en los usos etnofarmacológicos de esta planta se preparó la infusión de partes aéreas (10 g), con 100 mL de agua destilada (ver metodología).

V.3.- Marcha fitoquímica y determinación de concentración de polifenoles:

En la Tabla 6 referente los resultados del perfil fitoquímico de *J. spicigera*, podemos ver que los tres extractos probados son semejantes, ya que todos polifenoles en exceso (prueba de Folin), los cuales probablemente sean flavonoides de tipo flavanona (prueba de Shinoda) y que nos hablan de su posible potencial antioxidante pues estas moléculas son atrapadoras de radicales libres (Sepulveda-Jimenez et al., 2009). También se puede ver que todos los extractos contienen triterpenos y carotenoides (reacción de Lieberman-Burchard y de Salkowski respectivamente), esto no es concluyente pues este tipo de moléculas son muy comunes en las plantas superiores. Por otro lado, todos los extractos probados presentan también núcleos de antocianidinas (reacción de Rosenheim) lo cual nos vuelve a indicar el potencial antioxidante de esta especie y nos da cierta idea, que muy probablemente estas moléculas sean las responsables de la coloración rojiza tan característica de la infusión. Además también se encontraron aminoácidos y azúcares, los cuales agregan cierto valor nutricional a los extractos provenientes de esta especie y que podría justificar su uso como coadyuvante contra la anemia (aunque faltarían realizar estudios más profundos en el tema). Finalmente es interesante destacar que en el caso de este espécimen fue negativa

la reacción de Dragendorff para alcaloides pues estos se encuentran en algunas especies del genero pero asiáticas como el caso de *Justicia adhatoda*.

Tabla 6. Resultados de la Marcha Fitoquímica

Reacción y Metabolito determinado	Extracto MEOH obtenido por maceración	Extracto EtOH obtenido por Soxhlet	Infusión acuosa
Saponinas. Prueba de la espuma	-----	-----	+++
Polifenoles. Prueba de Folin-Ciocalteu	+++	+++	+++
Taninos Hidrolizables	-----	-----	-----
Taninos Condensados	-----	-----	-----
Flavonoides. Prueba de Shinoda	+++ ~Flavanona	+++ ~Flavanona	+++ ~ Flavanona
Fenilpropanoides. Prueba de Arnow	-----	-----	-----
Antraquinonas. Reacción de Bornträger	-----	-----	-----
Triterpenos y Esteroides. Reacción de Lieberman-Burchard	+++ ~Triterpenos	+++ ~Triterpenos	+++ ~Triterpenos
Esteroides y Carotenoides. Reacción de Salkowski	+++	+++	+++
Iridoides	-----	-----	-----
Alcaloides. Reactivo de Dragendorff	-----	-----	N.P.
Cumarinas	-----	-----	-----
Antocianidinas Ensayo de Rosenheim	+++	+++	+++
Aminoácidos Ensayo de la ninhidrina	+++	+++	+++
Azucares no reductores	+++	+++	+++
+++ (positivo), ---- (negativo), N. P. No se practicó			

V.4 Prueba de Folin

Se realizó de acuerdo con los resultados de la marcha fitoquímica que indicaron la presencia de altas cantidades compuestos fenólicos, con base en la metodología de Folin (Barrow, 2006) se realizaron las pruebas para determinar la concentración de polifenoles de los extractos obtenidos por maceración y Soxhlet, así como para la infusión (Tablas 6-10) los resultados se expresan en por ciento de equivalentes de ácido gálico (%PEA).

Como se puede apreciar en las Tablas 7 y 8 el método por maceración con MeOH presentó mayor cantidad de polifenoles por 100g de planta, resultando 4.75g GAE para el macerado y 1.66 g GAE para la extracción con Soxhlet, esto probablemente se deba a que en este último se utiliza calentamiento y en consecuencia se forman artefactos que modifican las estructuras de los polifenoles, por lo que para la elección del método de extracción en grandes cantidades se eligió la maceración. Por otro lado en la Tabla 9 se puede ver una gran concentración de polifenoles contenidos en la infusión 4.47g GAE.

Tabla 7. Extracto MeOH obtenido por macerado

%PEA			
Muestra	Extracto EtOH	Dilución Extracto 1:5	Dilución Extracto 1:10
1	470.79	95.93	44.79
2	479.93	99.65	51.65
3	474.50	97.65	46.22
Promedio	475.08	97.74	47.55
DS	±4.60	±1.86	±3.62

Tabla 8. Extracto EtOH obtenido por Soxhlet

% PEA			
Muestras	Dilución Extracto 1:5	Dilución Extracto 1:10	Extracto EtOH
1	162.44	74.80	51.65
2	165.33	77.96	55.36
3	169.54	77.44	49.65
Promedio	165.77	76.74	52.22
DS	± 3.57	± 1.69	± 2.90

Tabla 9. Infusión

%PEA			
Muestras	Infusión rojo	Dilución Infusión (1:5)	Dilución Infusión (1:10)
1	440.86	89.43	41.93
2	462.64	90.5	47.64
3	436.57	94.07	44.43
Promedio	446.69	91.33	44.67
DS	± 13.98	± 2.43	± 2.86

En cuanto a la cantidad de polifenoles presente en partes aéreas, un estudio realizado por Sepulveda-Jimenez, en 2009 encontró 5.01 g GAE/100g en el extracto MeOH de hojas obtenido por maceración lo cual es cercano a nuestros datos (4.75 g GAE) (Tabla 10), por otra parte en el mismo estudio pero en el extracto acuoso de hojas se obtuvieron 3.85 g GAE/ 100g que es también cercano a nuestros resultados de 4.47g GAE, las variaciones fueron debidas muy probablemente a la zona y época de colecta, sin embargo, los resultados de ambos estudios comprueban una gran cantidad de polifenoles en esta especie. En el estudio antes mencionado se demostró la presencia de actividad antioxidante por parte del extracto MeOH y la infusión sobre ciertas especies reactivas de oxígeno, que pudiera estar relacionado con su uso tradicional como agua de día para tratar la anemia al ser esta una enfermedad altamente oxidante.

Tabla 10. Resultados finales de la extracción expresados en g de equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de partes aéreas

Extracto	Equivalentes de Ácido gálico/100g de planta
Macerado MeOH	4.75 g/100 g de Muitle
Soxhlet EtOH	1.66g/100 g de Muitle
Infusión	4.47/100 g de Muitle

V.5. Aislamiento e identificación del ácido vainillíco

El compuesto recristalizado de la fracción JS-A-4 mostró pureza cromatográfica ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, Rf. 0.70), al observarlo en el UV de onda corta presentó una coloración amarillenta característica (Figura 15).

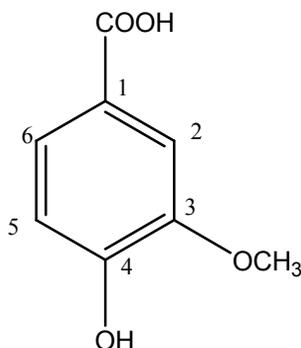


Figura 15. Estructura del Ácido Vainillíco

A continuación se presentan sus características espectroscópicas y espectrométricas (Tabla 11). El espectro IR mostró bandas características de los grupos carbonilo en 1680 cm^{-1} , grupo hidroxilo en 3430 cm^{-1} , metilos y metilenos en 2654 cm^{-1} , dobles enlaces en 1598 cm^{-1} . El espectro de RMN ^1H realizado en CDCl_3 se muestra un singulete en δ_{H} 11.0 para el hidrógeno de un $-\text{COOH}$, en δ_{H} 7.72 una señal doble de dobles ($J_1=8.4$, $J_2=2\text{ Hz}$) que integra para un hidrógeno, asignado en la posición 6 de un anillo bencénico trisustituido en posiciones 1,3,4. En δ_{H} 7.59 se observa una señal doble ($J=3\text{Hz}$) que integra para un hidrogeno asignado a la posición 2 del anillo aromático. En δ_{H} 6.97 una señal doble ($J=8.4$) asignada a la posición 5 del anillo aromático. En δ_{H} 3.36 un singulete que integra para 3 hidrógenos y que se asignó a los hidrógenos de un grupo metoxilo unido a un anillo aromático. En δ_{H} 6.16 se observo un singulete ancho asignado a un hidrogeno de hidroxilo fenólico. La disposición entre sí de los hidrógenos bencénicos se estableció tomando en consideración las constantes de

acoplamiento y en comparación con lo reportado en la literatura para el ácido vainillíco.

El espectro de RMN-¹³C permite ver las señales correspondientes en 121.0 ppm al C-1, en 114.0 ppm para C-2, en 146 ppm para C-3, en 150 ppm para C-4, en 112.0 ppm para C-5, en 125.2 ppm para C-6, en 169.8 ppm al C=O, en 56.2 ppm para el OMe. Finalmente el espectro de masas confirmó el peso molecular del ácido vainillíco 168 y su principal fragmento 153 [M-CH₃]⁺ correspondiente a la pérdida del metilo.

Tabla 11. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del ácido vainillíco

p.f.	207-210 °C (Cristales amorfos incoloros)
F.M:	C ₈ H ₈ O ₄
UV(espectro 1)	λ max (MeOH), nm, 260 y 287
IR. (espectro 2)	vmax (pastilla) cm ⁻¹ : 3430, 2942, 2654, 1680, 1598, 1524, 1433, 1283, 1206, 1116, 1031, 880, 763.
RMN- ¹ H (espectro 3)	200 MHz CDCl ₃ δ: 11 (1H,s, COOH), 6.15 (1H,s, OH), 3.36 (3H,s, OCH ₃), 7.59 (1H,dd , H-2), 7.72 (1H,dd ,H-6), 6.97 (1H,dd,H-5)
RMN- ¹³ C (espectro 4)	300 MHz CDCl ₃ δ:121 (C-1), 114.0 (C-2), 146 (C-3), 150 (C-4), 112 (C-5), 125.2 (C-6), 169.8 (C=O), 56.2 (OMe).
C.G./E.M. Tr =12.29 (espectro 5)	m/z (%):169 (8) [M+1] ⁺ , 168 (100) [M] ⁺ , 153 (78) [M-CH ₃] ⁺ , 151 (17), 125 (39), 123 (10), 109 (17), 97 (5), 79 (17), 53 (2), 51 (2).

PRUEBAS BIOLÓGICAS

V.6.- Ensayos de toxicidad en *Artemia salina*:

En la Tabla 12 se puede observar que los extractos hexánico, etanólico y metanólico de *Justicia spicigera* no produjeron efectos letales sobre *A. salina*, sin embargo, la infusión presentó una CL_{50} de 100 $\mu\text{g/mL}$, lo cual es sobresaliente, ya que esta prueba preliminar y se relaciona con los efectos antiparasitarios, citotóxicos, y con pruebas de toxicidad (Meyer, 1982), que en los apartados posteriores se muestran.

Tabla 12. Ensayo de toxicidad en *A. salina*

Extracto probado	CL_{50} [$\mu\text{g/ml}$]
Hexánico Soxhlet	>1000
EtOH Soxhlet	>1000
MeOH Macerado	>1000
Infusión	100

V.7. Pruebas antimicrobianas (bacterias, levadura y dermatofitos)

Además del uso tradicional de *Justicia spicigera* para tratar infecciones (antimicrobiana) existen dos estudios previos sobre esta actividad, el primero de 1987 fue realizado por Cáceres y colaboradores, como parte de un monitoreo de diferentes plantas utilizadas en la medicina tradicional de Guatemala, para tratar infecciones. En dicho estudio se probó un extracto metanólico de las hojas de esta planta, y no se encontró ningún tipo de actividad antimicrobiana contra *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*. En el segundo estudio realizado por García y colaboradores en 1991 también se probaron diferentes plantas antimicrobianas mexicanas utilizadas popularmente contra infecciones. Se probó un extracto

etanólico de partes aéreas de *J. spicigera* que resulto positivo contra *S. aureus* y *B. subtilis* y negativo contra *S. faecalis*, *E. coli*, y *C. albicans*. Por lo cual, resulta interesante los estudios sobre esta especie para contrastarlos con los estudios antes mencionados. En la tabla 12 se muestran los estudios realizados en esta tesis sobre *S. aureus*; *E. faecalis*; *E. coli*; *S. typhi*; *C. albicans* y los dermatofitos; *Tricophyton mentagrophytes*; y *Tricophyton rubrum*.

De manera general se observó que no existe efecto de actividad antimicrobiana. En el caso de la controversia en los estudios de *Justicia spicigera* sobre *S. aureus* se encontramos una CMI de 3.0 mg/mL, que se interpreta como un efecto antimicrobiano a muy alta concentración (similar CMI se obtiene con los dermatofitos). En el caso de *P. aeruginosa* y *C. albicans*, no se encontró actividad inhibitoria sobre agentes etiológicos de infecciones de vías urinarias y de riñones. Estos resultados *in vitro* no descartan una posible actividad antimicrobiana clínica de esta especie, pues debe considerarse la posibilidad de que el extracto acuoso interfiera con la adherencia y la formación de biopelículas bacterianas y levaduriformes.

Tabla 13. Actividad antimicrobiana de *J. spicigera*. **Sa:** *Staphylococcus aureus*; **Ef:** *Enterococcus faecalis*; **Ec:** *Escherichia coli*; **St:** *Salmonella typhi*; **Ca:** *Candida albicans*; **Tm:** *Tricophyton mentagrophytes*; **Tr:** *Tricophyton rubrum* NP= no probado

Compuesto Probado	CMI (mg/mL)						
	Sa	Ef	Ec	St	Ca	Tm	Tr
Extracto Hexánico	3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	3.0	3.0
Extracto EtOH	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	3.0	3.0
Infusión	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0
Gentamicina	0.002	0.002	0.004	0.004	NP	NP	NP
Miconazol	NP	NP	NP	NP	NP	0.004	0.004
Nistatina	NP	NP	NP	NP	0.008	NP	NP

V.8 Determinación de la actividad antiprotozoaria (Método en Placa)

Determinación de la actividad sobre *Entamoeba histolytica*:

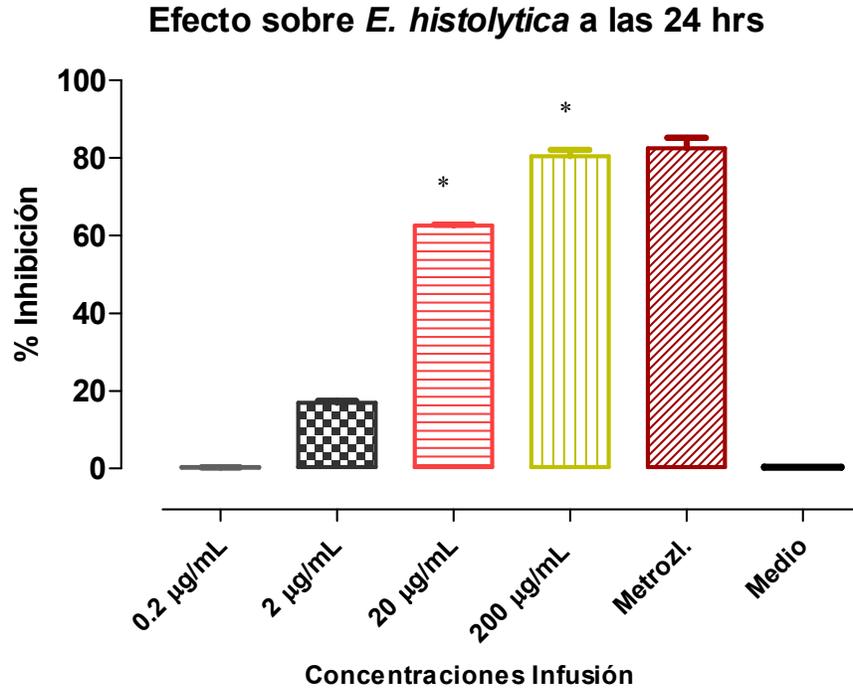
Se llevó a cabo utilizando únicamente la infusión de *Justicia spicigera* a las concentraciones de 0.2, 2, 20, 200 $\mu\text{g/mL}$. Se empleó metronidazol como control positivo para inhibir el crecimiento en una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ y como control de crecimiento, medio de cultivo. En la Gráfica 1 y la Tabla 14 se puede apreciar un efecto inhibitorio de crecimiento de la infusión a 20 y 200 $\mu\text{g/mL}$ sobre *E. histolytica*, de 62.3 y 83.5 % que se mantiene a las 48 hrs 63.4 y 70 % respectivamente (Gráfica 2 y Tabla 15), tiempo en el que la concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ manifestó también un incremento en su actividad contra este parásito (56%). Estos resultados concuerdan con lo descrito en la literatura de esta especie sobre sus populares contra la disentería (Macotela, 1994) en este caso se estaría aplicando para combatir la disentería amibiana.

Tabla 14. Promedio de resultados de lecturas para la infusión a las 24 hrs metronidazol control (+) y medio como control (-). Porcentaje de inhibición (%I) y Porcentaje de crecimiento (%C). N= 3

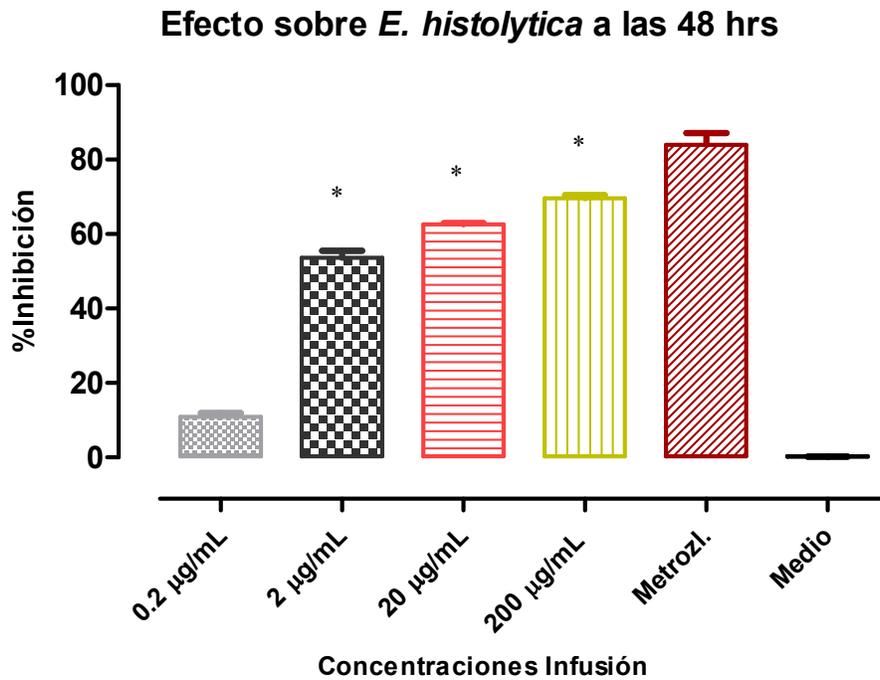
24hrs	Ctrl Medio	Metronidazol [100 $\mu\text{g/mL}$]	INFUSIÓN [$\mu\text{g/mL}$]			
			0.2	2	20	200
Promedio	control	Ctrl(+)				
%C	100	20.5	102	82.2	37.7	16.5
%I	0	79.5	-2	17.8	62.3	83.5

Tabla 15. Promedio de resultados de lecturas para la infusión a las 24 hrs metronidazol control (+) y medio como control (-). Porcentaje de inhibición (%I) y Porcentaje de crecimiento (%C). N= 3

48hrs	Ctrl Medio	Metronidazol [100 $\mu\text{g/mL}$]	INFUSIÓN [$\mu\text{g/mL}$]			
			0.2	2	20	200
Promedio	Control	Ctrl (+)				
%C	100	23	87.2	44	36.6	30
%I	0	77	12.8	56	63.4	70



Gráfica 1. Resultado de porcentos de inhibición promedio para todo el experimento a las 24 hrs. *P<0.05 respecto al control.



Gráfica 2. Resultado de porcentos de inhibición promedio para todo el experimento a las 48hrs *P<0.05 respecto al control.

V.9.Determinación de la actividad antiprotozoaria (Ensayo en Tubo)

La Tabla 16 muestra los resultados del ensayo de actividad antiprotozoaria en tubo. Los valores de la concentración inhibitoria media (CI_{50}) obtenidos por parte de los extractos ensayados muestran menor actividad que los compuestos de referencia. Sin embargo, los resultados en *E. histolytica* coinciden en cierta medida con los observados en las pruebas en placa (Grafica 1 y 2) pues todos los compuestos probados tienen actividad contra este parasito. La actividad obtenida por parte de los extractos se considera poco significativa comparada con los compuestos de referencia tomando en consideración que se trata de extractos primarios que se encuentran en mezclas complejas. Por otro lado, como se observa en la Tabla 16 el extracto metanólico fue el que presento la mayor potencia inhibitoria contra *E. histolytica*, por lo que se decidió fraccionar (ver metodología) este extracto utilizando hexano, acetato de etilo (AcOEt), cloroformo ($CHCl_3$) y butanol (n-BuOH) y evaluar la actividad de estas fracciones (Tabla 17)

Tabla 16. Evaluación antiprotozoaria de *J. spicigera*. JS-I: Infusión, JS-H: extracto hexánico, JS-M: extracto metanólico.

Muestra	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>T. vaginalis</i>
JS-H	63.16	71.86	92.65
JS-M	61.79	72.79	88.41
JS-I	65.83	87.84	100.07
Metronidazol	0.04	0.21	0.037
Emetina	1.05	0.42	1.00

La tabla 17 muestra que las fracciones hexánica y n-butanólica provenientes del extracto metanólico presentan una mayor potencia inhibitoria contra *E. histolytica* y *G. lamblia* con CI_{50} de 55.63 y 36.85 $\mu\text{g/mL}$ que son bastante relevantes, sin embargo, ninguno mejoro en potencia a los controles. Con estos resultados se podrá justificar el uso de *J. spicigera* contra la disentería parasitaria.

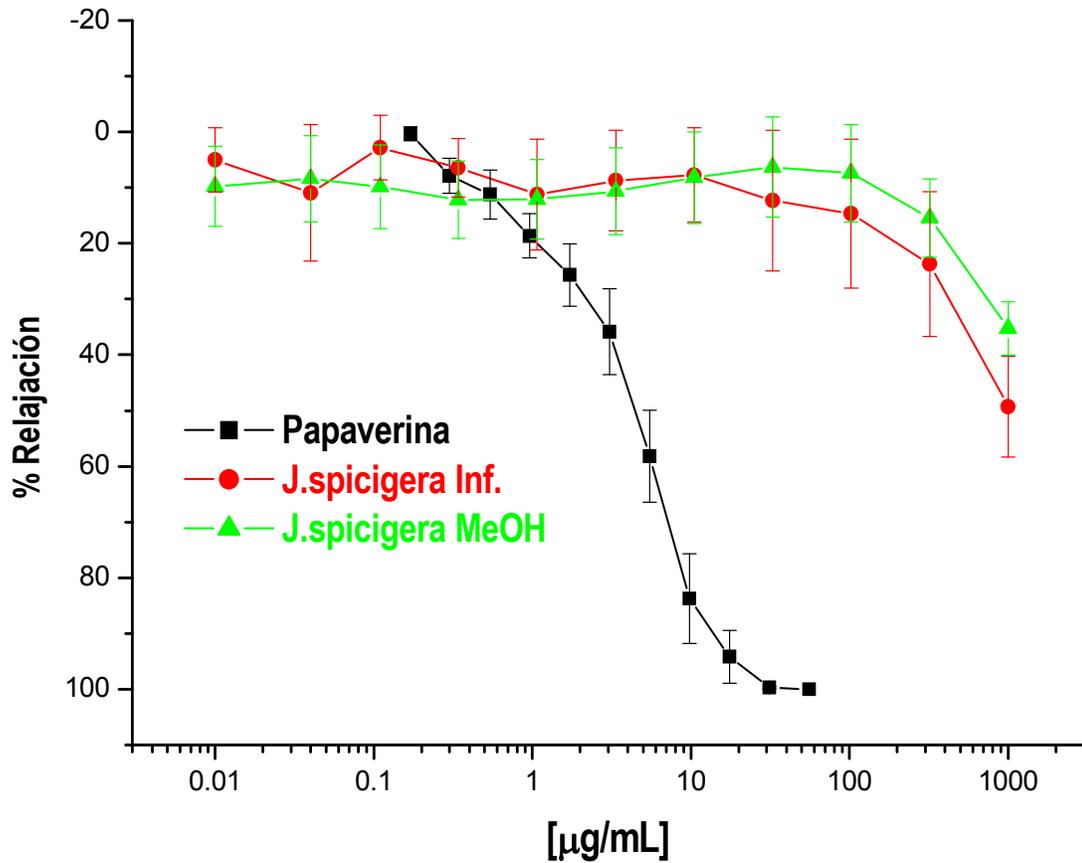
Tabla 17. Evaluación antiprotozoaria de fracciones derivadas del extracto metanólico de *J. spicigera*. JS-2-Hex: fracción hexanica, JS-2-AcOEt: fracción de acetato de etilo, JS-2-CHCl3: fracción clorofórmica, JS-2-nBuOH: fracción butanolica.

Muestra	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>T. vaginalis</i>
JS-2-Hex	55.63	71.20	81.83
JS-2-AcOEt	63.95	81.49	87.56
JS-2-CHCl3	66.32	74.82	88.43
JS-2-nBuOH	60.15	36.85	80.70
Metronidazol	0.04	0.21	0.037
Emetina	1.05	0.42	1.00

En la literatura científica, Macotela en 1994 y en 2001 encontró actividad contra *Giardia duodenalis*, Peraza-Sánchez en 2005 también observó mortalidad sobre trofozoítos de *Giardia lamblia* ($IC_{50} = 117.4 \mu\text{g/mL}$) ambos ensayando el extracto MeOH de partes aéreas. En nuestros estudios el extracto metanólico de partes aéreas presentó también actividad antiprotozoaria y una IC_{50} menor a la previamente reportada de 72.79 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente al fraccionar dicho extracto se mejoro la actividad, particularmente en la fracción más polar y contra *Giardia lamblia* (JS-2 n-BuOH = 36.85 $\mu\text{g/mL}$). Lo anterior confirma la actividad de *J. spicigera* contra dicho parasito e indica que los metabolitos responsables de dicha actividad inhibitoria son los más polares de este extracto.

V.10. Determinación de actividad relajante sobre músculo liso de rata (ileon)

Como se puede apreciar en la Gráfica 3 los dos extractos probados mostraron discreta actividad relajante a dosis de 1000 $\mu\text{g/mL}$. En contraste, la papaverina produjo el efecto mayor esperado.



Grafica 3. Actividad relajante de Infusión y extracto MeOH de *J. spicigera* sobre músculo liso aislado de rata.

V.11. Determinación de la actividad sobre la enzima transcriptasa reversa (RT):

En la Tabla 18 y la Gráfica 4 se pueden ver los resultados correspondientes al ensayo de inhibición de transcriptasa reversa. Se puede ver claramente que ninguno de los extractos probados presentó mayor actividad que el control, sin embargo, podemos apreciar que la infusión tiene una inhibición de 37.62% siendo ésta actividad la más relevante de todos los extractos probados.

Tabla 18. Promedio de resultados de lecturas de cada extracto junto con el control de vehículo y el control positivo (Nevadipina) Por ciento de inhibición (%I).

Promedio	DMSO	Nevadip	Hex	MeOH	Infusión
%I	0.09	99.53	17.56	18.44	37.62

Ensayo de transcriptasa reversa *J. spicigera*

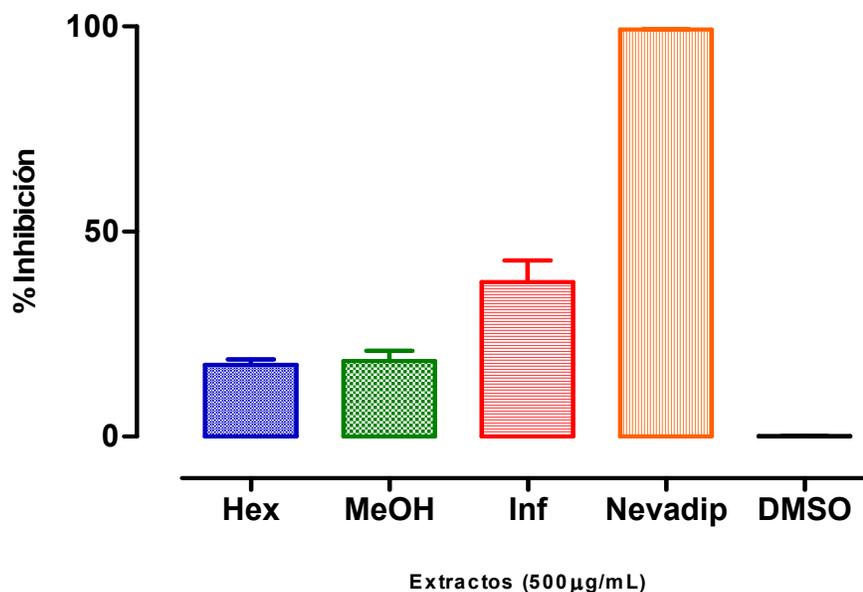


Gráfico 4. Resultado de por ciento de inhibición promedio para el ensayo de transcriptasa reversa Hex (extracto hexánico), MeOH (extracto metanólico), Inf (Infusión), Nevadip (control positivo, nevadipina), DMSO (Dimetilsulfoxido), todos probados a 500µg/mL.

V.12 Determinación de la citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas

Se realizaron las pruebas de citotoxicidad a la infusión, al extracto hexánico y al extracto MeOH de partes aéreas de *Justicia spicigera* (Tabla 19).

Tabla 19. Evaluación citotóxica de *J. spicigera*. JS-I: Infusión, JS-H: Extracto hexánico, JS-M: Extracto metanólico. U251: Glía de sistema nervioso central, PC-3: Cáncer de Próstata, K652: Leucemia, HCT-15: cáncer de Colon, MCF-7: Cáncer de mama, y SKLU-1: Cáncer de pulmón

		Por ciento de inhibición del crecimiento por cada una de las líneas celulares					
Muestra	Código	U251	PC-3	K652	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
JS-I	RCR-7	21.18	25.47	49.73	20.08	12.95	36.13
JS-H	RCR-8	43.8	23.52	54.9	47.72	40.81	60.35
JS-M	RCR-9	25	27.1	54.72	45.65	15.85	39.76

Para extractos primarios que en general no están puros, se considera efecto citotóxico relevante, cuando el extracto produce un porcentaje de inhibición mayor a 50 %. En la Tabla 19 se observa que el extracto hexánico (JS-H) tiene un porcentaje de inhibición de 54.9% para el caso de células leucémicas (K562), y de 60.4% para las células de cáncer de pulmón (SKLU-1). Este segundo efecto es el más relevante de todos. Por otro lado todos los extractos probados mostraron especificidad contra células leucémicas de la línea K652.

Nuestros resultados concuerdan con lo encontrado por Cáceres-Cortes en el 2000, en donde se encontraron factores citotóxicos en una línea de células leucémicas humanas en las cuales también indujo apoptosis. Nuestros resultados

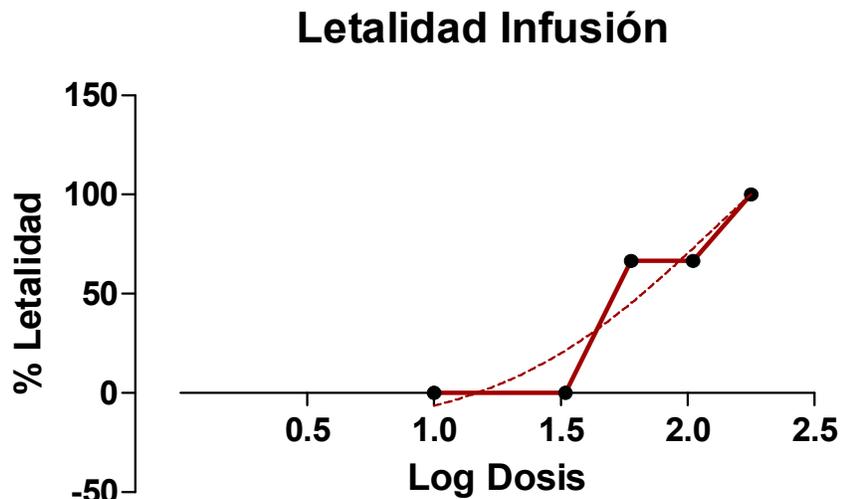
confirman que esta especie tiene actividad contra este tipo de células. Sin embargo, se requiere de un análisis más detallado.

En el caso del extracto hexánico sobre la línea de células de pulmón SKLU-1 sobre las cuales presentó un porcentaje de inhibición importante (60.4%) abre una interrogante acerca de que tan potente y como pudiera comportarse particularmente en células de este tipo, ya que no existe ningún tipo de antecedente sobre esta especie contra el cáncer de pulmón.

V.13. Determinación de la toxicidad aguda y perfil neurofarmacológico

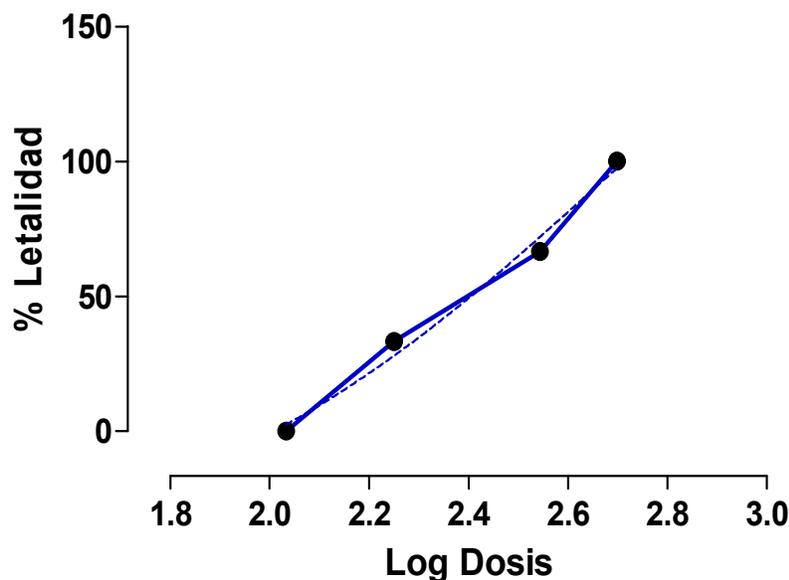
Determinación de toxicidad aguda

En las Graficas 5 y 6 se observan los resultados correspondientes para las curva de letalidad de la infusión (Grafica 5) y el extracto metanólico (Grafica 6) donde podemos apreciar una diferencia en la potencia de la infusión con respecto al extracto.



Gráfica 5. Curva dosis respuesta cuantal. Infusión.

Letalidad Extracto MeOH



Gráfica 6. Curva dosis respuesta cuantal. Extracto MeOH

Para calcular los límites de confianza al 95% y la dosis letal media (DL_{50}) de las graficas 5 y 6 se utilizó el método de Litchfield-Wilcoxon para ensayos y determinaciones de toxicidad aguda (Baez, 2004).

Tabla 20. Límites con un 95% de confianza y Dosis letal media (DL_{50})

Sustancia prueba	DL_{50} (mg/Kg)	Límite superior	Límite inferior
Infusión	63.3	89.2	47.3
Extracto MeOH	222.6	297.8	166.4

Los resultados obtenidos en ratón fueron extrapolados a humanos para tener una idea más real del grado de toxicidad, mediante la siguiente fórmula, que es utilizada para la determinación de toxicidad ambiental, por vía oral (Baez, 2004):

$$DHE = DSA (H/A)^{2/3}$$

en donde:

- Dosis equivalente en Humanos (DHE): $-DSA = \text{Dosis administrada a cada animal (DL}_{50})$,

-H= peso promedio de humanos (70kg), A = peso promedio de animal utilizado (20g)

La Tabla 21 muestra los resultados de la DHE calculada con los datos obtenidos en ratones tratados con el extracto MeOH y la infusión de *Justicia spicigera*

Tabla 21. Dosis extrapolada a humanos (DHE) y Dosis letal media (DL₅₀)

Sustancia utilizada	DL ₅₀ (mg/Kg)	DHE(mg/Kg)
Infusión	63.3	14.6
Extracto MeOH	222.6	51.5

Observe que la infusión produce la mayor toxicidad. Sin embargo, la dosis letal media (DL₅₀) se considera dentro de la categoría de medianamente tóxica. Por lo que respecta a los resultados de los estudios macroscópicos y pesos correspondientes a los diferentes órganos, se pudo observar que en el caso de bazo e hígado, la mayor dosis de infusión produjo esplenomegalia y hepatomegalia (Gráficas 7 y 8). Ninguno de los otros órganos analizados (corazón, pulmón, etcétera), presento cambios relevantes morfológicos ni con respecto a su peso.

Para el caso de las necropsias realizadas en los ratones tratados con el extracto MeOH, se pudo observar que murieron a las dosis más altas y presentaron vasodilatación en los intestinos, lo que indica actividad sobre músculo liso venoso intestinal (Figura 16).

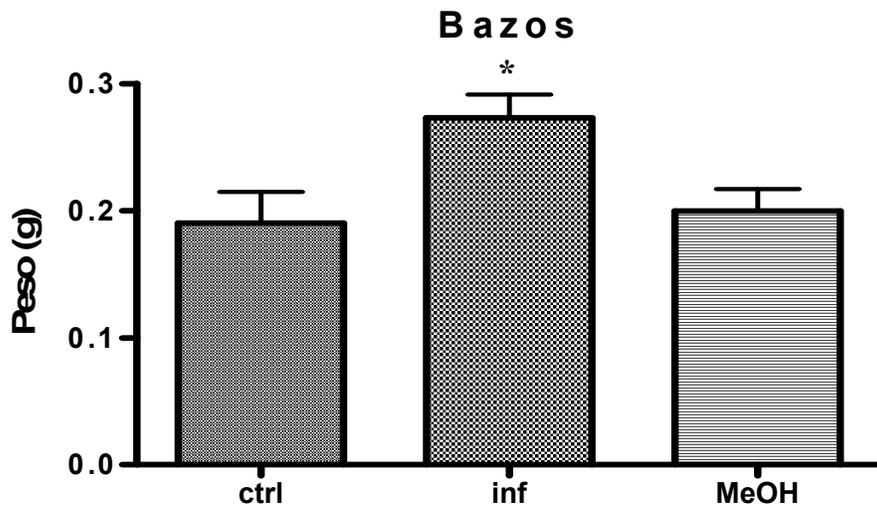


Gráfico 7. Variación de peso de bazos de animales tratados con infusión (INF), con extracto metanólico (MeOH), y con SSI (Ctrl). * $P < 0.05$ con respecto al control

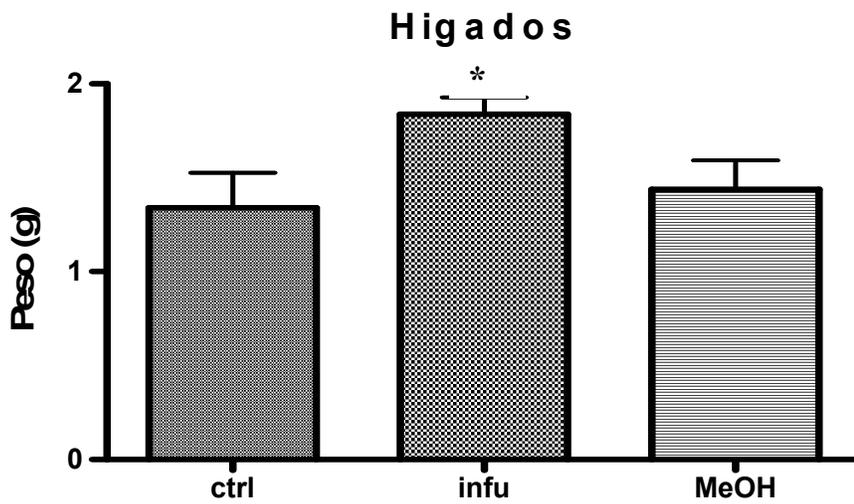


Gráfico 8. Variación de peso de hígados de animales tratados con infusión (INF), con extracto metanólico (MeOH), y con SSI (Ctrl). * $P < 0.05$ con respecto al control

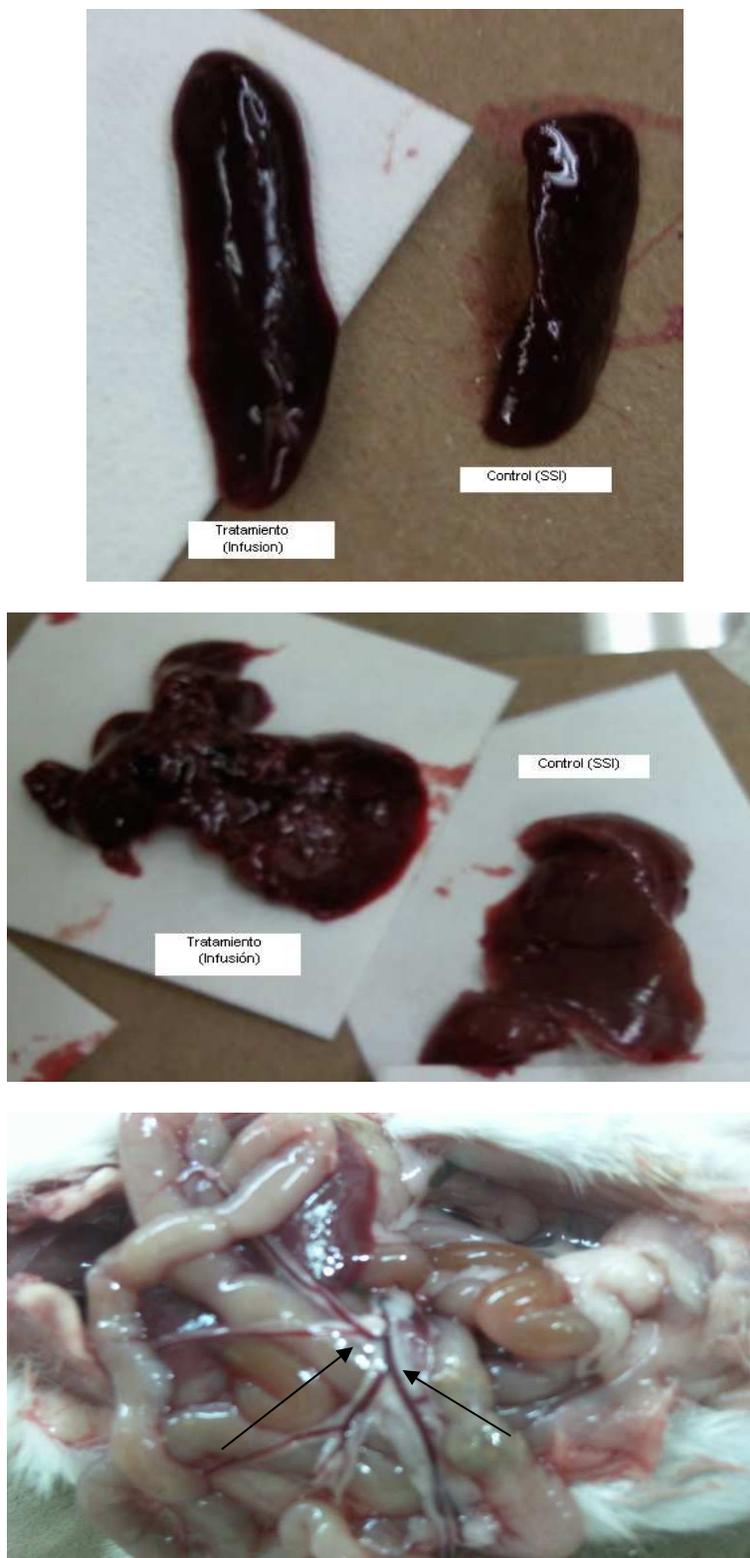


Figura 16. Esplenomegalia (infusión), Hepatomegalia (infusión) y Vasodilatación intestinal (extracto MeOH) correspondiente a las necropsias

V.14.PRUEBAS HISTOPATOLÓGICAS

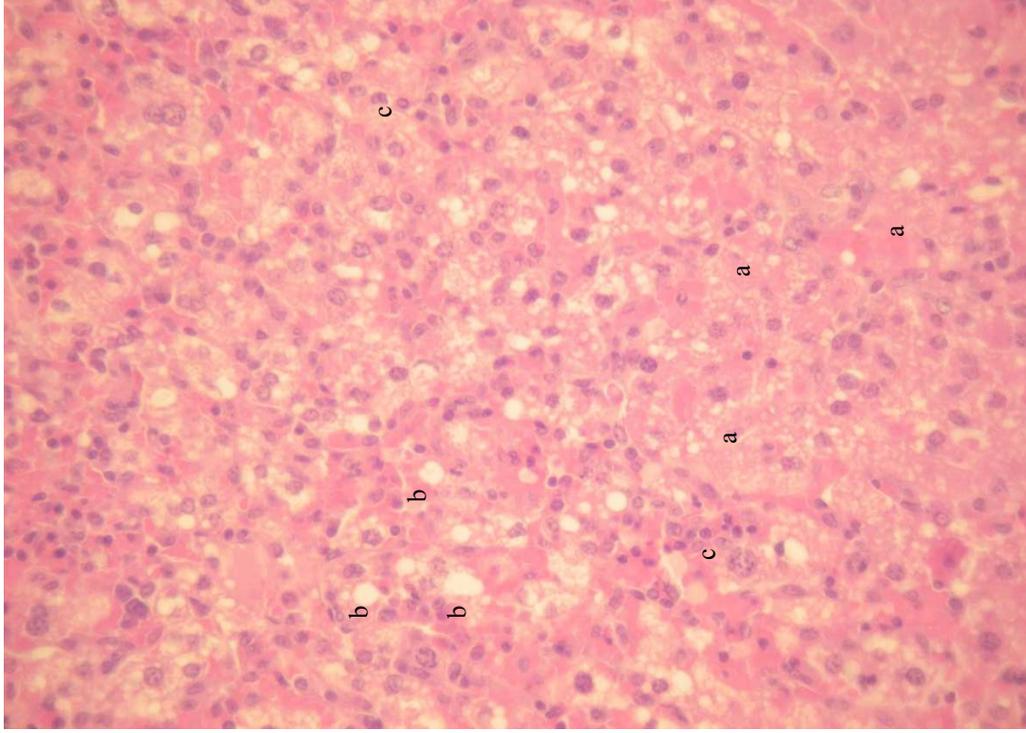


Figura 17. Fotomicrografía 20X. Hígado de animal tratado con extracto MeOH. Se observan extensas áreas de necrosis(a), con hepatocitos con clara esteatosis (b), y filtrados inflamatorios (c).

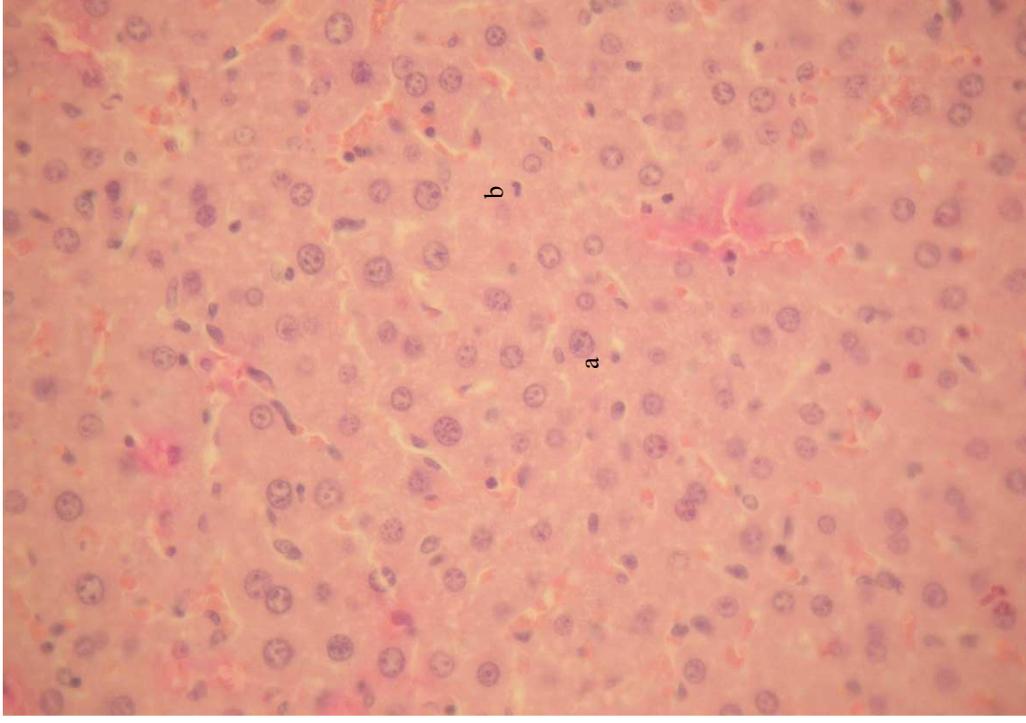


Figura 18. Fotomicrografía 20X. Hígado de animal control tratado únicamente con SSI. Se observa el patrón normal hígado con hepatocitos (a) y células de Kupffer (b).

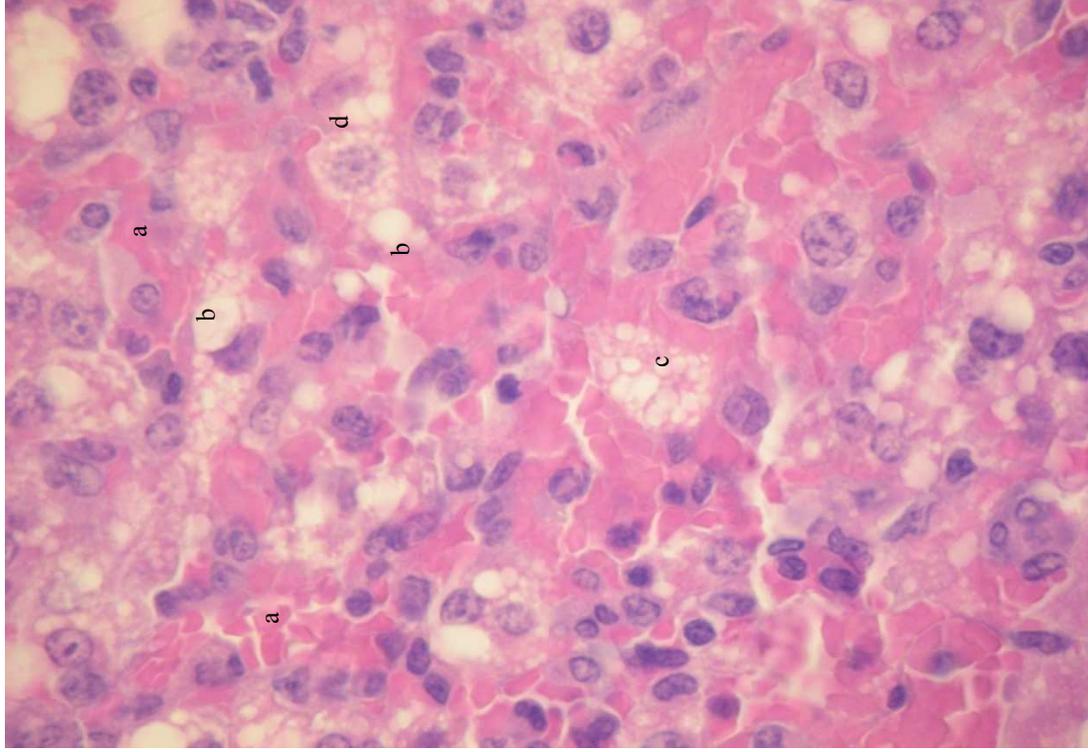


Figura 19. Fotomicrografía 100X de hígado de animal tratado con extracto MeOH. Al desaparecer los hepatocitos los eritrocitos ocupan el espacio entre ellos (a), esteatosis en gota fina (b), gota gruesa (c) y vesículas intracitoplasmáticas esteatofíticas propias de necrosis (d).

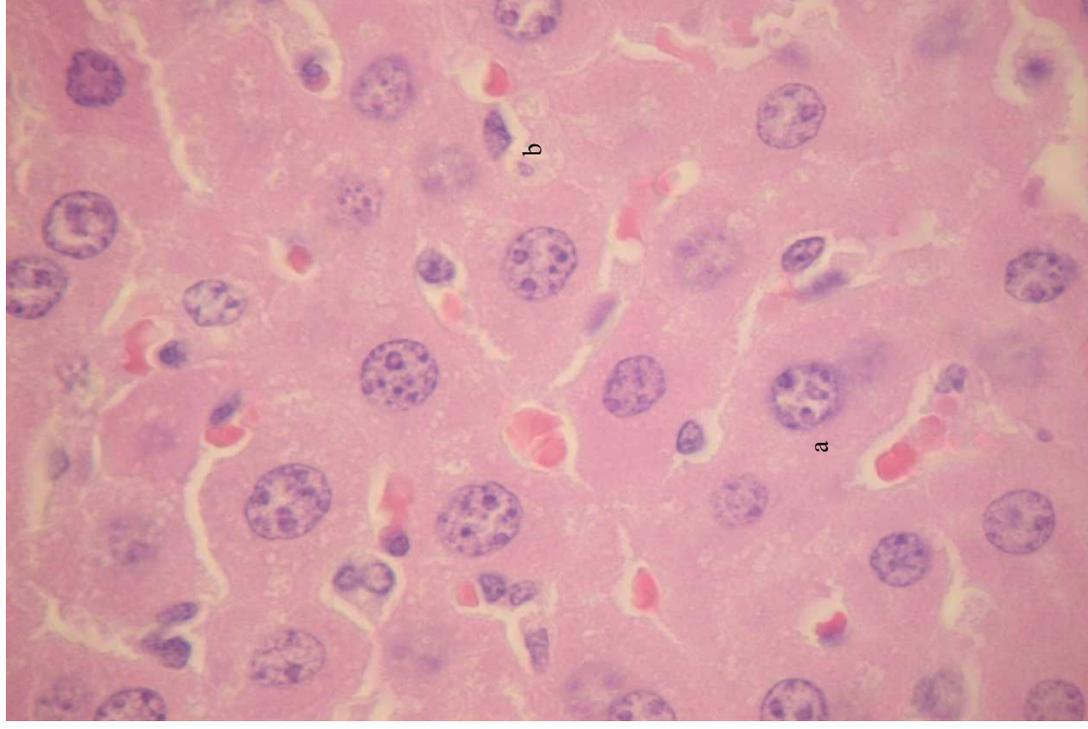


Figura 20. Fotomicrografía 100X de hígado de animal control tratado con SSI. Se puede ver un patrón normal de hepatocitos (a), y células de Kupffer (b).

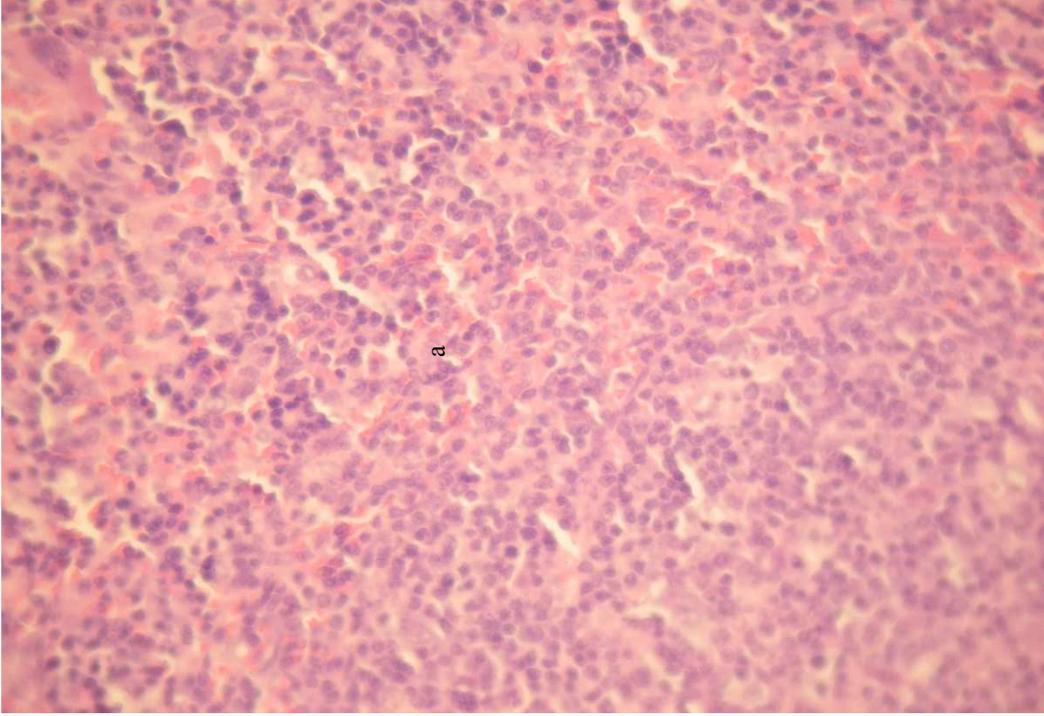


Figura 21. Fotomicrografía 20X de bazo de animal tratado con extracto MeOH. Se puede ver un incremento de la densidad de pulpa roja (a) propio de una esplenomegalia retrograda provocada principalmente por alguna alteración circulatoria o algún proceso inflamatorio

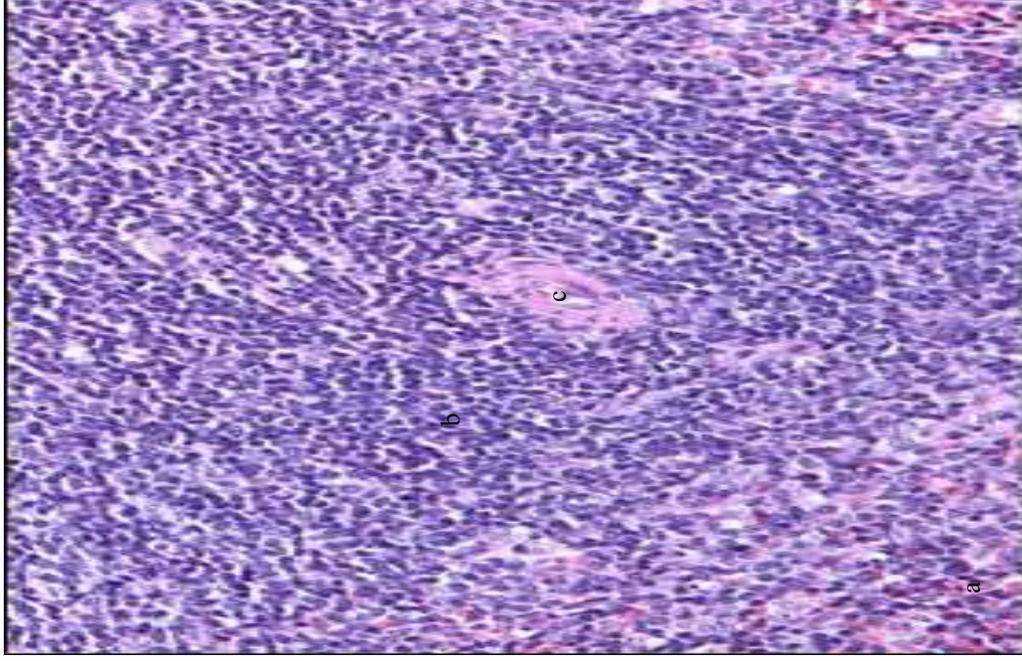


Figura 22. Fotomicrografía 20X de bazo de animal tratado con extracto MeOH. Con el patrón normal de pulpa roja (a) y pulpa blanca (b) y la arteriola central (c).

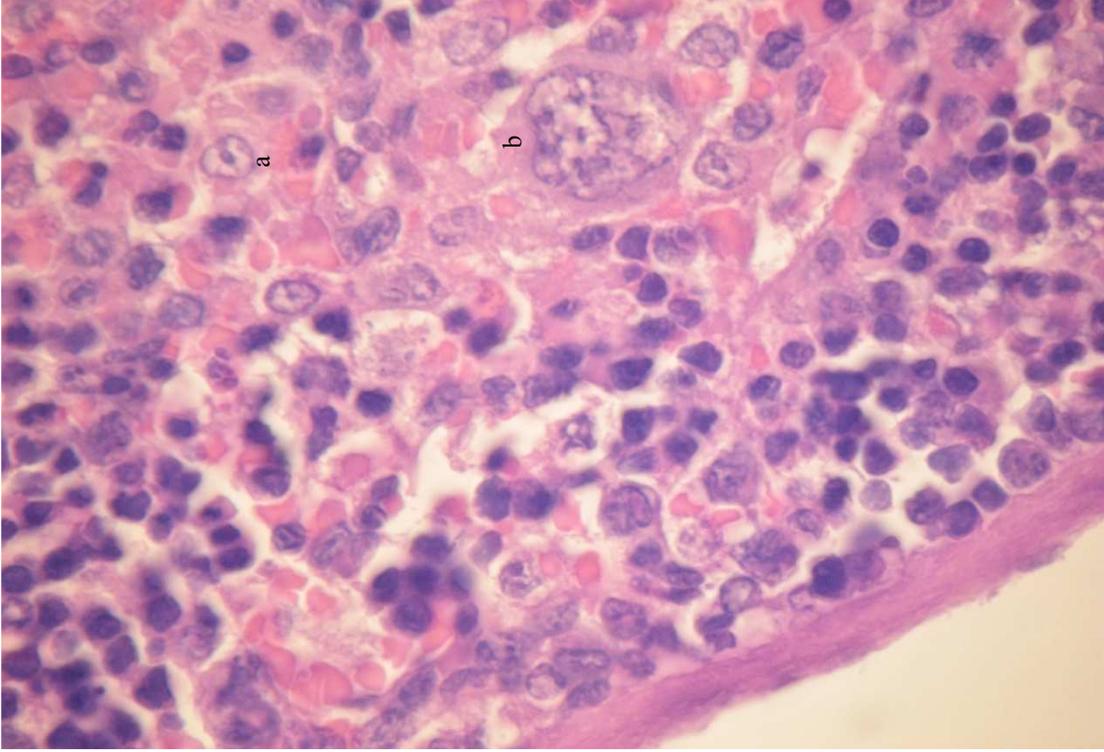


Figura 23. Fotomicrografía 100X de bazo de ratón tratado con extracto MeOH. Se puede ver un incremento en la densidad de pulpa roja, células esteróicas (a) y un incremento en el tamaño de megacariocitos (b)

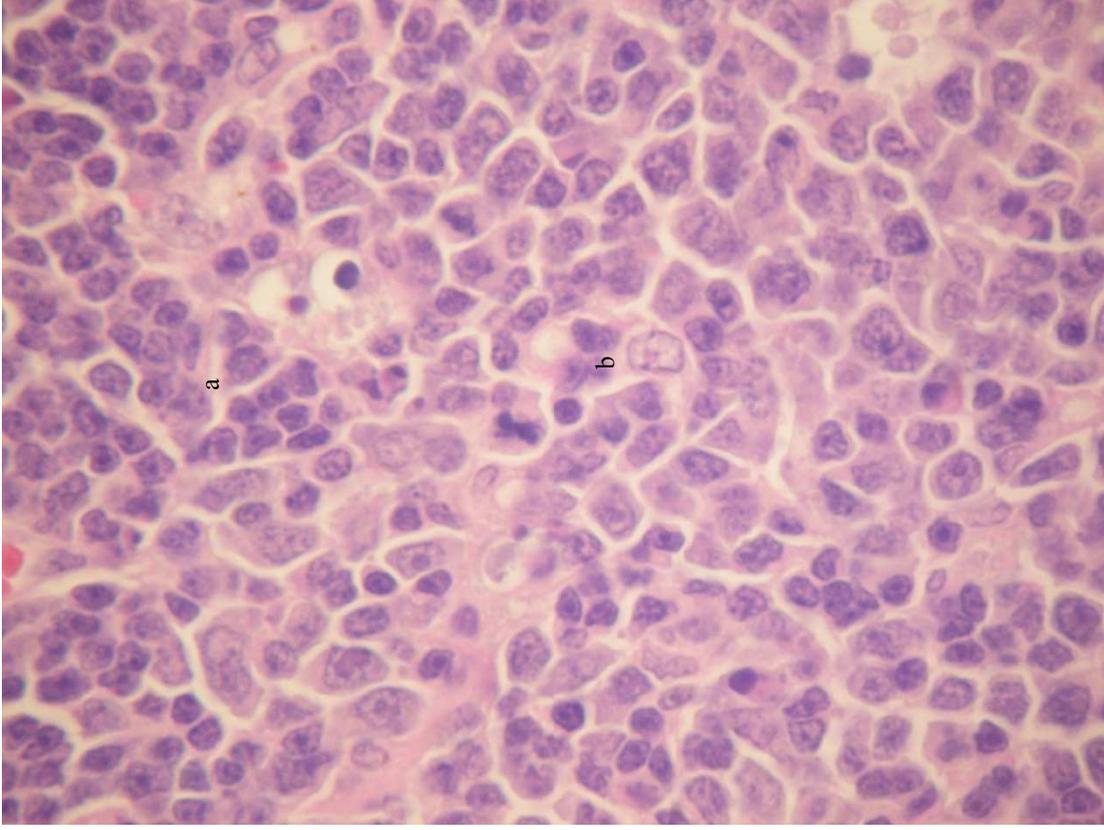


Figura 24. Fotomicrografía 100X de bazo de ratón control tratado con SSI. Se puede ver un patrón normal de pulpa roja, megacariocitos (b), reticulocitos (a).

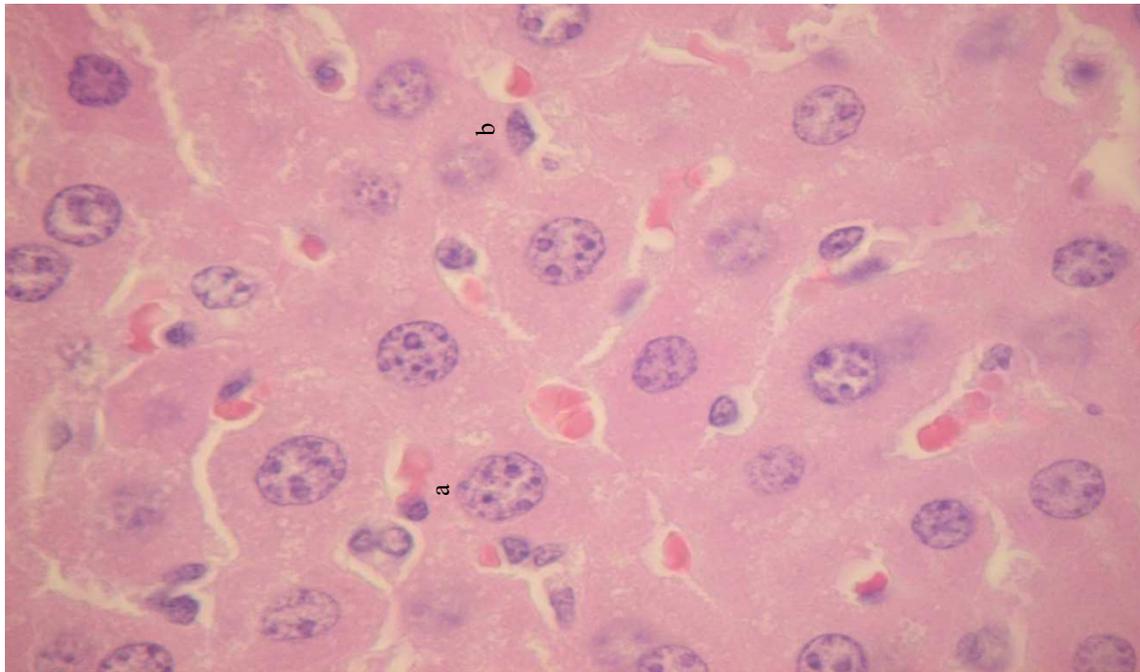


Figura 26. Fotomicrografía 100X de hígado de animal control tratado con SSI. Se puede ver un patrón normal de hepatocitos (a), y células de Kupffer (b).

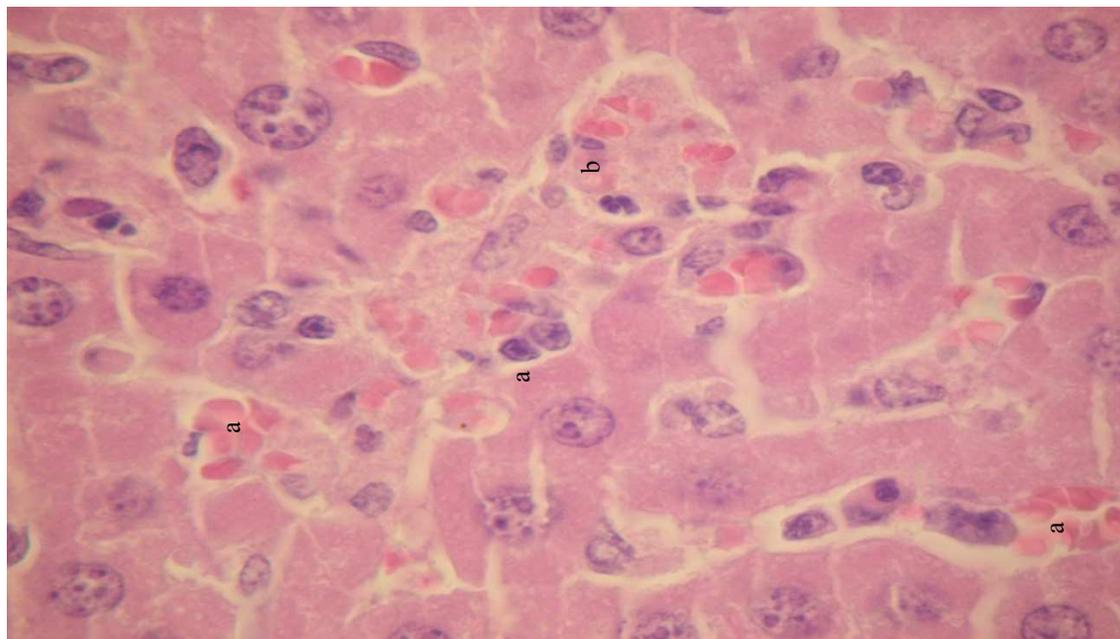


Figura 25. Fotomicrografía 100X de hígado de ratón tratado con infusión. Se puede ver vasodilatación además de una gran cantidad de eritrocitos (a), y filtrado inflamatorio (b) que indican hepatomegalia

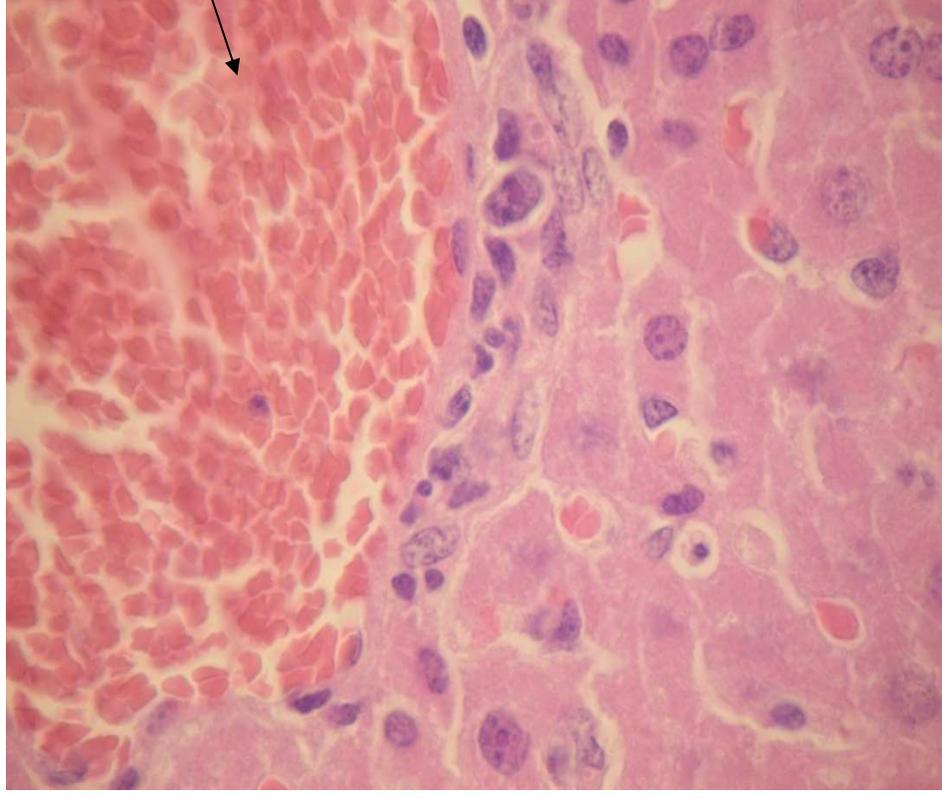


Figura 27. Fotomicrografía 20X de hígado de ratón tratado con infusión. Se puede ver claramente una gran concentración de eritrocitos, por lo que esto explica el incremento en el volumen observado físicamente.

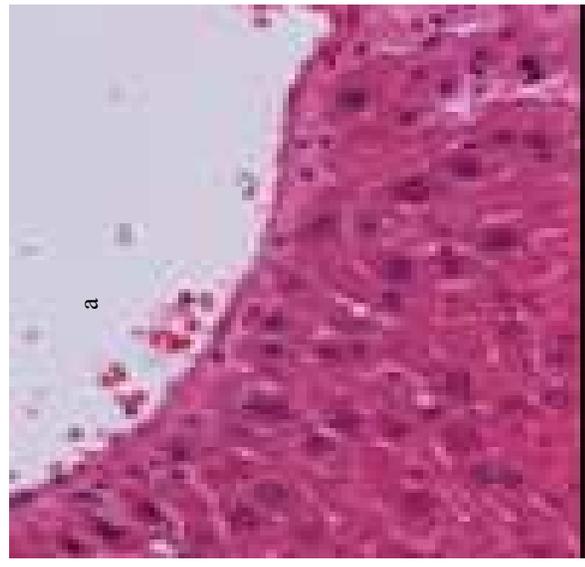


Figura 28. Fotomicrografía 20X de hígado de animal control tratado con SSI. Se puede ver un patrón normal de hepatocitos y un patrón normal sin edema (a).

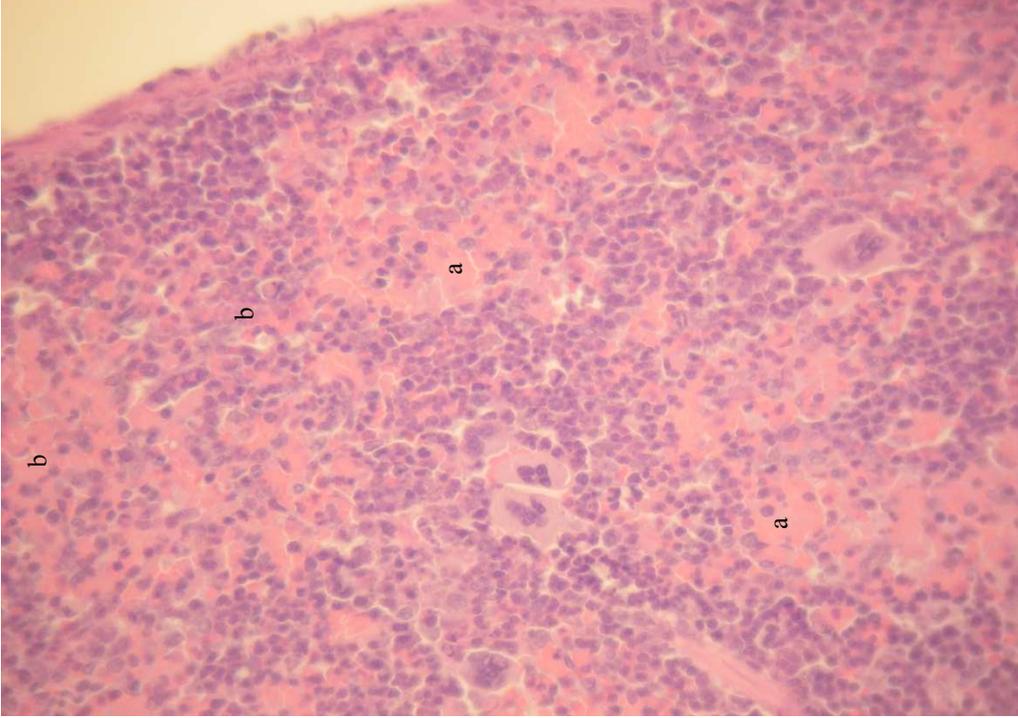


Figura 29. Fotomicrografía 20X de bazo de ratón tratado con infusión. Se observa un incremento en la pulpa roja (a), y gran cantidad de eritrocitos lo cual denota edema propio de esplenomegalia sin embargo no se observa necrosis.

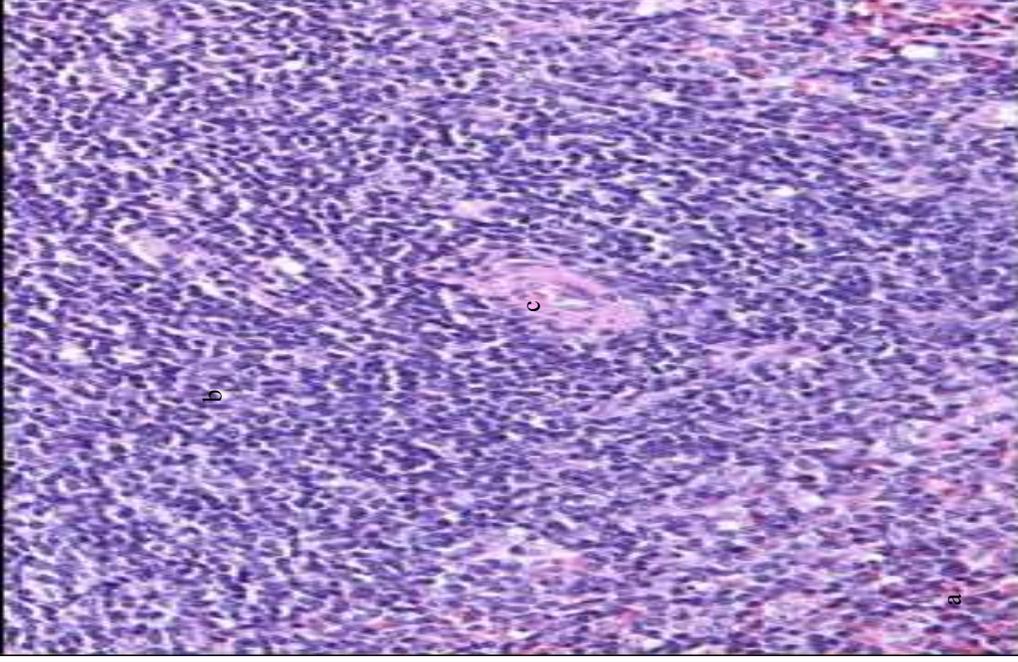


Figura 30. Fotomicrografía 20X de bazo de animal tratado con extracto MeOH. Con el patrón normal de pulpa roja (a) y pulpa blanca (b) y la arteriola central (c).

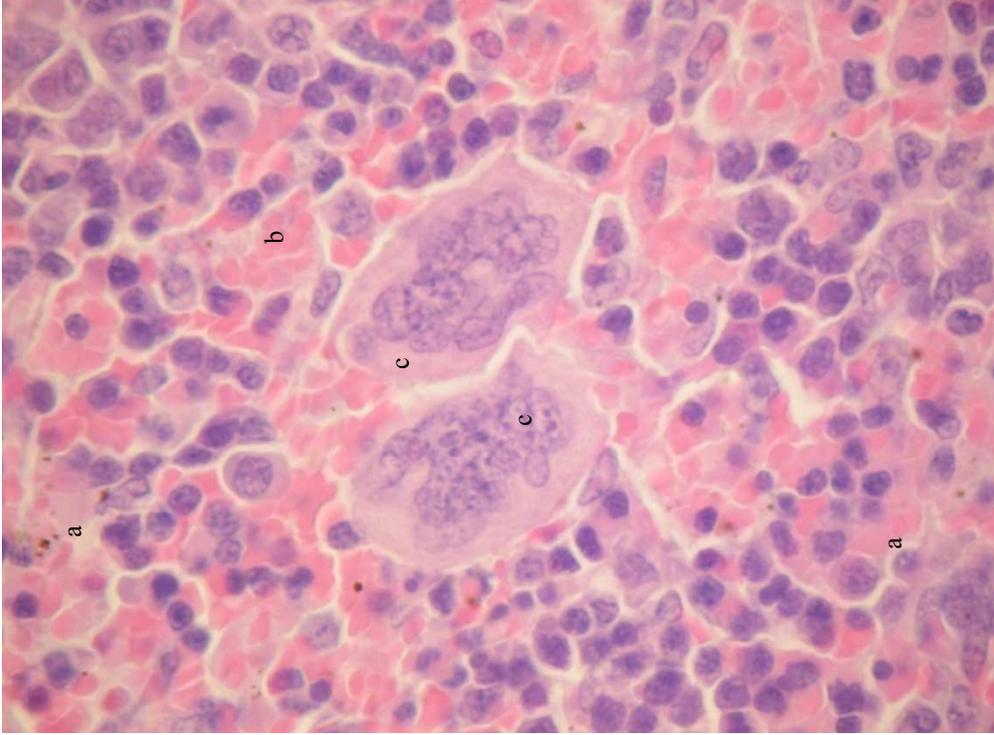


Figura 31. Fotomicrografía 100X de bazo de ratón tratado con infusión. Se puede ver un claro incremento de la pulpa roja (a) eritrocitos en exceso (b), y un incremento en el tamaño de los megacariocitos (c).

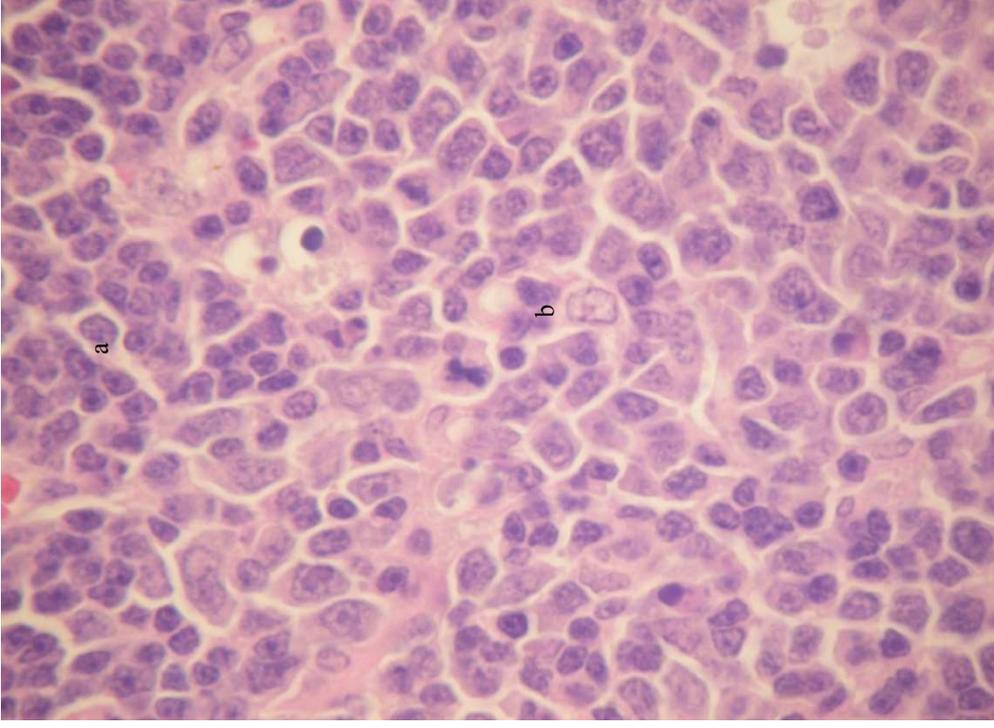


Figura 32. Fotomicrografía 100X de bazo de ratón control tratado con SSI. Se puede ver un patrón normal de pulpa roja, megacariocitos (b), reticulocitos (a).

Discusión micrografías

Extracto MeOH

En las Figuras 17, 19 referentes a las micrografías de hígado de ratón al cual fue administrado por vía i.p. extracto MeOH (comparadas con las Figuras control 18 y 19), se puede ver claramente manifestación de esteatosis en gota gruesa y gota fina ya que se observa en los hepatocitos gotas lipídicas que pueden ser de gran tamaño o relativamente pequeñas, en vesículas intraplasmáticas (células espumosas) lo cual indica un caso agudo de toxicidad. Además, se puede ver filtrado inflamatorio que indica daño a este tejido. Ya que el hígado es el lugar de síntesis, almacenamiento y procesamiento de lípidos, cerca del 5 al 50% de su peso es grasa, por lo cual, cualquier tipo de interferencia con este tejido causa acumulación de esta en el hígado al alterarse la regulación en el metabolismo de ésta. Con los datos obtenidos podemos ver que el extracto interfiere de manera importante en el metabolismo de las grasas y esto daña a los hepatocitos probablemente a través de interferencia con el metabolismo de los mismos hepatocitos o mediante lipoperoxidación, lo cual se aprecia en las zonas que presentan necrosis.

En el caso de las Figuras 21 y 23 referentes a las micrografías de bazo de ratón administrado por vía i.p. con extracto MeOH, (comparadas con las Figuras control 22 y 24) se puede ver claramente un incremento en la densidad de la pulpa roja así como células altamente vacuoladas lo cual indica necrosis. Esto probablemente ocurre ya que el bazo es el primer filtro de la sangre y la base de su función filtrante es a través de las mallas del retículo de la pulpa roja. Con esto, los elementos figurados entran en contacto íntimo con los macrófagos ahí ubicados, razón por la cual el extracto tuvo que haber pasado por este filtro inicialmente y al contener metabolitos tóxicos estos provocaron una descompensación celular que derivó en incremento de la pulpa roja redundando en un incremento de tamaño del bazo, sin embargo al ser un órgano terminal

siempre vuelve a regresar a su tener su tamaño original, por esto no se observo incremento en la necropsia incremento alguno.

Infusión

En el caso de las Figuras 25 y 27 referentes a las micrografías de hígado de ratón administrado por vía i.p. con Infusión se puede ver gran cantidad de eritrocitos y filtrado inflamatorio, además existe edema y necrosis (comparadas con las Figuras 26 y 28 correspondientes a los controles). Lo anterior confirma lo visto previamente en la necropsia donde se observó hepatomegalia (Figura 16 y Gráfica 8). Las causas que pudieron haber ocasionado dicha hepatomegalia, pudieron ser: a) Inflamación, debida a algún metabolito tóxico en la infusión, que además de dañar al hígado provocó necrosis en los hepatocitos, b) congestión, debida a falla cardíaca probablemente al momento de la muerte, y c) la existencia de algún tipo de metabolito que interaccionara con alguna vía en el metabolismo del hígado y con esto provocando una descompensación en el metabolismo que genera acumulación de metabolitos en el órgano mencionado y con esto un incremento en el volumen del hígado.

En las Figuras 25 y 26 referentes a las micrografías del bazo de ratón tratado con infusión (al compararlas con las Figuras 28 y 29 correspondientes a los controles), se puede ver claramente un aumento en la densidad de pulpa roja al igual que con el extracto metanólico, y por la misma causa, ya que el bazo representa el primer filtro de la sangre, por lo que los metabolitos responsables de la toxicidad, actuaran primariamente sobre este órgano desestabilizandolo celularmente, sin embargo, en este caso a diferencia del anterior se observa gran cantidad de eritrocitos lo cual nos habla de edema, conservado hasta después del momento de la muerte y lo cual confirma la esplenomegalia vista en la necropsia (Figura 16 y Grafica 7). Las principales causas de la esplenomegalia aguda vista en el bazo tratado, pueden deberse al trastorno inflamatorio provocado por los metabolitos tóxicos de la infusión. Se descarta que un infarto haya producido la

esplenomegalia puesto que al ser el bazo un órgano terminal el tejido dañado se reabsorbe y regresa a su tamaño original, lo cual no sucedió.

Cabe destacar que los dos extractos provocan daño al hígado; en el caso del extracto metanólico es claro que existe cierta interacción sobre el metabolismo de ácidos grasos, y en el caso de la infusión faltaría ver el tipo de daño que se está provocando puesto que es una necrosis que no presenta grandes cantidades de vesículas intracitoplasmáticas, ya que no existe necrosis que no esté acompañada de apoptosis para lo cual son necesarias vesículas endocíticas.

En cuanto al bazo (Figuras 29 y 31) es interesante destacar que se produjo esplenomegalia al compararlos con el control (Figura 30 y 32) por parte de la infusión de partes aéreas en este órgano, sin embargo no existe apoptosis o daño en las células puesto que existen en la literatura reportados factores citotóxicos en células hematopoyéticas además de inducción de apoptosis en células progenitoras (ambos tipos de células se pueden encontrar en bazo) (Cáceres-Cortes et al., 2000), además otro punto importante es el aumento en el tamaño de los megacariocitos pues se podría estar hablando de hiperesplenismo aunque faltarían estudios de función para ver el mecanismo de acción y el tipo de metabolitos tóxicos que podrían estar provocando este incremento en la función.

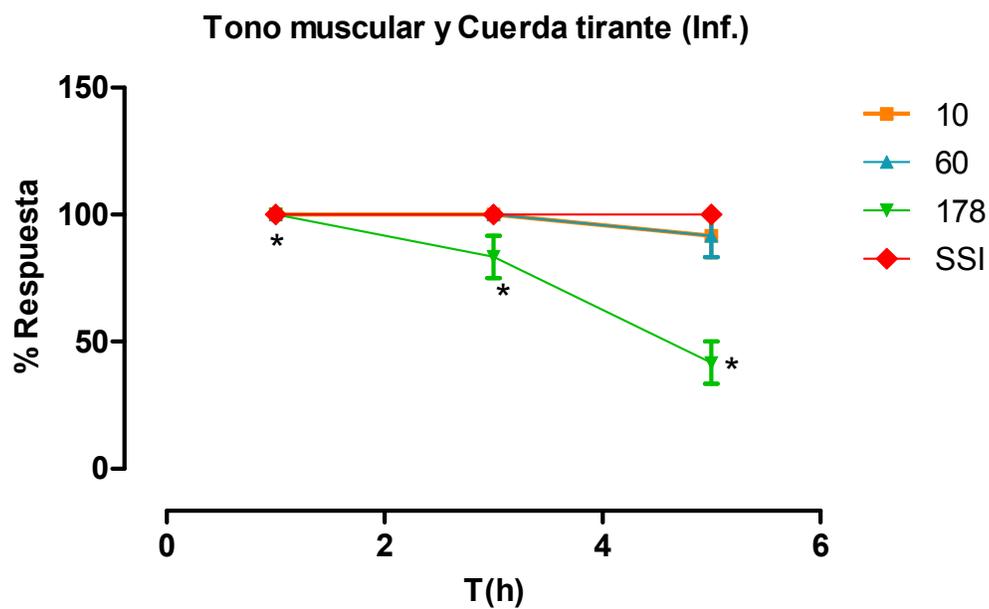
V.15. Perfil neurofarmacológico de Irwing

Los resultados de los datos obtenidos con la administración intraperitoneal de extracto MeOH e infusión para las pruebas de plano inclinado, catatonía, fuerza muscular y cuerda tirante (Figura 33) a las 1, 3, y 5 hrs. se aprecian en la Gráficas 9-15. Es importante aclarar que para las demás pruebas del estudio no se observaron efectos relevantes.

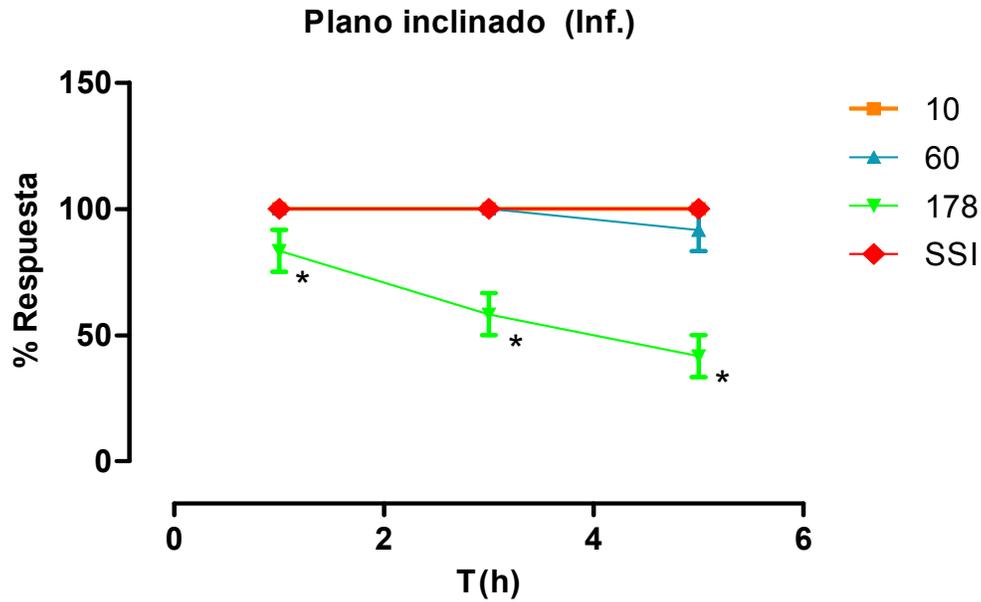


Figura 33. Pruebas del perfil neurofarmacológico en donde el extracto MeOH y la Infusión mostraron mejor actividad, prueba del plano inclinado(izquierda) y prueba de la cuerda tirante (derecha).

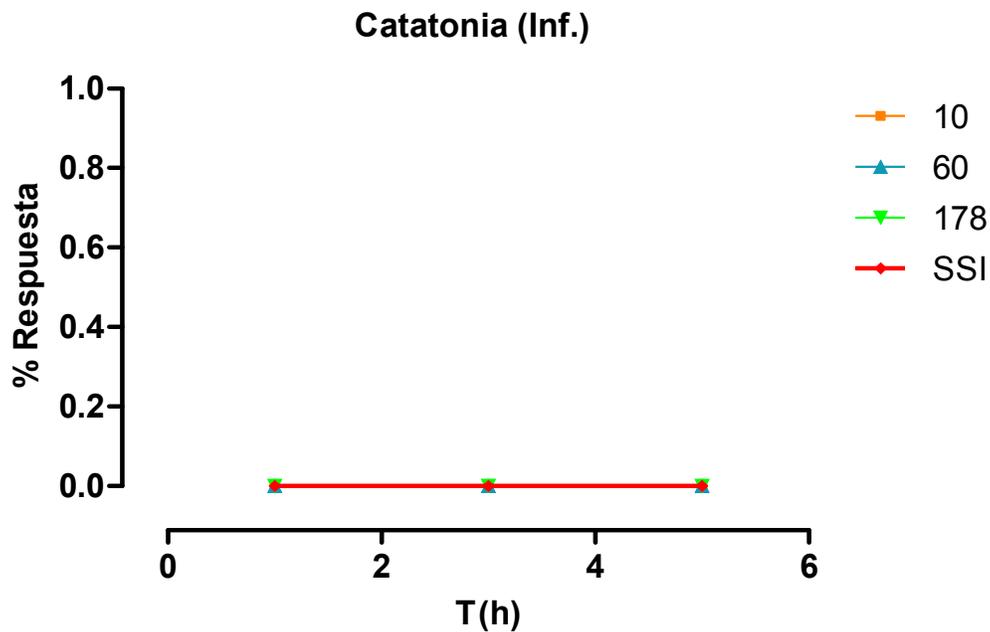
Las gráficas 9-15 fueron construidas con los resultados de los tratamientos empleados (infusión y extracto MeOH) a diferentes concentraciones:



Gráfica 9. Tono muscular y prueba de la cuerda tirante para tres dosis de 178, 60 y 10 (mg/kg) de infusión administradas en forma independiente por vía i.p. y una dosis de SSI (0.1mL/10g) como control. *P<0.01 con respecto al control.



Gráfica 10. Plano inclinado (motilidad) mediante la prueba del plano inclinado para las dosis de 178, 60 y 10 mg/kg de infusión administradas en forma independiente por vía i.p. y una dosis de SSI (0.1mL/10g) como control. *P<0.01 con respecto al control.

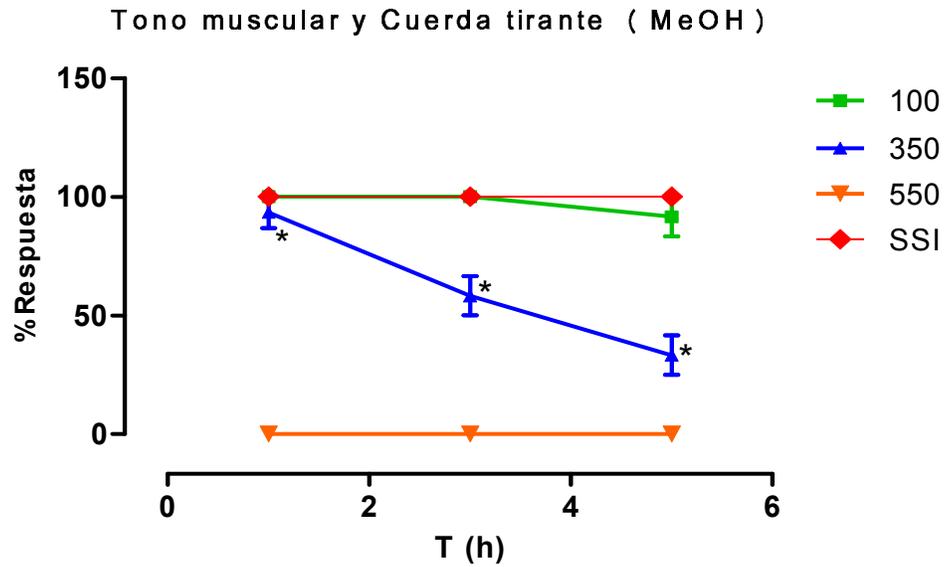


Gráfica 11. Catatonía a las tres dosis de 178, 60 y 10 (mg/Kg) de infusión administradas en forma independiente por vía i.p. y una dosis SSI (0.1mL/10g) como control. *P<0.01 con respecto al control

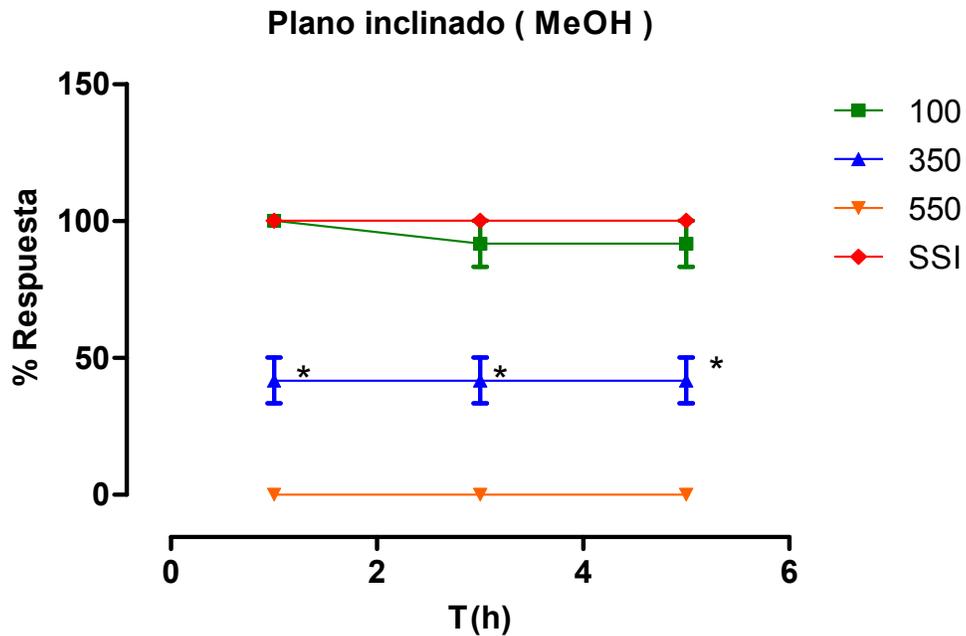
Otras observaciones para la infusión fueron: pasividad, temblor, y apertura palpebral afectada.

En la Gráfica 9 se puede ver que a la dosis de 178 mg/Kg disminuye el tono muscular y la respuesta a la cuerda tirante en más del 50 %. Estas respuestas pueden relacionadas con un posible efecto depresor sobre el sistema nervioso central, el cual podría estar relacionado además con la muerte de los animales. La Gráfica 10 muestra que la motilidad disminuye más del 50% con la misma dosis de 178 mg/Kg, este efecto también está relacionado con la actividad depresora del sistema nervioso central.

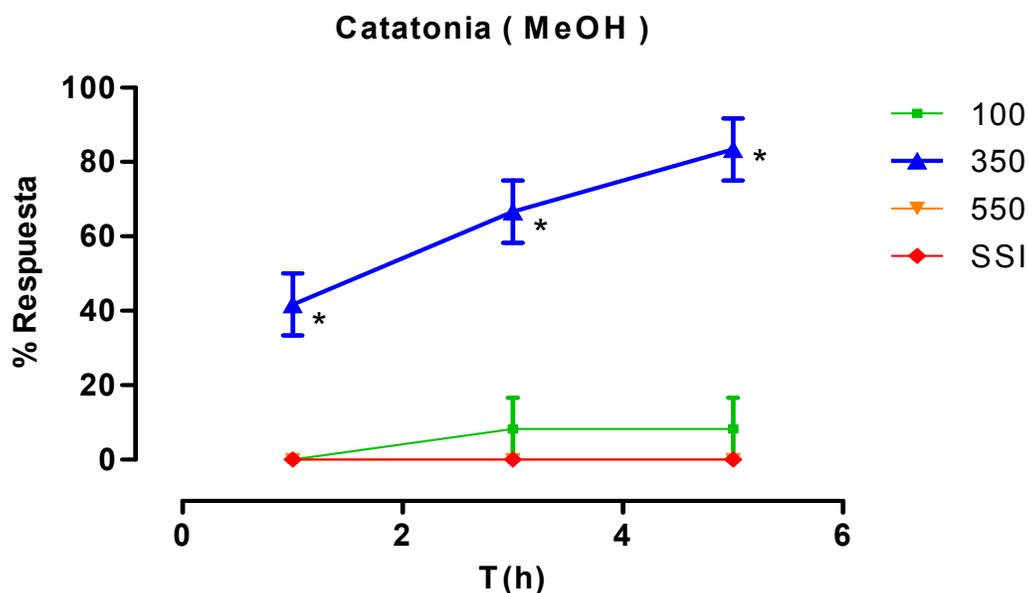
En la literatura científica consultada no existen reportes de actividad depresora por *Justicia spicigera*, sin embargo, uno de los usos populares es para estimular trastornos mentales y del sueño, lo que podría estar relacionado con cierta actividad inhibitoria del sistema nervioso central, cabe destacar que este es el primer reporte de actividad depresora sobre esta especie. *Justicia pectoralis* ("chamba"), especie Americana del mismo género, se utiliza en la medicina tradicional de Brasil como anestésica, por lo que no se descarta la presencia de algún metabolito secundario relacionado quimiotaxonomicamente entre ambas especies. En la gráfica 11 no se observó ningún efecto de catatonia.



Gráfica 12. Tono muscular y cuerda tirante para las dosis 100, 350, 550 mg/kg de extracto MeOH; SSI como ctrl. Cabe destacar que para la dosis de 550 mg/Kg los individuos murieron a la primer hora. *P<0.01 respecto al control.



Gráfica 13. Plano inclinado (motilidad) por el método de plano inclinado para las dosis 100, 350 y 550 mg/kg de extracto MeOH, SSI como ctrl. Cabe destacar que los individuos de la dosis de 550 mg/Kg murieron a la primer hora. *P<0.01 respecto al control



Gráfica 14. Catatonía (estupor) a las dosis 100, 350, y 550 mg/kg de extracto MeOH y SSI como ctrl. Cabe destacar que para la dosis de 550 mg/kg los individuos murieron a la primer hora. *P<0.01 respecto al control

- Otras observaciones para el extracto MeOH fueron: pasividad, temblor, enterramiento y afectación de la apretura palpebral.

La dosis de 350 mg/Kg del extracto MeOH disminuye el tono muscular, (Gráfica 12). Este efecto es semejante al provocado por la infusión (Gráfica 9), ya que en ambos casos disminuyen a menos de un 50% de respuesta, en el extracto MeOH entre la 1ª y 3ª hrs, y en la infusión entre la 3ª y 5ª hrs, esto puede ser debido a que en el extracto MeOH se extrajeron más eficientemente metabolitos activos.

En la Gráfica 13 se observa que el extracto MeOH a la dosis de 350mg/kg disminuye la motilidad de los animales en forma semejante a la infusión en dosis de 178 mg/kg (Gráfica 10). Es probable que múltiples diferencia de calidad y cantidad metabólica entre los extractos probados determinen las diferencias temporales de los efectos ya que a la dosis de 350 mg/kg desde la primer hora

modifica la motilidad manteniéndose esta situación a lo largo del experimento y con la infusión el efecto inhibitorio del 50% se alcanza a la 5ª hora (Grafica 10).

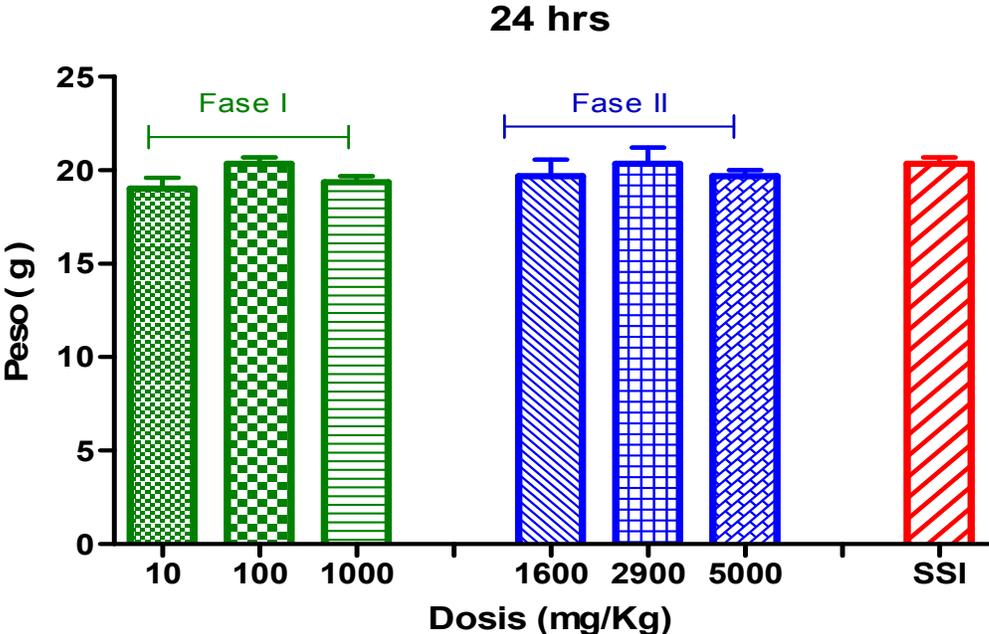
La dosis de 350 mg/kg de extracto MeOH produce catatonía (Grafica 14) este efecto no se había reportado en esta planta, sin embargo, en la medicina tradicional se utiliza para curar trastornos mentales y el espanto, lo que podría tener cierta relación con este efecto, aunque faltarían más estudios más profundos. *Justicia pectoralis* especie Americana perteneciente al mismo género, tiene antecedentes de usos como componente principal de un preparado de ceremonias religiosas en algunas tribus de Sudamérica (Mc Rae *et al.*, 1984), por lo que no se descarta una actividad semejante.

- **V.16. Determinación de la toxicidad aguda por el método de Lorke (vía oral).**

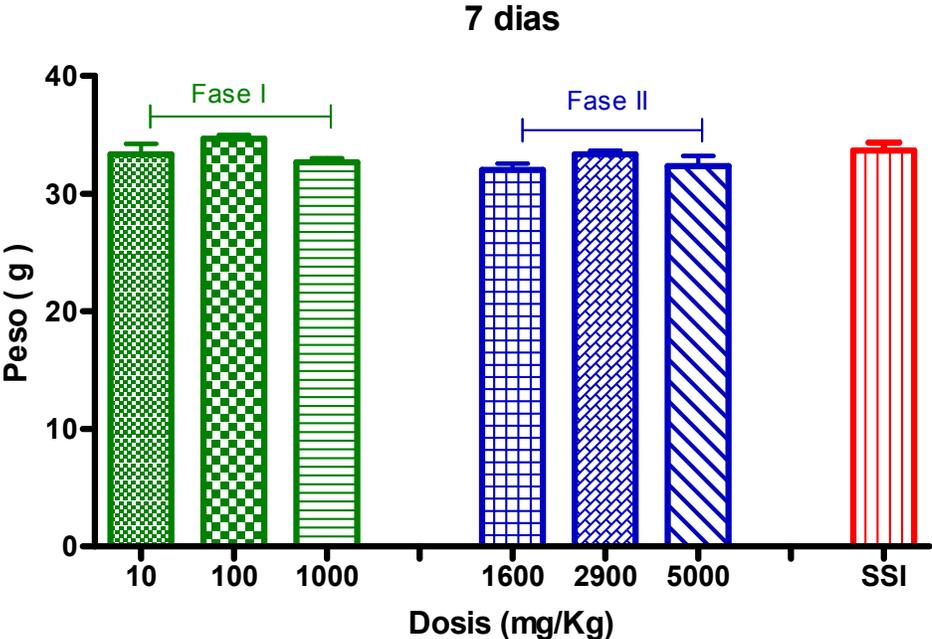
La toxicidad aguda se obtuvo empleando únicamente la infusión debido a que presentó la mayor toxicidad administrado por vía i.p. y además, es la forma de preparación utilizada en la medicina tradicional. Se empleó el método de Lorke (1983) permitiendo obtener resultados con una menor cantidad de animales y mayor rapidez. En la Tabla 22 se muestran los resultados correspondientes a las dos fases del método de Lorke con las respectivas dosis empleadas para cada fase, asimismo en las Graficas 15-17 se muestran los resultados de variación de peso para los animales empleados en el tiempo del tratamiento.

Tabla 22. Resultados de la evaluación de toxicidad aguda vía oral, de la infusión de *J. spicigera*

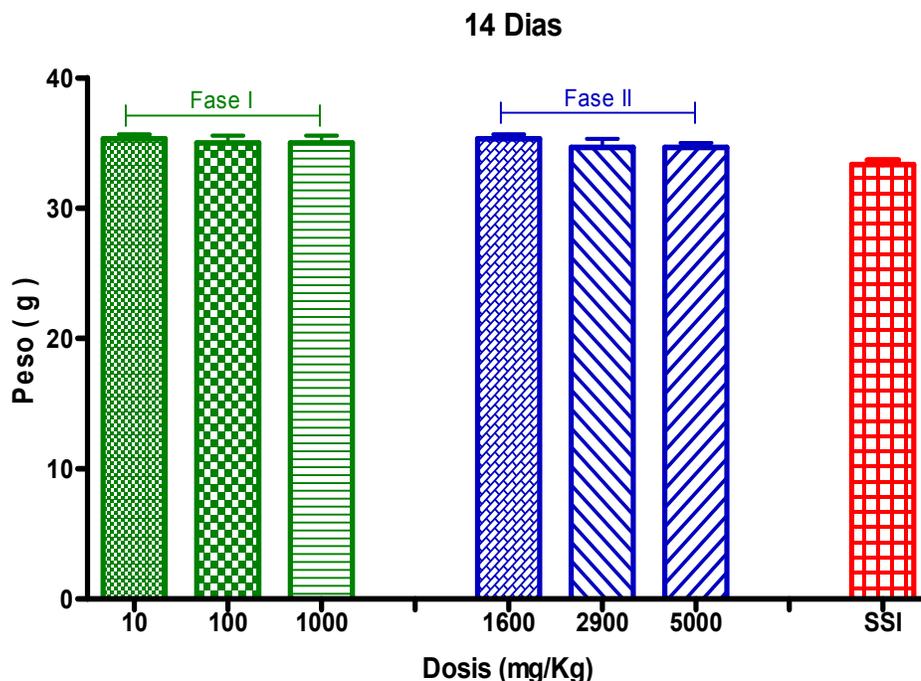
.	Fase I (mg/Kg)			Fase II (mg/Kg)			LD ₅₀ (mg/Kg)
	10	100	1000	1600	2900	5000	
Infusión (Vía oral)	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	>5000



Gráfica 15. Variación del peso corporal durante las dos fases a las 24 hrs



Gráfica 16. Variación del peso corporal durante las dos fases a los 7 días.



Gráfica 17. Variación del peso corporal durante las dos fases a los 14 días.

La evaluación de la toxicidad aguda vía oral con la infusión, por el método de Lorke (1983). Este ensayo tiene la ventaja de requerir pocos animales y los resultados son obtenidos, en un tiempo relativamente corto. En las Gráficas 15, 16, y 17 se observan los pesos a las 24hrs, 7 días y 14 días de tratamiento. Como no se observó ningún deceso o alteraciones en el peso de los animales, los animales fueron sacrificados y en las necropsias tampoco se pudo observar ningún tipo de alteración morfológica en los órganos blanco (hígado, riñón y bazo), por lo que se llevo a cabo la segunda fase con dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/Kg a los 14 días de tratamiento tampoco se observo ningún deceso, alteración en el peso de los animales o alteración morfológicas en los órganos blanco, por lo que contrario a lo visto en la vía de administración i.p. en la que la dosis letal media fue de 63.3 mg/kg en esta vía, la dosis letal media de acuerdo al método de Lorke deberá ser mayor a 5000 mg/kg, estas diferencias en el efecto toxico al cambiar la ruta de administración pueden explicarse por los siguientes puntos:

1) *Los metabolitos bioactivos de la infusión, experimentan transformaciones a su paso por el tracto gastrointestinal, debidas a:*

Efecto del pH. Algunas moléculas poseen estabilidades químicas o iónicas, que son dependientes del pH, por lo que la magnitud de la absorción depende en alto grado del tiempo de exposición al fluido gástrico

Efecto de las enzimas: El fluido gastrointestinal contiene varias enzimas como la pepsina, la pancreatina, tripsina, lipasas, etc., esenciales para la digestión de los alimentos, por lo que puede esperarse que estas enzimas también puedan metabolizar ciertas moléculas. Las transformaciones químicas pueden ocurrir en el lumen y en la pared del tracto digestivo.

Efecto del mucus gastrointestinal: Esta substancia interactúa con las moléculas medicamentosas por dos mecanismos diferentes: primero, por su viscosidad disminuye la velocidad de difusión y segundo, fijándolos por intermedio de sitios aniónicos o por uniones hidrógeno.

Metabolismo inducido por microorganismos (Figura 34): Un gran número de moléculas medicamentosas pueden ser metabolizadas por los microorganismos gastrointestinales, si esto ocurre antes de que el compuesto sea absorbido, su biodisponibilidad se verá reducida, además estos microorganismos son capaces de originar numerosos tipos de biotransformaciones originando especies, inactivas de estos. Las reacciones inducidas por los microorganismos incluyen hidrólisis, deshidroxilaciones, decarboxilaciones y reducciones de grupos nitro y azo.

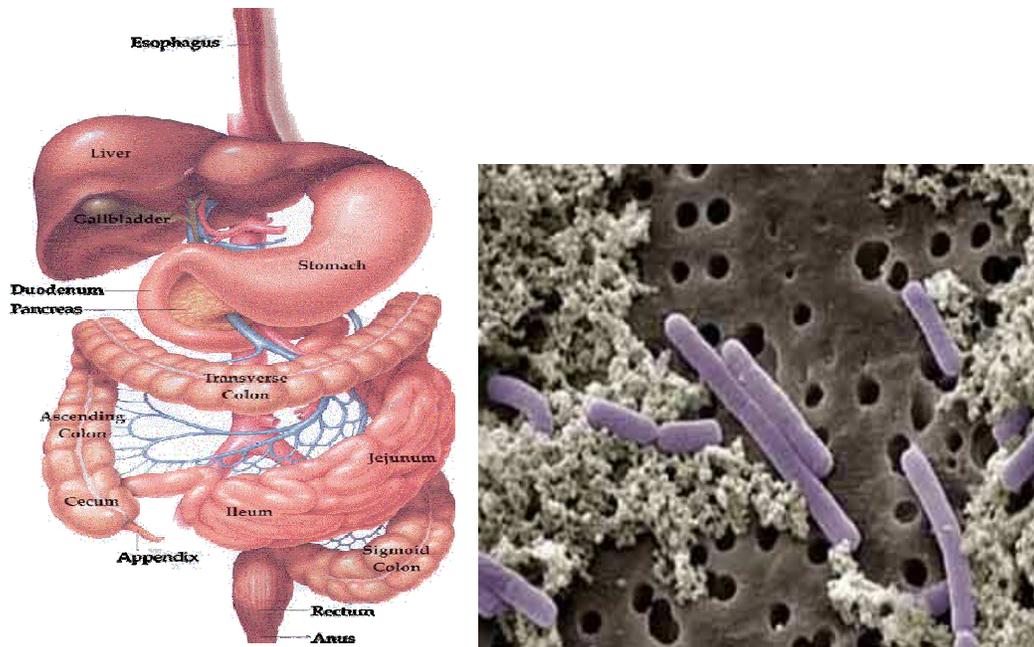


Figura 34. A la izquierda el sistema gastrointestinal y a la derecha una microscopia de *Lactobacillus sp.* Una de las principales bacterias Gram (+) metabolizadora de principios activos en el sistema gastrointestinal.

- 2) *Que la transferencia de los metabolitos o moléculas bioactivas de la infusión se modifiquen por las características anatómico-fisiológicas de las células epiteliales del intestino (uniones estrechas y transportadores):*

Las proteínas de la membrana celular actúan como moléculas especializadas de adhesión celular y áreas especializadas de la membrana incorporadas a las uniones celulares (uniones oclusivas) de esta manera presentan una aposición estrecha de las membranas celulares adyacentes (uniones estrechas), se observan en el epitelio del Intestino delgado (Figura 35). Estas uniones oclusivas tienen entre sus funciones la prevención de la difusión de moléculas entre células adyacentes (contribuyendo a la función de barrera de las células epiteliales e impidiendo de esta manera el paso de las moléculas tóxicas provenientes de la infusión, hacia el torrente sanguíneo, además existen algunos transportadores como por ejemplo la glicoproteína p que impiden que los fármacos pasen al torrente sanguíneo y

seguramente contribuyen a las diferencias observadas en la toxicidad por vía oral.

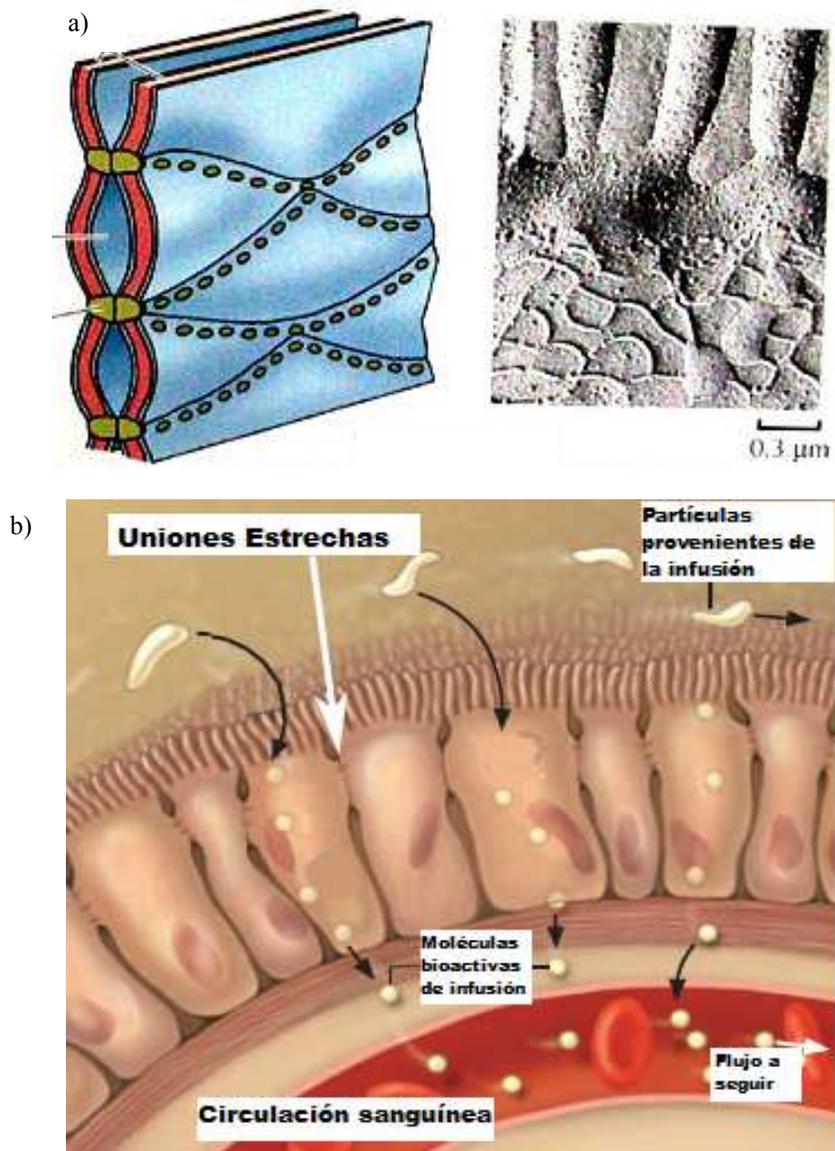


Figura 35. Uniones estrechas. En a) Se muestra un esquema derivado de una micrografía electrónica y en b) Se representa un esquema del flujo que seguirían las moléculas bioactivas de la infusión y cómo interaccionarían las uniones estrechas en dicho flujo.

VI.-CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

Acerca de las pruebas de eficacia de la especie Justicia spicigera:

Dentro de las pruebas de actividad antidiséptica: no se encontró actividad sobre motilidad intestinal en las pruebas de relajación de músculo liso, o en las de actividad antimicrobiana sobre bacterias enteropatógenas. En las pruebas antiparasitarias se encontró un efecto moderado sobre *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis* por parte de los extractos y fracciones, así como de la infusión, sin embargo la potencia en todos los casos fue menor a la del control.

No se observó efecto biocida sobre microorganismos relacionados con infecciones renales tales como *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*.

La infusión tiene un alto contenido de polifenoles (flavonoides y antocianidinas), azúcares y aminoácidos que pudieran estar involucrados en cierta manera con la actividad de los preparados de la planta contra la anemia, pues estas especies químicas tienen valor nutricional y antioxidante.

En el caso de la prueba de transcriptasa reversa para evaluar el efecto antiviral. El extracto más polar presentó una inhibición menor al 20%, y la infusión del 40% de la enzima tratada. Sin embargo, al tratarse estos de mezclas complejas de compuestos este porcentaje pudiera incrementar al ensayar con alguno de los compuestos puros.

Parámetros de seguridad:

Se observó un efecto tóxico importante en la prueba de toxicidad aguda vía i.p., tanto de la infusión como del extracto MeOH actuando en hígado y bazo, provocando en el caso de la infusión hepatomegalia y esplenomegalia; el extracto metanólico presentó vasodilatación a nivel gastrointestinal y necrosis en el hígado.

Se observó esplenomegalia en los animales tratados con la infusión, sin embargo, la observación histológica no denotó alteraciones tisulares por lo que, al ser el bazo el principal filtro de la sangre, pudiera tratarse de hiperesplenismo, relacionado con la actividad adjudicada en la medicina tradicional para limpiar la sangre.

La infusión demostró una dosis letal media de 63.3 mg/kg por vía i.p. que se considera en la categoría de medianamente tóxico, sin embargo, en el estudio por vía oral, se observó que no existe toxicidad alguna ($DL_{50} > 5000$ mg/kg), la cual indica seguridad en su empleo, ya que los compuestos tóxicos no pasarían la barrera entérica y sus diferentes componentes.

Estudio fitoquímico:

Se aisló el ácido vainillínico el cual es una molécula pequeña con actividades antimicrobiana y antiparasitaria reportadas, y que además se ha seleccionado para realizar el control de calidad de diferentes especies, su estructura se elucidó por métodos espectroscópicos.

El perfil metabólico tanto de la infusión como del extracto más polar es muy complejo y reveló la existencia de un gran contenido de polifenoles, de probable naturaleza flavonoide y antocianidinas, además de la existencia de triterpenoides, carotenoides, azúcares y aminoácidos.

Perspectivas

No fue posible aislar el o los metabolitos responsables de la actividad antiparasitaria, por lo que sería importante realizar un análisis más detallado para aislar los metabolitos responsables y demostrar su mecanismo de acción.

Para el caso de uso contra la anemia, será conveniente analizar detalladamente la acción de la infusión y extractos sobre la sangre y sus parámetros como hematocrito, hemoglobina, etcétera, para en su caso justificar su actividad contra esta patología.

Se recomienda probar el efecto antiviral evaluándolo a otro nivel, ya sea sobre exocitosis, o sobre la recepción y entrada del virus a la célula.

En cuanto a la toxicidad por diferentes vías habría que realizar un estudio farmacocinético con células intestinales como CaCo-2, glicoproteína-P, enzimas CYP450, así como la biotransformación de los metabolitos por bacterias entéricas, para analizar la causa de la diferencia de toxicidad por las diferentes vías de administración.

Para comprobar su uso en patologías que afecta los riñones y al no encontrarse efecto contra *C. albicans*, y *P. aeruginosa*, que son de los principales agentes etiológicos de infecciones renales serian pertinentes estudios de adherencia bacteriana y desarrollo de monocapas levaduriformes o sobre algún otro blanco farmacológico particular de patologías en este órgano.

VII.-BIBLIOGRAFIA

Acosta, S. y Daniel T.F. (1993). A new species of *Justicia* (*Acanthaceae*) from southern México. *Kew Bulletin* 48: 119-123.

Acosta-Castellanos S. (2007). Especie nueva de *Justicia* (*Acanthaceae*) del bosque tropical caducifolio de la costa de Oaxaca, México. *Revista Mexicana de biodiversidad* 78: 11-14

Alam M. and Euler K.L. (1982). Isolation of Kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *Journal of Natural Products*. 2:15-19.

Alcami J, Caceres A.S., Garcia P.A., Escarcena R., Gaitan I., Cruz S.M. , Palomino-Sanchez S.S., Bermejo M., Bedoya L.M. (2008). Guatemalan plants extracts as virucides againts HIV-1 infection. *Phytomedicine*. 15:520-524.

Angiosperm Phylogeny Group (2003) an update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141:399-436

Arteaga J.J., Perea M.E. (2007) Guía metodológica para detección de núcleos de metabolitos secundarios. *Manual Fitoquímica*. Univ. de Tolima pp.56-80

Asano J, Chiba K, Tada M, Yoshii T (1996): Antiviral activity of lignans and their glycosides from *Justicia procumbens* L. *Phytochemistry* 42: 713–717

Atal, C.K., (1980). Chemistry and Pharmacology of Vasicine A New Oxytocic and Abortifacient. *Regional Research Laboratory, Jammu-Tawi*. 16:34-36.

Barrow C.J., Dennis A., Silva A., Shen J., Zhang J., y Zhang Q.(2006) A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 10:445-450

Bentham, G. (1876). Acanthaceae. In G. Bentham & J. D. Hooker, *Genera Plantarum* 2(2): 1060-1122

Bhat V.S., Nasavatl D.D., Mardikar B.R., (1978). *Adhatoda vasica*—an Ayurvedic medicinal plant. *Indian Drugs* 15,62–66.

Brako L., Zarucchi J. L. (editors). (1993). *Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru*. Mo- nogr. Syst. Bot. Missouri Botanical Garden 45.

Burgos R., Hancke J., (1994). Teratology study on Kan Jang in rats (liquid mixture). Taubor Research, Pirque, Chile, p. 4 (internal report to Swedish Herbal Institute, data on file).

Burgos R., Hancke J., (1995). Evaluation of reproductive toxicity of Kan Jang (liquid mixture) in mice. *Teratological Review*, 1–6 (internal report to Swedish Herbal Institute, data on file).

Caceres A., Giron L.M., Alvarado S.R., Torres M.F. (1987). Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 20: 228-237.

Caceres-Cortes M.E., Moreno-Alvarado M., Ramírez-Nieves M.E. (2001) Transfection of the TF-1 cell line with the human proto-oncogene bcl-2 favors short term cell survival and does not change phenotype. *Revista de Investigación Clínica* 52: 645-653.

Calderón A.I., Terreaux C., Gupta M.P., Hostettmann K. (2003) *In vitro* cytotoxicity of 11 Panamanian plants. *Fitoterapia* 74: 378–383

Calzada F., Arrieta J., Reyes B., Cedillo-Rivera R., Navarrete A. (2001) Amoebicidal and giardicidal compounds from the leaves of *Zanthoxylum liebmannianun* *Fitoterapia*, Vol. 72, 3: 295-297

Cantillo J., Güete J., Baldiris R., Jaramillo B., Olivero J. (2007). Evaluación de la toxicidad aguda (CL₅₀) Frente a *Artemia franciscana* y la actividad hemolítica de los extractos acuosos, en diclorometano y metanólico parcial de *Justicia secunda* (Vahl.). *Sciencia et Technica* III : 3.

Chen C.C., Wen-C. H., Ko F.N., Yu-Lin H., Jun-Chih O., and Che-Ming T. (1996) Antiplatelet Arylnaphthalide Lignans from *Justicia procumbens* . *J. Nat. Prod.*, 59 (12), pp 1149–1150.

Chopra R.N., (1955). A Review of Work on Indian Medicinal Plants. Indian Council of Medical Research, New Delhi, p. 23.

Chakravarty A.K., Dastidar P.P., Pakrashi S.S. (1982): Studies on Indian medicinal plants. Part 67. Simple aromatic amines from *Justicia gendarussa*. Carbon-13 NMR spectra of the bases and their analogs. *Tetrahedron* 38: 1797–1802.

Chowdhury B.K., Bhattacharyya P., (1987). Adhavaquinone: a new quinazolinone alkaloid from *Adhatoda vasica* Nees. *Chemical Industry (London)* 1, 35–36.

Claeson U. P, Malmfors T., Wikman G., Bruhn J. G. (2000). *Adhatoda vasica*: a critical review of ethnopharmacological and toxicological data. *Journal of Ethnopharmacology* 72 1–20.

Daniel T. F. (1993a). New and reconsidered Mexican Acanthaceae III, *Justicia*. Contr. Univ. Michigan Herb. 17: 133-137.

Daniel T.F. (1999b). Taxonomic and distributional notes on Neotropical *Justicia* (*Acanthaceae*). Proceeding of the California Academy of Sciences 51: 483-492.

Day S.H., Chen-Lin Y., Mei-Lin T., Tsa L.T., Horng-Huey K. Mei-Ing C., Chang Lee J., y Chun-Nan L. (2002). Potent citotoxic lignans from *Justicia procumbens* and their effects on Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- α Production in Mouse Macrophages. J. Nat. Prod. 65: 379-381.

D'Cruz, J.L., Nimbkar, A.Y., Kokate, C.K., (1979). Evaluation of essential oil from leaves of *Adhatoda vasica* as an airway smooth muscle relaxant. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 41, 247.

De Smet P.A. (1985): A multidisciplinary overview of intoxicating snuff rituals in the western hemisphere. *J Ethnopharmacol* 13: 3–49.

-Deltabase Histology Atlas:

<http://www.deltagen.com/target/histologyatlas/histologyatlas.html>.

Dhar, M.L., Dhar, M.M., Dhawan, B.N., Mehrotra, B.N., Ray, C., (1968). Screening of Indian plants for biological activity: part I. Indian Journal of Experimental Biology 6,232–247.

Domínguez X.A., Achenbach H., González C., Amare F.D. (1990). Estudio químico del muítle (*Justicia spicigera*). Rev. Latinoamericana de Química. 21: 142-143.

Duke JA. (1991). Handbook of Medicinal Herb. Florida; USA: CRC Press;

Dymock W., Waeden, C.J.H., Hooper, D., (1890). *Pharmacographia Indica, A History of the Principal Drugs of Vegetable Origin*. Paul, Trech, Trubner & Co. Ltd, London, pp. 50–54.

Estrada-Soto S., Hernández-Abreu O., Castillo-España P., León-Rivera I., Ibarra-Barajas M., Villalobos-Molina R., González-Christen J., Vergara-Galicia J., (2009) Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochemical Pharmacology*, Vol.78, 1: 54-61

Ezcurra C. (1993a). Acanthaceae. In A. L. Cabrera (editor), *Flora (le la Provincia de Jujuy 9: 278-359*. Colee 3i. 1NTA, Buenos Aires

Ezcurra C. (1999b). Acanthaceae. In F. O. Zuloaga & O. Morrone (editors), *Catalogo de las Plantas Vaseulares de la Republica Argentina*. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 74: 1-14.

Ezcurra C. (2002c). El Genero Justicia (Acanthaceae) en Sudamerica Austral. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 89, No. 2, pp. 225-280

Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. (2001) Secretaria de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Fukamiya N, Lee KH (1986): Antitumor agents, 81. Justicidin-A and diphyllin, two cytotoxic principles from *Justicia procumbens*. *J Nat Prod* 49: 348–350.

Garcia, S.K. y Dimayuga, R.E. (1991). Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, México. *Journal of Ethnopharmacology* 31: 181-192

Graham, V. (1988). Delimitation and infra-generic classification of *Justicia* (*Acanthaceae*). Kew Bulletin 43: 551-624.

Grange J. M., Noel J.C. Snell. (1996). Activity of bromhexine and ambroxol, semi-synthetic derivatives of vasicine from the Indian shrub *Adhatoda vasica*, against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. Journal of Ethnopharmacology 50: 49-53

Ghosal S, Banerjee S, Frahm AW (1979a): Chemical constituents of *Justicia*. III. Prostalidins A, B, C and retrochinensis: a new antidepressant; 4-aryl-2,3-naphthalide lignans from *Justicia prostrata*. Chem Ind 23: 854–855.

Ghosal S, Banerjee S, Jaiswal DK (1980b): Chemical constituents of *Justicia*. Part 2. New furofurano lignans from *Justicia simplex*. Phytochemistry 19: 332–334.

Hancke, J., Burgos, R., (1993). Toxicological study on Kan Jang in pigs (liquid mixture). Taubor Research, Pirque, Chile (internal report to Swedish Herbal Institute, data on file).

Herrera-Mata H., Rosas-Romero A. and Crescente O. (2002). Biological Activity of “Sanguinaria” (*Justicia secunda*) Extracts. Pharmaceutical Biology, Vol. 40, No. 03, pp. 206–212

Hernández, F. (1790) Historia Natural de las plantas de la Nueva España. Vol. I Obras Completas de Francisco.

Huerta-Reyes M, Basualdo MC, Abe F, Jiménez-Estrada M, Soler C, Reyes-Chilpa R. (2004b) HIV-1 inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. Biol. Pharm. Bull. 27: 1471-1475

Huq M.E., Ikram M., Warsi S.A., (1967). Chemical composition of *Adhatoda vasica* Linn. II. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research 10, 224–225.

Ibrahim B, M'batchi B, Mounzeo H, Bourobou BHP, Posso P (2000): Effect of *Tephrosia vogelii* and *Justicia extensa* on *Tilapia nilotica* in vivo. *J Ethnopharmacol* 69: 99–104.

Iyengar, M.A., Jambaiah, K.M., Kamath, M.S., Rao, G.O., (1994). Studies on an antiasthma Kada: a proprietary herbal combination, Part I. Clinical study. *Indian Drugs* 31, 183–186.

Irwin S. (1986) Comprehensive observational assessment: A systematic, quantitative, procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacology*. 13:222-257.

Jabbar A., Lateef, M., Iqbal Z., Khan M. N., Akhtar M. S., (2003). Anthelmintic activity of *Adhatoda vasica* roots *International Journal of Agriculture and Biology* 5:86-90.

Jaiswal, K. D. , Benerejee, S. , y Ghosal, S. (1980) New Furofurano Lignans from *Justicia simplex*. *Phytochemistry*. 19: 332-334.

Jorgensen, P. M. & S. León-Yanez. (1999). *Catalogo de las Plantas Vasculares del Ecuador*. *Monogr. Syst. Bot. Mis- souri Bot. Gard.* 75:453-465.

Junqueira L.C. and Carneiro J. (2005) *Basic Histology text and Atlas* 11 ed. Mc Graw-Hill pp. 274-326.

Kamilia A.E.H. Abou E. S., Bibby M. C., Shoeib N., Wright C. W. (2003), Evaluation of Some Egyptian Plant Species for in vitro antimycobacterial and cytotoxic activities. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 41, No. 6, Pages 463-465

Kumar M., Samarth R., Kumar M., Selvan S. R., Saharan. B., Kumar A., (2007). Protective effect of *Adhatoda vasicia* Nees Against Radiation-Induced Damage at Cellular, Biochemical and Chromosomal Levels in Swiss Albino Mice eCAM; 4(3)343–350

Lans C., Harper T., Georges K., Bridgewater E. (2001). Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad. BMC Complementary and Alternative Medicine 1, art. No. 10.

Lans C. (2007). Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 3, art. No. 13

Leonard, E. C. (1951-1958). The Acanthaceae of Colombia. Contr. U.S. Natl. Herb. 31(1-3): 1-781.

Lindau, G. 1893. Beitrage zur Systematik der Acanthaceae. Bot. Jahrb. Syst. 18: 36-64.

Linne, C. 1753. Species Plantarum, etl. 1. Laurentii Salvii, Stockholm.

Lin J, Yu Z, Zhong M (1982): Antiarrhythmic principle of *Justicia procumbens*. Yaoxue Tongbao 17: 365–368.

Lino CS, Traveira ML, Viana GSB, Matos JJ. (1997). Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq. and its main constituents: coumarin and umbelliferone. Phytoterapy Res. 11(3):211-5

Lorke, D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. Archives of Toxicology. 54, 275-287.

Lozoya X., Aguilar A., Camacho J.R., (1987) Encuesta sobre el uso actual de la medicina tradicional Mexicana. Rev. Med. del IMSS. 25:283-286.

Macotela, P.M., Navarro A.I., Martinez M.N., Alvarez C. R. (1994a) *In vitro* Antigiardisic activity of plant extracts. Revista de Investigación Clínica 46: 343-347.

Macotela, P.M., Rufino-Gonzalez, Y., De la Mora, J.I., Martinez-Gordillo, M.N. (2001b) Mortality and morphological changes in *Giardia duodenalis* induced by exposure to ethanolic extracts of *Justicia spicigera* Proceeding of the Western Pharmacology Society 44: 151-152.

MacRae WD, Towers GH (1984): *Justicia pectoralis*: a study of the basis for its use as hallucinogenic snuff ingredient. *J Ethnopharmacol* 12: 93–111.

Márquez, A. Ochoa, L.F., Baldomero, E.R., Mata, R., (1999). Plantas medicinales de Mexico II, composición , usos y actividad biológica. E. universidad Nacional Autonoma de México.

Martins LGS, Senna-Valle L, Pereira NA (2005) Active principles and pharmacological activities of 8 plants popularly known by names of the comercial medicines. Revista Brasileira do Plantas Medicinaiis 7, 73-6.

Martínez, M. (1989) Las plantas Medicinales de México. Ed. Botas, 3ra Edición. México, D.F. 165-172

McDade, T., A. (1982). New spee ies of Jlasticia and Razisea (Acantha(eae) from (Losta lti(a, with taxonomic notes. Syst. Bot. 7: 489 197.

McDade L.A., T.F. Daniel, S.E. Masta and Riley. (2000). Phylogenetic relationships within the tribe Justiceae (Acanthaceae):evidence from molecular sequences, morphology, and cytology. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 87: 435-458.

Meckes, M., David-Rivera, A.D., Aguilar-Nava, V. y Jimenez, A. (2004) Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine* 11: 446-451.

Meyer, B., Ferrigni, N. , Putnam, J. Jacobsen, L., Nichols D., McLaughlin, J. (1982). Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica.* 45: 31-34.

Mills J, Pascoe KO, Chambers J, Melville GN (1986): Preliminary investigations of the wound-healing properties of a Jamaican folk medicinal plant (*Justicia pectoralis*). *West Indian Med J* 35: 190–193.

Modak, A.T., Rao, M.R.R., (1966). Hypoglycaemic activity of a non-nitrogenous principle from the leaves of *Adhatoda vasica* Nees. *Indian Journal of Pharmacy* 28, 105–106.

Muller, A., Antus, S., Bittinger, M., Kaas, A., Kreher, B., Neszmelyi, A., Stuppner, H., Wagner, H., (1993). Chemistry and pharmacology of antiasthmatic *Galphimia glauca*, *Adhatoda vasica*, and *Picrorhiza kurrooa*. *Planta Medica* 59 Suppl, A, 586–587.

Naovi, S., Khan, M., Vohora, S.B., (1991). Anti-bacterial, antifungal and anthelmintic investigations on Indian medicinal plants. *Fitoterapia* 62, 221–228.

Navarro E., Alonso S.J. , Trujillo J. , Jorge E. , Perez C. (2004a) Central Nervous activity of elenoside. *Phytomedicine* 11:498-503.

Navarro E, Alonso SJ, Navarro R, Trujillo J, Jorge E. (2006b); Elenoside increases intestinal motility. *World J Gastroenterol* 12(44): 7143-7148

Nees, C. G. (1847). Acanthaceae. In C. Martius (editor), *Flora Brasiliensis* 9: 1-164.

Ohta, K. and Munakata, K. (1970) *Tetrahedron Letters* 925.

Olaniyi AA (1980): *Justicia flava* Vahl: studies on the petroleum ether extract of the leaves, stems and roots. *Niger J Pharm* 11: 133–134.

Oliveira A.F.M., Xavier H.S., Silva N.H., Andrade L.H.C., (2000). Chromatographic screening of medicinal acanthaceae: *Justicia pectoralis* Jacq. and *J. gendarussa* Burm. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 3(1) pp. 37-41.

Patel, V.K., Venkata-Krishna-Bhatt, H., (1984). *In vitro* study of antimicrobial activity of *Adhatoda vasica* Linn. (leaf extract) on gingival inflammation-a preliminary report. *Indian Journal of Medical Science* 38, 70–72.

Paval J., Kaitheri S. K., Potu B. K., Govindan S., Kumar R. S., . Narayanan S. N, Moorkoth S. (2009). Anti-arthritis potential of the plant *Justicia gendarussa* Burm. *Clinics Sao Paulo*

Peraza-Sanchez, S.R., Kantun, P.S., Torres-Tapia, L.S., Filogino, M.P., Polanco-Sima, P. y Cedillo-Rivera, R. (2005a). Screening of native plants from Yucatán for anti-*giardia lamblia* activity. *Pharmaceutical Biology* 43:594-598.

Peraza-Sánchez S.R., Cen-Pacheco F., Noh-Chimal A., May-Pat F., Simá-Polanco P., Dumonteil E., García-Miss M.R., Mut-Martín M. (2007b) Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia* 78 315–318

Reyes Chilpa R., Estrada-Muñiz E., Ramírez Apan T., Amekraz B., Aumelas A., Jankowski C. K., Vázquez-Torres M. (2004) Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense* *Life Sciences*, Vol.75, 13:1635-1647

Rodriguez Chanfrau J.E., Lopez Hernandez O.D., Gil Apan J.M., Method for coumarin quantification in dry extracts from *Justicia pectoralis* Jacq. (2008). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 13 (3).

Raju GV, Pillai KR (1989): Lignans from *Justicia tranquebariensis* Linn. F. *Indian J Chem Sect B 28B*: 558–561.

Rajendiran C, Pai BR, Subramanian, PS (1991): Lignans of *Justicia glauca* Rottl. *Indian J Chem Sect B 30B*: 681–683.

Roig JT. (1974) *Plantas Medicinales Aromáticas o Venenosas de Cuba*. La Habana:Ed. Científico-Técnica;

Rojas J.J., Ochoa V.J., Ocampo S.A., Muñoz J.F., (2006). Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A posible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 6, art. No. 2.

Sanmugapriya, E., Shanmugasudraram, P., Venkataraman, S., (2005), Anti-inflammatory activity of *Justicia próstata* gamble in acute and sub-acute models of inflammation. *Inflammopharmacology*, 13: 493-500

Singh K., Jasemine S., Srivastava R.S. (2007), Hepatoprotective Effect of Crude Extract and Isolated Lignans of *justicia simplex* Against CCl₄-Induced hepatotoxicity. *Pharmaceutical Biology* Vol. 45, No. 4, pp. 247-277

Sastry KV, Rao EV, Pelter A, Ward RS (1979): 4-Aryl-2,3-naphthalide lignans from *Justicia simplex*. *Indian J Chem Sect B 17B*: 415–416.

Sepulveda-Jimenez G., Reyna-Aquino C., Bermudez-Torres K., Rodriguez-Monroy M., (2009). Antioxidant activity and content of phenolic compounds and flavonoids from *Justicia spicigera*. *Journal of Biological Sciences* 1:1-4

Shete, A.B., (1993). Femiforte, indigenous herbomineral formulation in the management of non-specific leucorrhoea. *Doctor's News* 5, 13–14.

Stine K.E. and Brown T.M. (2000) *Principles of toxicology*. 1ed. CRC Press pp. 149-157.

Telefo PB, Moundipa PF, Tchana AN, Tchouanguep DC, 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 immature female rats. *J Ethnopharmacol* 63: 193–200.

Subbaraju GV, Kumar KK, Raju BL, Pillai KR, Reddy MC (1991): Justiciresinol, a new furanoid lignan from *Justicia glauca*. *J Nat Prod* 54: 1639–1641.

Thom E., Wollan T., (1997). A controlled clinical study of Kanjang mixture in the treatment of uncomplicated upper respiratory tract infections. *Phytotherapy Research* 11, 207–210.

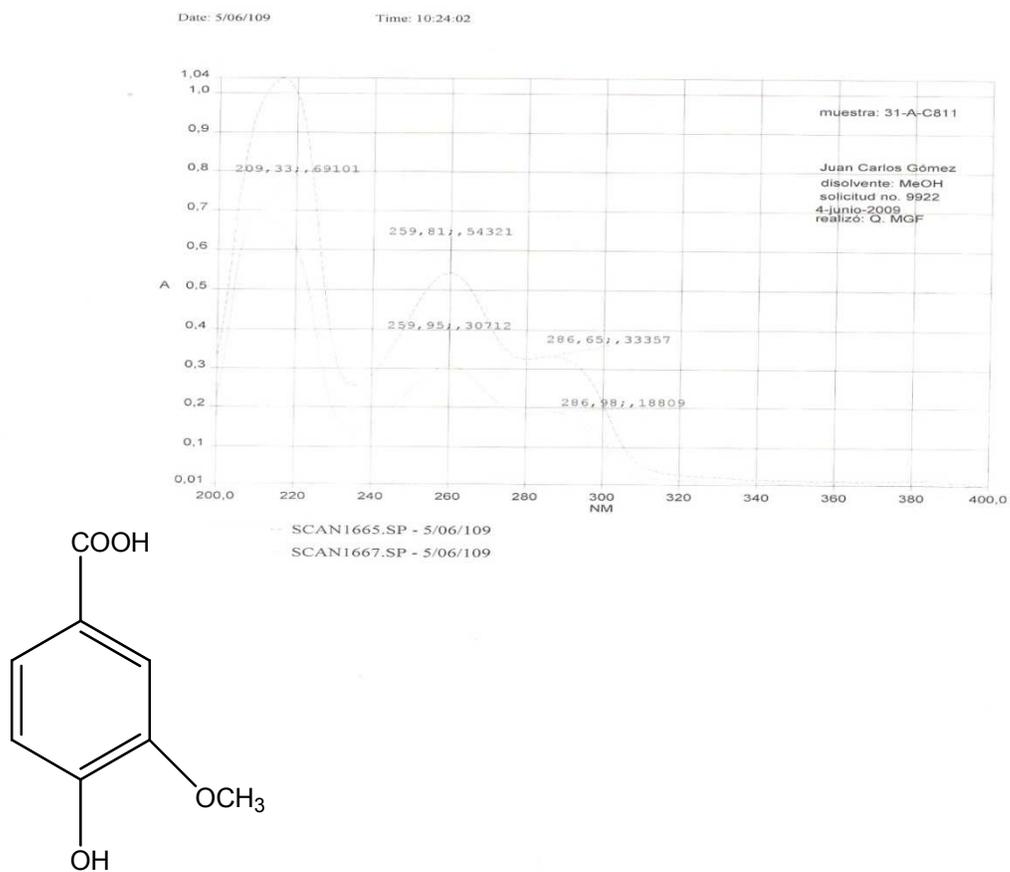
Trujillo J.M., Elena J., Navarro, E. y Boada, J. (1990). Lignans from *Justicia hyssopifolia*. *Phytochemistry* Vol. 29 2991-2993.

Willaman J.J., Li, H.L., (1970). Alkaloid-bearing plants and their contained alkaloids, 1957–1968. *Lloydia* 33S, 1-286.

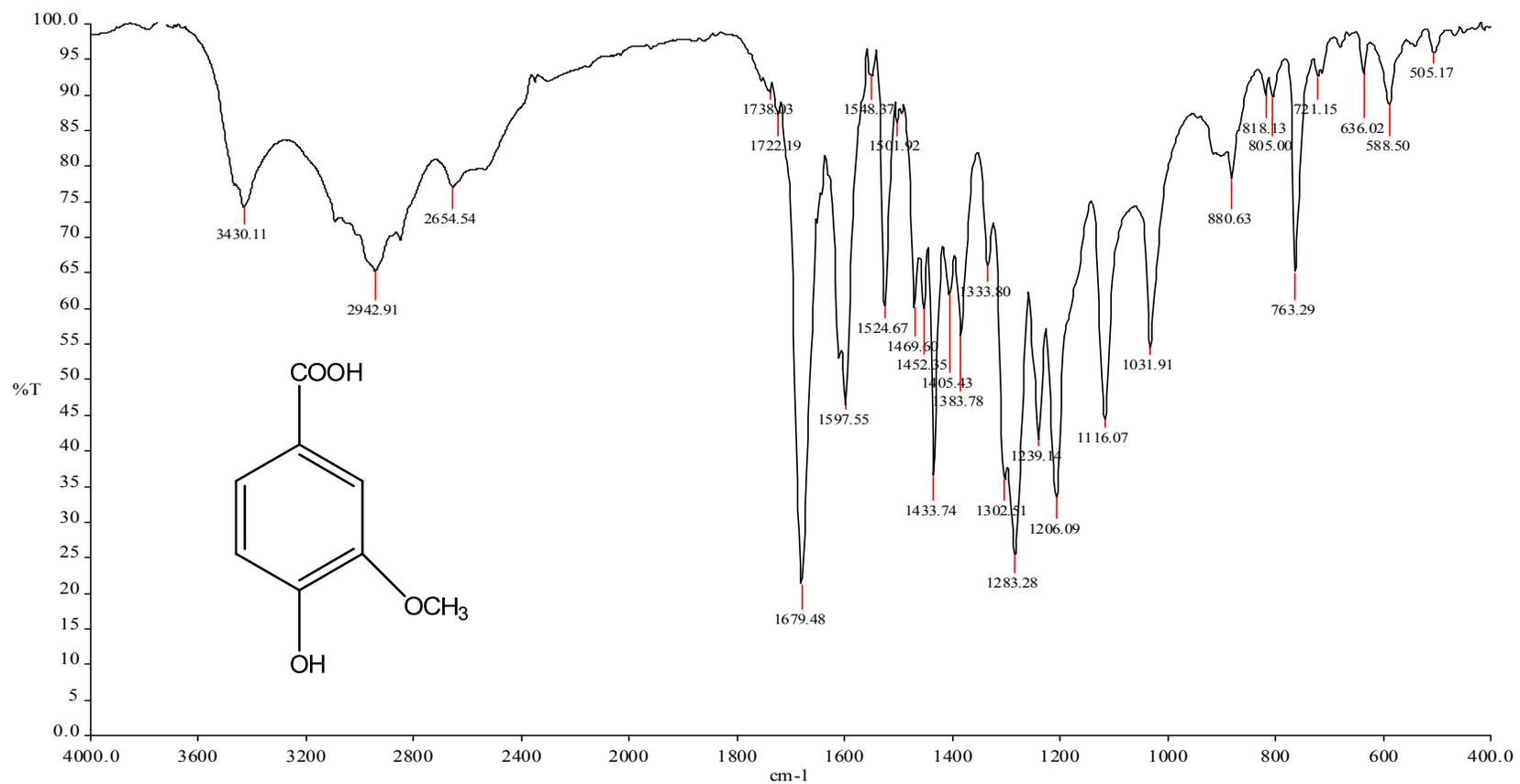
World Health Organization, (1990). The use of traditional medicine in primary health care. A Manual for Health Workers in South-East Asia, SEARO Regional Health Papers, No 19, New Delhi, pp. 1–2.

Yarnell E., Abascal K. (2009). Plants coumarins: Myths and realitie. *Alternative and Complementary Therapies* 15 (1), pp. 24-30.

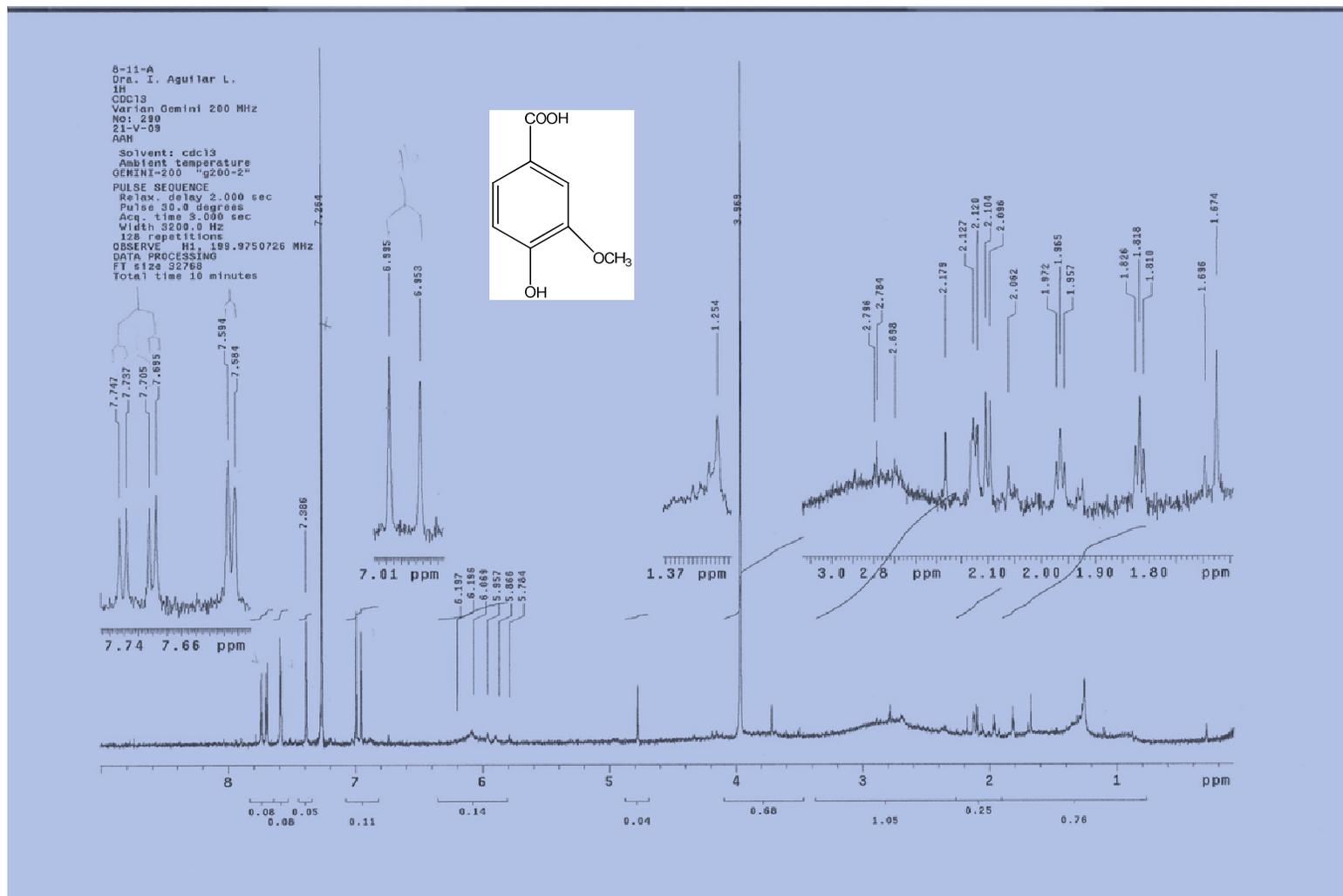
Zutshi, U., Rao, P.G., Soni, A., Gupta, O.P., Atal, C.K., (1980). Absorption and distribution of vasicine, a novel uterotonic. *Planta Medica* 40, 373–377.

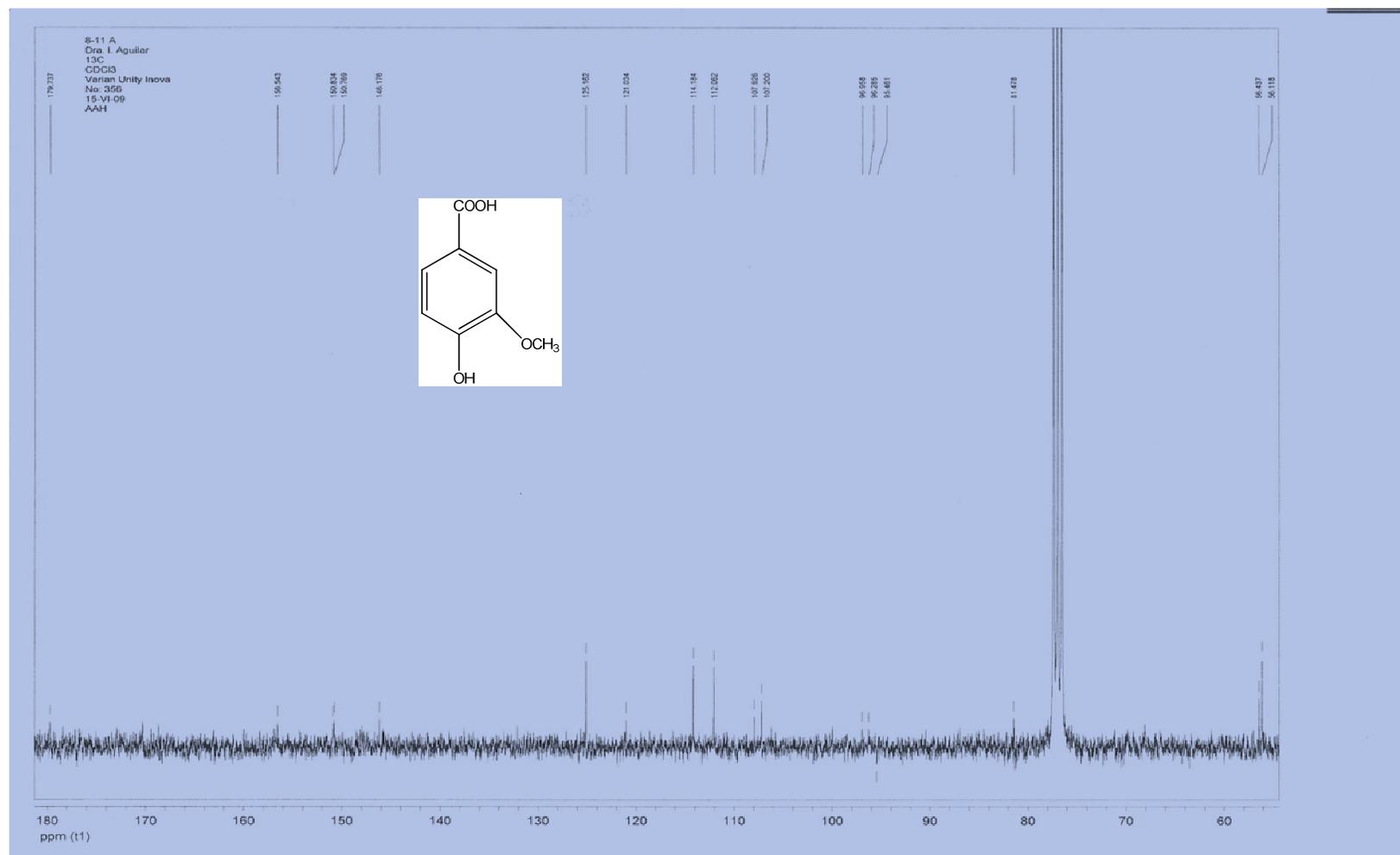


Espectro 1. Espectro en el UV del acido vainillico.



Espectro 2. Espectro en el IR del ácido vainílico

Espectro 3. Espectro de RMN-¹H del acido vainílico

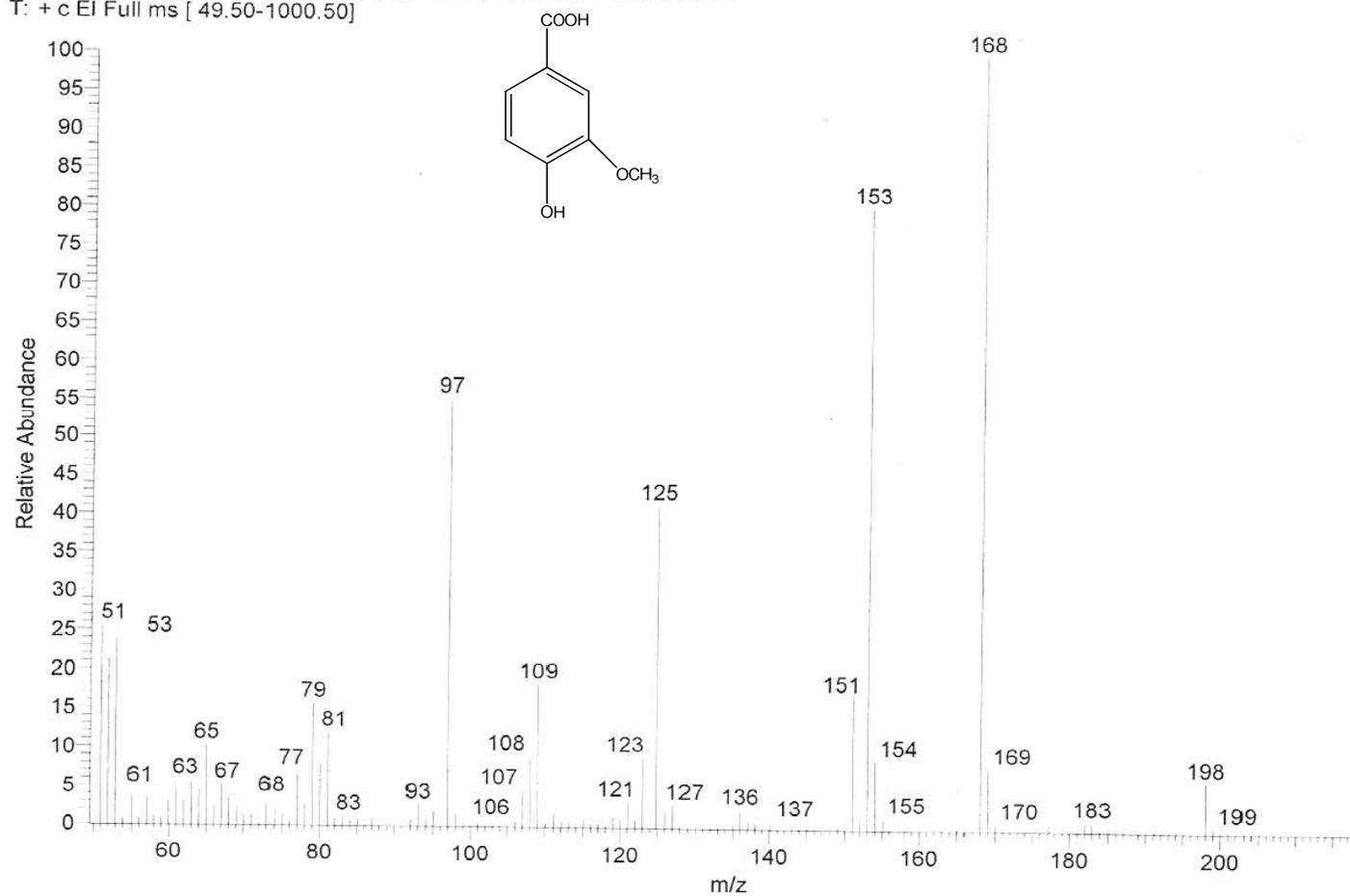


Espectro 4. Espectro de RMN-¹³C del ácido vainílico

D:\Xcalibur\data\USA\ND\OT3001_1

8/20/2009 11:58:26 AM

31-A-C811

OT3001_1 #4-5 RT: 0.67-0.89 AV: 2 SB: 3 1.99-2.44 NL: 3.31E7
T: + c EI Full ms [49.50-1000.50]

Espectro 5. Espectro de masas del acido vainilico