



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia* D. Don, usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Licenciado en Biología

PRESENTA

MIGUEL ANGEL ROMERO ESPINOSA

DIRECTOR DE TESIS

Dr. José Guillermo Avila Acevedo

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dedicatoria

Al Sol, que da vida, energía e ilusiones...

A la Esfera Azul, único hogar conocido y poco entendido...

A mi familia... En especial a mi Madre y mi tía Ana que dan todo sin pedir nada a cambio.

A Cris, Mari y Ger primos que me han alentado y orientado como hermanos.

A mis amigos, del barrio, de la secu, de la prepa, de la universidad, de la vida y de la lucha, que son la familia escogida.

A Ceci, que me acompaña en el amor, amortiguando y rememorando éste esfuerzo.

Al Dr. Memo y a la Dra. Anita guías académicos y al Dr. Campos, a la Dra. Montse, a la Maestra Marisol y al Maestro Andrés, que con su inspiración y conocimiento esto fue posible.

Al Mundo, practiquen y promuevan la cercanía...la amistad duplica nuestras alegrías y divide nuestra tristeza.

A lo Divino que es infinito, abstracto y concreto, que es todo y nada, que es mi principio y mi fin...
Gracias al Universo, al Cosmos, a la vida y a todos los que lectores de estas páginas.

Tabla de contenido

1	Resumen	1
2	Introducción	2
3	Marco teórico	5
3.1.	Fotoprotectores solares	5
3.2.	Antecedentes	5
3.3.	Género: <i>Jacaranda</i>	6
3.4.	Especie de estudio: <i>Jacaranda mimosifolia</i>	7
3.4.1.	Usos en medicina tradicional	9
3.4.2.	Usos comprobados científicamente	9
3.5.	Extracto metanólico	12
3.6.	Modelo biológico de estudio: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
4	Justificación	16
5	Hipótesis	16
6	Objetivos	17
6.1.	Objetivo general	17
6.2.	Objetos particulares	17
7	Estrategia experimental	188
	Etapa 1	19
7.1.1.	Obtención del material vegetal	19
7.1.2.	Obtención del extracto metanólico de flores	19
7.1.3.	Espectro de absorción del extracto metanólico	19
7.1.4.	Obtención del cultivo axénico	19
7.1.5.	Cinética de crecimiento en medio líquido	20
7.1.6.	Cinética de crecimiento en medio sólido	21
7.1.6.1.	Preparación del inóculo en medio sólido	21
7.1.6.2.	Crecimiento	21

Etapa 2. <i>S. cerevisiae</i> expuesta a UV-B	23
7.2.1. Experimentos de desafío	23
7.2.2. Experimento de irradiación por UV-B sin protección.....	25
7.2.3. Protección física.....	27
7.2.4. Protección a nivel metabólico	27
7.2.4.1. Adaptación de <i>S. cerevisiae</i> al extracto de <i>J. mimosifolia</i>	27
7.2.4.2. <i>S. cerevisiae</i> cultivada en extracto y expuesta a RUV-B.....	27
7.2.5. Protección a nivel físico-metabólico.....	28
7.2.6. Análisis estadístico y recuperación de material biológico irradiado.	28
Etapa 3. Análisis de proteínas	29
7.1. Extracción de proteínas	30
7.2. Electroforesis.....	30
7.3. Análisis de expresión de proteínas.....	31
8 Resultados y discusión	32
Etapa 1	32
8.1.1. Rendimiento del extracto.....	32
8.1.2. Espectro de absorción del extracto metanólico de flor de <i>J. mimosifolia</i>	32
8.1.3. Cultivo axénico de <i>S. cerevisiae</i>	33
8.1.4. Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	33
8.1.5. Conteo de placa	34
Etapa 2	35
8.2.1. Experimentos de desafío con y sin protección a la RUV-B.....	35
8.2.2. Cinética de muerte de <i>S. cerevisiae</i> por exposición a UV-B sin protección.....	36
8.2.3. Experimento con protección física.....	38
8.2.4. Experimento con protección a nivel metabólico.....	40
8.2.5. Experimento con protección a nivel físico-metabólico	45
8.2.6. Comparación de los datos de sobrevivencia de los desafíos de irradiación	46

8.2.6.1. Tasas de mortalidad.....	46
8.2.6.2. Población de levaduras al inicio de cada experimento.....	48
8.2.6.3. Tiempo de mortalidad de la población de levaduras expuesta a RUV-B.....	49
Etapas 3	52
8.3.1. Extracción de proteínas de células de <i>S. cerevisiae</i>	52
8.3.2. Consideraciones finales.....	58
9 Conclusiones	59
10 Anexos	60
Anexo I: Técnicas de extracción de proteínas de levaduras expuestas a RUV-B para comparación del efecto fotoprotector anivelmolecular.....	60
A. Kit de extracción de ADN UltraClean All Prep para células vegetales.....	60
B. A. Kit de extracción de ADN UltraClean All Prep para células animales.....	62
C. C. Reactivo TRIzol® de Invitrogen.....	64
D. D. Hidróxido de sodio (NaOH).....	66
E. Rompimiento celular por choque térmico.....	67
Anexo 2: Determinación taxonómica y registro en Herbario.....	68
11 Referencias	70

Índice de Figuras

Figura 1. RUV-B en el espectro electromagnético	3
Figura 2. <i>Jacaranda mimosifolia</i> . Sus diferentes estructuras vegetativas y reproductivas.	8
Figura 3. Metabolitos secundarios identificados en el género <i>Jacaranda</i>	11
Figura 4. Ciclo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
Figura 5. Ciclo biológico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
Figura 6. Estrategia experimental.....	18
Figura 7. Esquema de la obtención de <i>S. cerevisiae</i> en cultivo axénico en PDA y su observación al microscopio óptico	20
Figura 8. Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en medio sólido y técnica de dilución.....	22
Figura 9. Esquemas de experimentos de desafío: 1. Cinética de muerte de <i>S. cerevisiae</i> por irradiación UV-B; 2. Experimento con barrera física; 3. Experimento con protección a nivel metabólico; 4. Experimento con barrera física y metabólica.....	24
Figura 10. Diagrama de cinética de muerte de <i>S. cerevisiae</i> por irradiación UV-B.....	26
Figura 11. Diagrama de cámara de electroforesis.	31
Figura 12. Curvas de supervivencia de microorganismos irradiados con luz UV-B.....	37
Figura 13. Electroforesis de Gel de poliacrilamida 1.....	54
Figura 14. Electroforesis de Gel de poliacrilamida 2.....	55
Figura 15. Fotografía del ejemplar herborizado: <i>Jacaranda mimosifolia</i>	69

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de la radiación ultravioleta	2
Tabla 2. Preparación de reactivo de Bradford.....	30
Tabla 3. Constantes de mortalidad	47
Tabla 4. Comparación de los distintos experimentos de desafío.	48
Tabla 5. Concentración de proteínas según el reactivo de Bradford.....	53
Tabla 6. Pesos moleculares de las bandas reveladas en electroforesis	56
Tabla 7. Comparación: Concentración de proteínas y valor relativo	57

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Espectro de absorción del extracto metanólico de flor de <i>J. mimosifolia</i>	32
Gráfica 2. Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	34
Gráfica 3. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i>	35
Gráfica 4. Cinética de muerte de <i>S. cerevisiae</i> por exposición a RUV-B continua sin protección	36
Gráfica 5. Experimento con protección física.....	38
Gráfica 6. Experimento con protección a nivel metabólico.....	41
Gráfica 7. Experimento con protección a nivel físico-metabólico.....	45
Gráfica 8. Cinética de muerte de <i>S. cerevisiae</i> por exposición a la RUV-B sin protección (dispersión).....	46
Gráfica 9. Experimentos con protección a la RUV-B (dispersión).....	47
Gráfica 10. Densitometría: Gel de poliacrilamida 1.....	54
Gráfica 11. Densitometría: Gel de poliacrilamida 2.....	55

Resumen

La Radiación Ultravioleta B (RUV-B) causa severos daños en los organismos, además el deterioro de la capa de ozono permite mayor penetración de los RUV-B a la corteza terrestre, provocando que las lesiones en la piel humana sean cada vez más severas, por lo tanto, es necesario atenuar los daños producidos por la RUV-B. Todos los seres vivos son capaces de producir metabolitos secundarios, algunos poseen propiedades fotoquimioprotectoras, en este caso se evaluó el extracto metanólico de flor de *Jacaranda mimosifolia*.

Lo costoso de los modelos biológicos para estudiar la protección contra ésta radiación, motiva a la búsqueda de otras alternativas. En este trabajo se plantea utilizar como modelo biológico para evaluar sustancias fotoquimioprotectoras a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se evaluaron las cinéticas de crecimiento de *S. cerevisiae*, y su muerte en experimentos de desafío con y sin protección ante la RUV-B. Los resultados indicaron que la levadura presenta un crecimiento exponencial normal a partir de las 16 horas. Se determinó que con la irradiación de UV-B la muerte de una población de las levaduras sin protección ocurre a los 3.5 minutos, mientras que al usar el extracto de *J. mimosifolia* como barrera física sobreviven 3 horas. Además, se preparó un medio de cultivo cuya única fuente de carbono fue el extracto de *J. mimosifolia*, resultando un medio adecuado para su crecimiento, las levaduras creciendo en medio con extracto de *J. mimosifolia* (experimento: metabólico) sobreviven a la exposición de 15 minutos de RUV-B. Por otra parte, se obtuvo el valor cuantitativo de la protección que el extracto le confiere a las levaduras en contra de la RUV-B. El extracto metanólico utilizado como barrera física protege 46 veces más que el control sin protección, mientras que cuando dicho extracto es usado como medio de cultivo, su protección es de 4.06 veces mayor, por otra parte, cuando el extracto es utilizado como barrera física y metabólica su protección es de 30.36 veces.

En todos los experimentos se recuperaron células de *S. cerevisiae* y se les extrajeron las proteínas para comparar el daño a nivel molecular mediante la identificación de cambios en la expresión de estas moléculas. La cuantificación proteínica se realizó por el método de Bradford. Además, se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida para determinar si existía un patrón diferencial entre los diferentes tratamientos, no se encontró expresión diferencial de proteínas. Se concluye que el extracto de flores de *J. mimosifolia* es una sustancia fotoquimioprotectora y la levadura puede ser un modelo biológico adecuado para evaluar estas sustancias. **Palabras clave: metabolitos secundarios, fotoprotección, proteínas, *Saccharomyces cerevisiae*, radiación ultravioleta, *Jacaranda mimosifolia*.**

Introducción

Entre el Sol y la Tierra existe una distancia de 149.600.000 Km; sin embargo, la radiación electromagnética producida por el Sol es emitida en todas direcciones y solo una pequeña parte de esa radiación llega a la superficie terrestre, gracias a la protección de la atmósfera y a la capa de ozono. La radiación solar está formada por pequeñas partículas de energía, llamadas fotones, se propagan a una velocidad constante de 300.000 Km/s y se clasifica en tres categorías: las radiaciones ionizantes, ondas hertzianas (radiaciones no ionizantes) y la radiación óptica (figura 1). Esta última categoría comprende la luz visible al ojo humano y la radiación ultravioleta (RUV), no visible para el ojo humano y que a su vez se clasifica en cuatro zonas: UV-A, UV-B, UV-C, y UV-Vacío (tabla 1) (Avril et al., 2002).

Tipo de radiación UV	Longitud de onda (nm)
UV-A	320 – 400
UV-B	280 – 320
UV-C	280 – 200
UV-Vacío	0.1 – 200

Tabla 1. Clasificación de la Radiación Ultravioleta.

Los fotones en función de su longitud de onda son absorbidos por ciertas moléculas denominadas cromóforos (Vollhardt y Schore, 2002). El cromóforo “excitado” puede modificar su estructura, establecer enlaces con las moléculas que lo rodean, puede transmitir la energía absorbida a moléculas vecinas y en algunos casos formar especies reactivas conocidas como radicales libres. Algunos radicales libres formados por la luz UV-B y en algunos procesos celulares son conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO), que se caracterizan por ser biomoléculas con capacidad de oxidar numerosas biomoléculas clave, provocando un desbalance y modificación de las funciones biológicas en las que se encuentran implicadas dichas biomoléculas (March,1992).

“Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia*, usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*”
M.A.R.E.

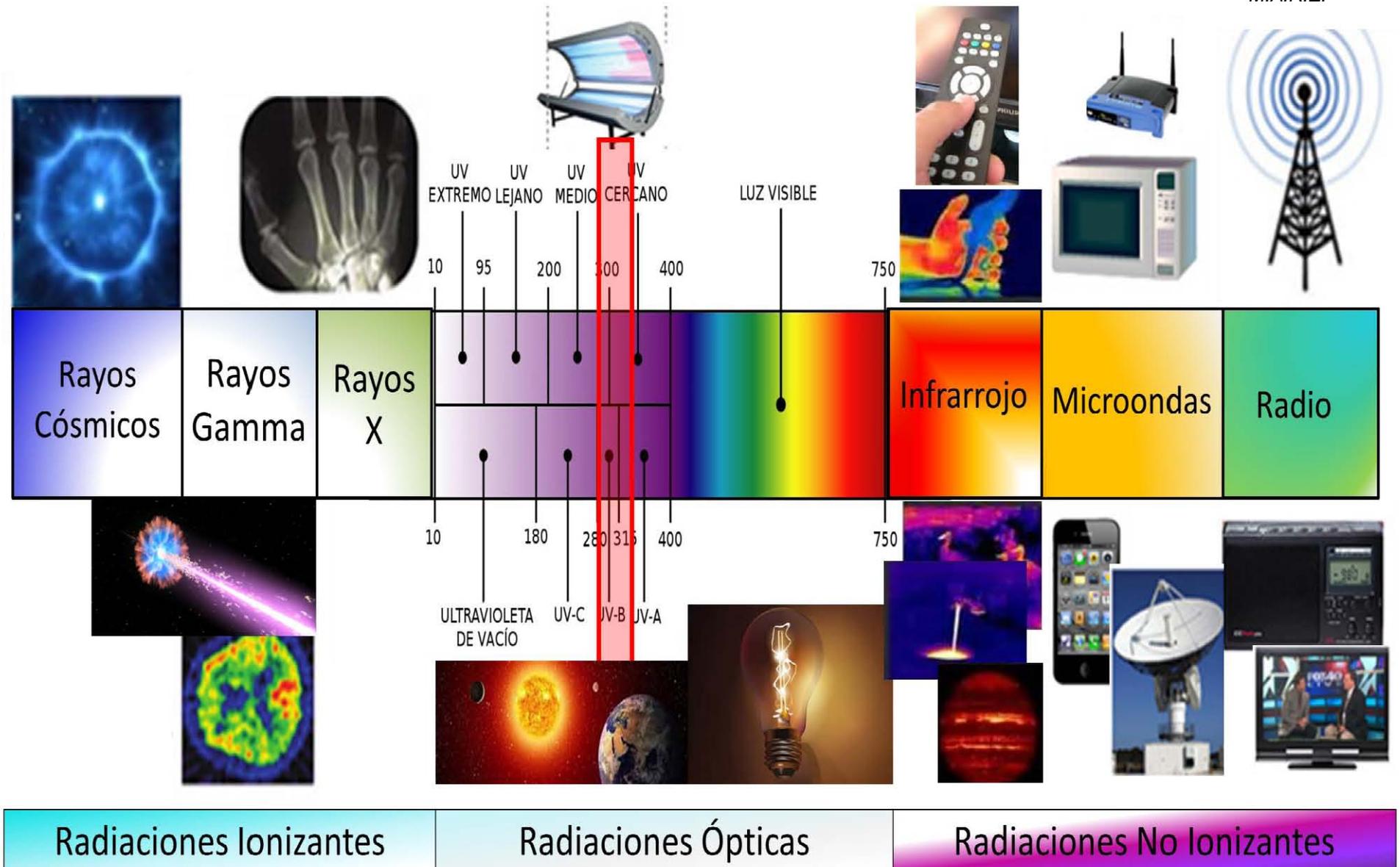


Figura 1. Tipos de radiación en el espectro electromagnético. Resaltado con un rectángulo rojo, la radiación ultravioleta B.

Las ERO producen severas alteraciones celulares como: el rompimiento de las cadenas de ADN, la modificación de la expresión del material genético, la desnaturalización de proteínas y la oxidación de lípidos insaturados de las membranas celulares.

Las RUV son responsables de efectos celulares deletéreos y producen dos tipos de daños: **1.** Efecto directo (UV-B), fotorreacción en el DNA nuclear provocando la formación de dímeros de pirimidina en los ácidos nucleicos; **2.** Efecto indirecto, formación de especies reactivas de oxígeno, responsables de la citotoxicidad, del efecto mutagénico y oxidación de bases nitrogenadas (Bjorn et al., 2002; Diffey y Kochevar, 2007).

Los efectos biológicos de las RUV sobre la piel se manifiestan en todos los individuos, siempre y cuando las dosis de irradiación (intensidad y duración) hayan sido suficientes. Sin embargo, las consecuencias moleculares intracelulares pueden ser importantes y algunas lesiones en tejidos como la piel, pueden ser clínicamente imperceptibles. En la piel, estas agresiones que pueden ser o no producto de radicales libres, se van a acumular poco a poco alterando las células epidérmicas y las dérmicas causando el envejecimiento celular y/o el cáncer (Konigsberg Fainstein et al., 2008).

La exposición de la piel a la RUV, particularmente de la radiación UV-B, puede causar eritema, edema, hiperplasia, hiperpigmentación, quemaduras solares, inmunosupresión, fotoenvejecimiento y cáncer de piel (Afaq y Mukhtar, 2001). Según la Organización Mundial de la Salud 65,161 personas mueren al año a causa del cáncer de piel y se estima que 130,000 casos nuevos de melanoma se producen cada año. El melanoma es la forma más mortífera de cáncer de piel, causando aproximadamente 48,000 muertes al año. Además, se ha diagnosticado que 2-3 millones de los casos de cáncer de piel no melanómicos se deben a la exposición a la luz solar (OMS, 2009). De acuerdo a la Sociedad Mexicana de Oncología a nivel nacional ocurren alrededor de 1,000 casos de cáncer de piel anualmente (Martínez, 2012).

Sin embargo, existen defensas para atenuar o remediar los daños causados por la RUV-B, se sabe que cualquier organismo vivo expuesto a la radiación UV, reacciona de diferentes maneras, por ejemplo la fototaxia, es una habilidad que poseen muchas células para dirigirse hacia la luz. El efecto contrario, huir de la luz, se denomina fotoshock o fototaxia negativa (Lancha et al., 1988). Otro ejemplo es la producción natural de compuestos fotoprotectores que sirven como pantalla contra la RUV, como la melanina sintetizada en células de la piel de animales. De este modo, la RUV puede inducir daños celulares, pero también puede inducir la producción de metabolitos secundarios que les brinden un efecto fotoprotector (Alonso-Lebrero et al., 2003).

Los fotoprotectores solares son productos químicos que proporcionan defensa contra los efectos adversos de la radiación solar y en particular, la radiación UV-B. Los modelos biológicos utilizando ratones y diferentes líneas celulares han mostrado que una variedad de filtros solares pueden reducir los efectos cancerígenos e inmunosupresores de la luz solar (Kerr, 1998). Las sustancias naturales extraídas de plantas se han considerado como una fuente potencial de recursos de protección solar debido a que algunas de ellas tienen la capacidad de absorber radiación ultravioleta además de sus propiedades antioxidantes (Adhami et al., 2001; Wright et al., 2006).

Marco teórico

3.1. Fotoprotectores solares.

Los fotoprotectores solares tienen la capacidad de proteger a la piel filtrando la luz y atenuando la dosis de radiación ultravioleta que penetra en el tegumento. Estos productos multiplican el tiempo de fotoprotección natural. Un protector solar es un preparado al que se asocia diferentes principios activos, que pueden ser filtros orgánicos y/o pigmentos minerales, que han sido solubilizados o dispersados en un excipiente; son moléculas que aseguran una protección fotoquímica al absorber la energía de algunas radiaciones solares (Camacho, 2001).

3.2. Fotoprotectores a partir de plantas.

Los compuestos fitoquímicos que han demostrado poseer propiedades fotoprotectoras pertenecen a varias clases como: flavonoides, isoflavonoides, fitoalexinas, fenoles, antocianos y carotenoides. Éstos compuestos pueden actuar de distintas maneras: como cromóforos, estimulando la respuesta inmune, suprimiendo la inducción de genes, mediante el bloqueo de daño oxidativo al ADN, por desintoxicación de carcinógenos y al modificar algunas vías de señalización. Cada vez es más claro que muchos de estos compuestos fitoquímicos desempeñan múltiples funciones actuando en contra de algún proceso de fotocarcinogénesis (Adhami et al., 2001).

Los metabolitos secundarios extraídos de plantas han atraído considerable atención debido a sus efectos fotoprotectores en la piel, esto ha generado un gran interés en el uso de antioxidantes y filtros solares naturales para la prevención de la fotocarcinogénesis y el fotoenvejecimiento (Camacho, 2001).

Los polifenoles aislados de un extracto metanólico de corteza de *Yucca periculosa* mostraron una actividad fotoprotectora en tejidos irradiados con UV-B, además se evaluaron dichos compuestos aislados contra la mortalidad de *Escherichia coli* irradiadas con UV-B reduciendo la tasa de mortalidad celular (García-Bores et al., 2010). Se aisló y se evaluó el fenilpropanoide glicosilado conocido como verbascósido, extraído de una fracción de extracto metanólico de *Buddleja cordata*, en ratones SKH-1 irradiados con UV-B reduciendo el daño celular, al tener menor incidencia y multiplicidad de tumores (Martínez Bailón, 2012). Las epigalocatequinas (EGCG) de *Camelia sinensis* o té verde (Ahmad y Mukhtar, 1999); la silimarina obtenida de *Silybum marianum* o cardo mariano (Katiyar et., 1997); la genisteína de la soya (Wei et al., 2002), polifenoles como el resveratrol de varios frutos rojos (Dong, 2003), son ejemplos de sustancias que poseen propiedades de protección solar.

3.3. Género *Jacaranda*.

La familia *Bignoniaceae* perteneciente al orden Lamiales, comprende unos 120 géneros y 800 especies, creciendo principalmente en África y en la parte central y sur de América, se le conoce como la familia de las *vides* trompeta (Spichiger et al., 2004). Las especies de esta familia se utilizan para muchos fines como: la horticultura, plantas ornamentales, productos maderables, alimenticia, para fabricar artesanías y colorantes y como medicinal (Gentry, 1992). Un ejemplo reconocido del uso de algunas especies de esta familia, es el medicinal que se le atribuye a la corteza interior de diversas especies de *Tabebuia*, principalmente *T. impetigosa*, llamado pau d'arco en Brasil, como un analgésico, anti-inflamatorio, antineoplásico y diurético (de Miranda, et al., 2001).

Dentro de esta familia se encuentra el género *Jacaranda*, que su principal forma de vida es arbórea, se utilizan como plantas ornamentales en todo el mundo debido a sus flores. Estudios fitoquímicos previos indican que el género es una fuente de varios metabolitos secundarios, tales como: glucósidos feniletanoides, flavonoides, quinonas, fitoesteroles y antocianinas (Fernández, 1968; Blatt et al., 1998;).

En la medicina tradicional al género *Jacaranda* se le atribuyen varias actividades en la prevención y tratamiento de enfermedades. En Brasil, las hojas de *J. caroba* se consumen en forma de infusión para el tratamiento de las enfermedades venéreas, como depurativo (Di Stati et al., 2002; Gachet y Schühly, 2009; Brandão et al., 2012) y en baños para tratar infecciones generales (Di Stati et al., 2002). Se ha reportado actividad diurética y astringente (Gavilanes y Brandão, 1992), antiulcerosa y antisifilítica (Hirschmann y Arias, 1990). Además, el extracto de etanol se utiliza para la cicatrización

de úlceras (Brandão et al., 2008; Gachet y Schühly, 2009) y el extracto hidroetanólico es un componente fitosanitario, que es indicado para el tratamiento de la dispepsia (Botion et al., 2005). Además, fueron evaluadas las actividades antirradical y anticolinesterolítica *in vitro* en diferentes líneas celulares. En el extracto de diclorometano se han identificado los ácidos oleanólico y ursólico (Endringer et al., 2010). Estudios recientes indican que esta especie es una fuente rica de ácidos bioactivos y algunos derivados de flavonoides, con fuerte actividad antioxidante y anti-monoamino oxidasas (MAO) (Ferrerres et al., 2013), inhibiendo la reacción enzimática de las MAO que catalizan la oxidación de monoaminas y la degradación de neurotransmisores y aminas, por ejemplo, la serotonina y la noradrenalina (Evans y Hofmann, 1979). En Yanesha, Perú *J. copaia* es utilizada para tratar la malaria. Se prepara un té de sus hojas, funciona como preventivo y con fines curativos, además se puede aplicar como cataplasma ó en un baño de vapor para tratar heridas cutáneas. Ha demostrado tener algunas propiedades leishmanicidas basándose en derivados de quinonas, jacaranona y triterpenos (Chan-Bacab y Peña-Rodríguez, 2001).

En *J. caucana* se han identificado en un extracto metanólico de tallo feniletanoides, glicósidos y neolignanos con actividad antioxidante (Martin et al., 2009). *J. decurrens* posee actividad antioxidante, las propiedades fueron evaluadas gracias a la obtención de un extracto hidroalcohólico de hojas, obteniendo los compuestos: ácido ursólico, ácido oleanólico, además una de las fracciones resultó ser rica en glicósidos flavonoides (Carvalho et al., 2009)

3.4. Especie de estudio: *Jacaranda mimosifolia*.

Jacaranda en guaraní significa madera dura, *mimosifolia* se refiere a la similitud de sus hojas con cierto tipo de leguminosas (Mimosa), en Argentina se le conoce como tarco, en Colombia como guayacán o palo de boba y en Ecuador como arabisco (Gachet, 2008). Es un árbol sudamericano que alcanza hasta los 20 metros de altura. Se le puede encontrar distribuida en toda Latinoamérica. Incluso en la ciudad de México es utilizada con fines ornamentales, donde alcanza de 8 a 10 metros de altura (Niembro A., 1990; CONABIO, 2012).

El tronco de *J. mimosifolia* es desnudo, (figura 2) recto y cilíndrico, a veces ligeramente inclinado, su corteza es fracturada, de follaje semipersistente, hojas opuestas de color verde-medio en el haz y más claro en el envés. De flores hermafroditas de 4-5 cm de largo, de color azul-violáceo y cáliz pequeño, tubulosas, ligeramente curvas, acampanadas, pubescentes, dispuestas en amplias panojas terminales, erguidas de 24-30 cm de largo.

La floración se produce de noviembre a diciembre, antes de la foliación y a veces tiene una segunda floración, más escasa, hacia febrero en Sudamérica, mientras que la floración en Norteamérica es en marzo. El fruto leñoso de *J. mimosifolia* es dehiscente, plano, en forma de castañuela, es una cápsula loculicida de unos 6 cm de diámetro, orbicular y comprimida, de color verde que se torna pardo oscuro cuando madura, con semillas aladas, que en guaraní se llama: ka-í jepopeté que significa: aplauso de mono, en México se le conoce como: cachetada, los frutos aparecen a finales de otoño y permanecen todo el año. La polinización es entomófila (Friesen, 2004).



Figura 2. *Jacaranda mimosifolia*. Sus diferentes estructuras vegetativas y reproductivas.

Fuente: sección Vecinos verdes: Árboles comunes de las ciudades, del sitio: Biodiversidad Mexicana de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

<http://www.biodiversidad.gob.mx/Difusion/cienciaCiudadana/urbanos/ficha.php?item=Jacaranda%20mimosifolia>

3.4.1. Usos tradicionales.

La decocción de la raíz de *J. mimosifolia* se emplea como diaforético. El jarabe de la raíz o la infusión de hojas se utilizan especialmente contra las enfermedades venéreas y la forunculosis; además, se usa contra las afecciones del hígado, las hemorroides, las várices, los eczemas e impurezas de la sangre. La decocción de la corteza o de las raíces se utiliza en lavados para cicatrizar úlceras, artritis, várices, varicela, llagas heridas y escrófulas (Muñoz, 1987; Cáceres, 1996). Por vía oral se usa para curar el paludismo, la sífilis, blenorragia, diarrea, dolor en los huesos, reumatismo y artritis; en forma de gargarismos, para sanar las afecciones de la garganta, úlceras de la boca, neuralgias, soriasis, sífilis, chancros y contra los helmintos (IARNA, 2011). Para regular el ciclo menstrual, como diurético, antianémico y dolores de hueso. La decocción de las hojas o de la corteza se utiliza contra úlceras y externamente se usa en lavados vaginales.

El polvo de las hojas secas, espolvoreando sobre las úlceras, se emplea como desinfectante de heridas abiertas, llagas, para sanar afecciones de los riñones (Bogino y Gómez, 2006).

La infusión y tintura de flores, hojas y corteza se usa por vía oral para el tratamiento de disentería amebiana y otras afecciones gastrointestinales agudas (Cáceres, 1996; Nicolas, 1999).

3.4.2. Usos evaluados científicamente.

El extracto de las hojas de *J. mimosifolia* resultó ser un potente antiséptico *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* y *Neisseria gonorrhoeae*. En casos de impétigo infantil, con el uso del extracto en forma de ungüento, se observa la resolución total de la lesión en un lapso de 48 hrs. La loción de jacaranda presenta actividad sobre el acné y se comporta como agente antitumoral (Piñeros, 1988). Se le atribuye propiedad antiséptica, antiamebiana, antitumoral y espasmolítica (Villareal et al., 1992).

Algunos de los compuestos que han sido reportados para esta Bignoniaceae son capaces de frenar diversas afecciones de entre las cuales podemos mencionar forunculosis, afecciones del hígado, várices, eczemas, cicatrización de heridas, enfermedades cutáneas, antiséptico, inhibiendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Acosta, 1992; Cáceres, 1996). El extracto de jacaranda se usa también para afecciones de la piel tan severas como el acné (Cevallos, 2013). Además, a la jacaranda se le atribuye propiedades antisépticas, antiamebianas, antitumorales y espasmolíticas (Ramiro et al., 2007).

Entre los compuestos que han sido identificados están (figura 3): Ácido jacarándico, jacaronona (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexandienil acetato de metilo), ácido jacoumárico, ácidoursólico y otras sustancias flavonoides, grandes cantidades de taninos y un compuesto que le da la coloración a las flores llamado: jacarandina (Lema, 2013).

Las flores contienen flavonoides: neohesperidósidos y glucósidos de apigenina, rutinósidos de cianidina y glucósidos de delphinidina (Subramanian et al., 1972; Mahran et al., 1991). Las hojas y ramas contienen fenoles, antocianinas, glucósidos de apigenina y escutelareina, quinoides, lignanos y esteroides (espinasterona) (Scogin, 1980; Mahran et al., 1991). El estudio de los componentes polares de las hojas condujo al aislamiento de una ciclohexanona (jacaranona), un glucósido fenilpropanoide, verbascósido (acetósido) y un éster de glucosa: la jacaranosa (Cometa et al., 1993).

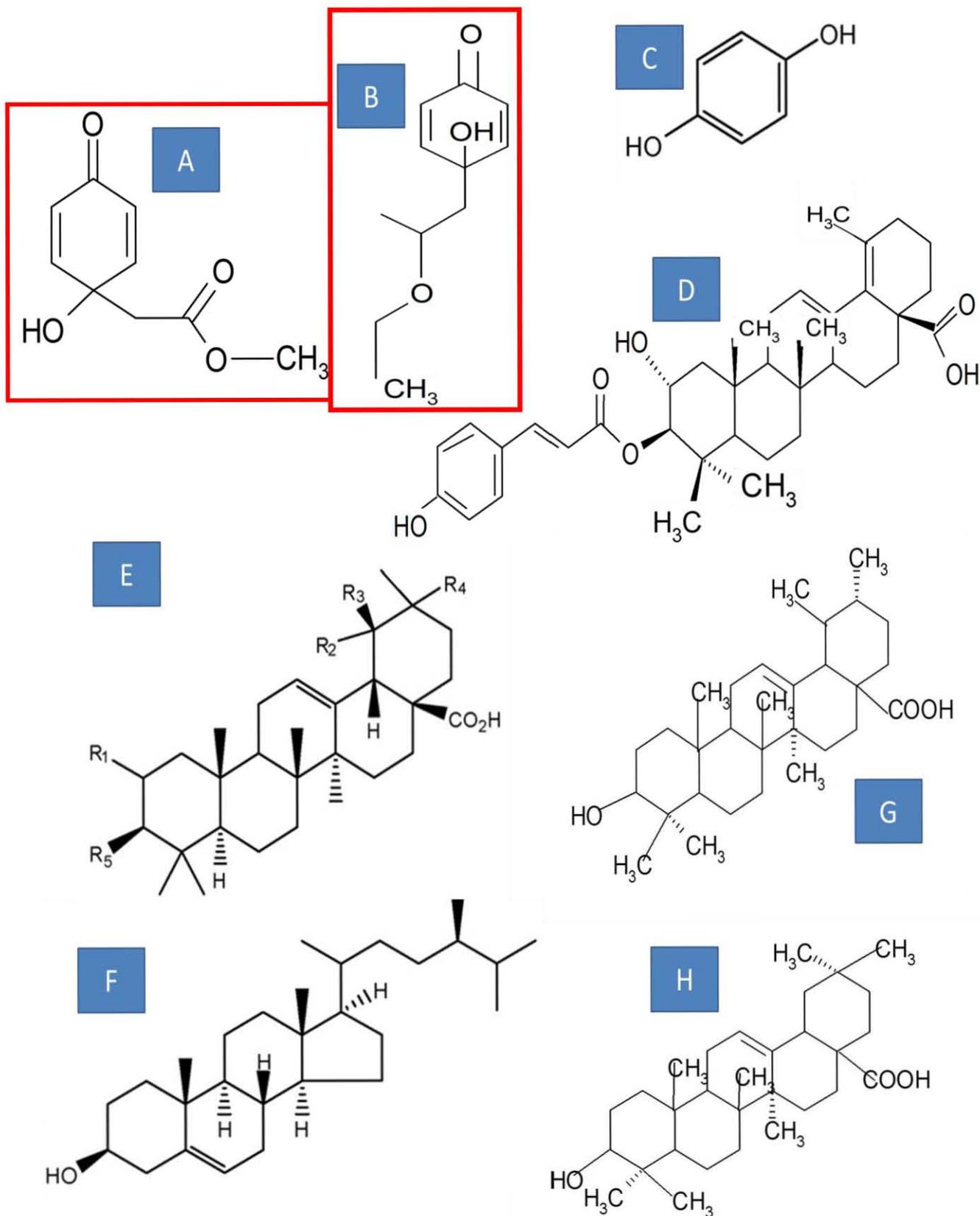


Figura 3. Metabolitos secundarios identificados en el género *Jacaranda*. A. Jacaranona; B. Metil jacarana; C. Hidroquinona; D. Ácido jacoumárico, E. Lupenona; F. β -Sitosterol; G. Ácido ursólico; H. Ácido oleanólico. En rojo los compuestos que se ha reportado con actividad antioxidante.

3.5. Extracto metanólico.

En el extracto metanólico de flor de *J. mimosifolia* es posible encontrar: fenoles, taninos, flavonoides y glucósidos de antocianinas, que son grupos de metabolitos secundarios capaces de absorber la luz UV y/o ser antioxidantes (Mahran et al., 1991)., sin embargo, muchos de ellos poseen propiedades biológicas aún no estudiadas.

Los compuestos fenólicos, en particular, han demostrado prevenir el estrés oxidativo, y patologías crónicas como el cáncer, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Asadi et al., 2010; Sun et al., 2011). Los compuestos fenólicos también pueden modular las actividades de enzimas y receptores, siendo considerados como drogas multi-objetivo (Zhang et al., 2006; Yi et al., 2010). Además, los inhibidores de MAO, se utilizan para tratar la depresión, y a superar la disminución de monoaminas como la serotonina, la noradrenalina y adrenalina (Youdim et al., 2006; Shih et al., 2009).

3.6. Modelo biológico de estudio: *Saccharomyces cerevisiae*.

Para evaluar sustancias fotoprotectoras se han utilizado diferentes modelos biológicos, sin embargo, algunos de ellos son costosos (cepas de ratones: Koshiishi y colaboradores 2000; Hollands-Barca y colaboradores en 2003; Konger y colaboradores en 2016), en otros modelos se necesitan periodos largos de observación (cultivos con diferentes líneas celulares: fibroblastos HSG8 de piel humana por Park y Bae en 2013; queratinocitos por Schütz y colaboradores en 2013), y algunos microorganismos usados son patógenos para el ser humano (en *E. coli*, Prada-Medina y colaboradores en 2016). Por esta situación dentro del estudio de sustancias fotoprotectoras, ante los pocos y caros modelos de protección contra la RUV, es necesario estudiar alternativas económicamente atractivas para evaluar sustancias fotoprotectoras.

Las levaduras son células esféricas u ovals unicelulares (figuras 4), con un diámetro de 3 a 5 μm aproximadamente. Son organismos eucariontes, la estructura principal macromolecular de la pared celular es la quitina, constituida por moléculas de N-acetil-glucosamina unidas entre sí como las de glucosa en la celulosa, por enlaces β -1,4 glucosídicos (Davis et al., 1984). El crecimiento de las levaduras se produce por un proceso de gemación, en el que la célula hija se separa de la célula madre tan pronto como ha madurado (haploide), sin embargo, también posee reproducción sexual (diploide), (figura 5). En cuanto a la alimentación de *S. cerevisiae*, los requerimientos nutritivos son simples y pueden prepararse fácilmente los medios de cultivo adecuados (Brock, 1978).



Figura 4. Fotografía del ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*, microscopia de barrido.

Tomado de: Eye of Science / Science Photo Library.

<http://www.microbiologyonline.org.uk/about-microbiology/introducing-microbes/fungi>

S. cerevisiae, es una levadura capaz de crecer en medios definidos simples, lo que permite el completo control de su fisiología. Las características de su ciclo celular vegetativo, como es la coexistencia de los estados haploides y diploides, así como la existencia de dos tipos sexuales de células haploides: α y a , facilitan los estudios genéticos, y permiten determinar el efecto de la ploidía y del tipo celular en la acción génica. Además, el desarrollo de herramientas genéticas muy eficientes, que permiten que cualquier gen sea reemplazado por un alelo mutante o sea completamente escindido del genoma con gran exactitud (Rothstein, 1983; Guldener et al., 1996), facilita los estudios genéticos en este organismo eucariótico.

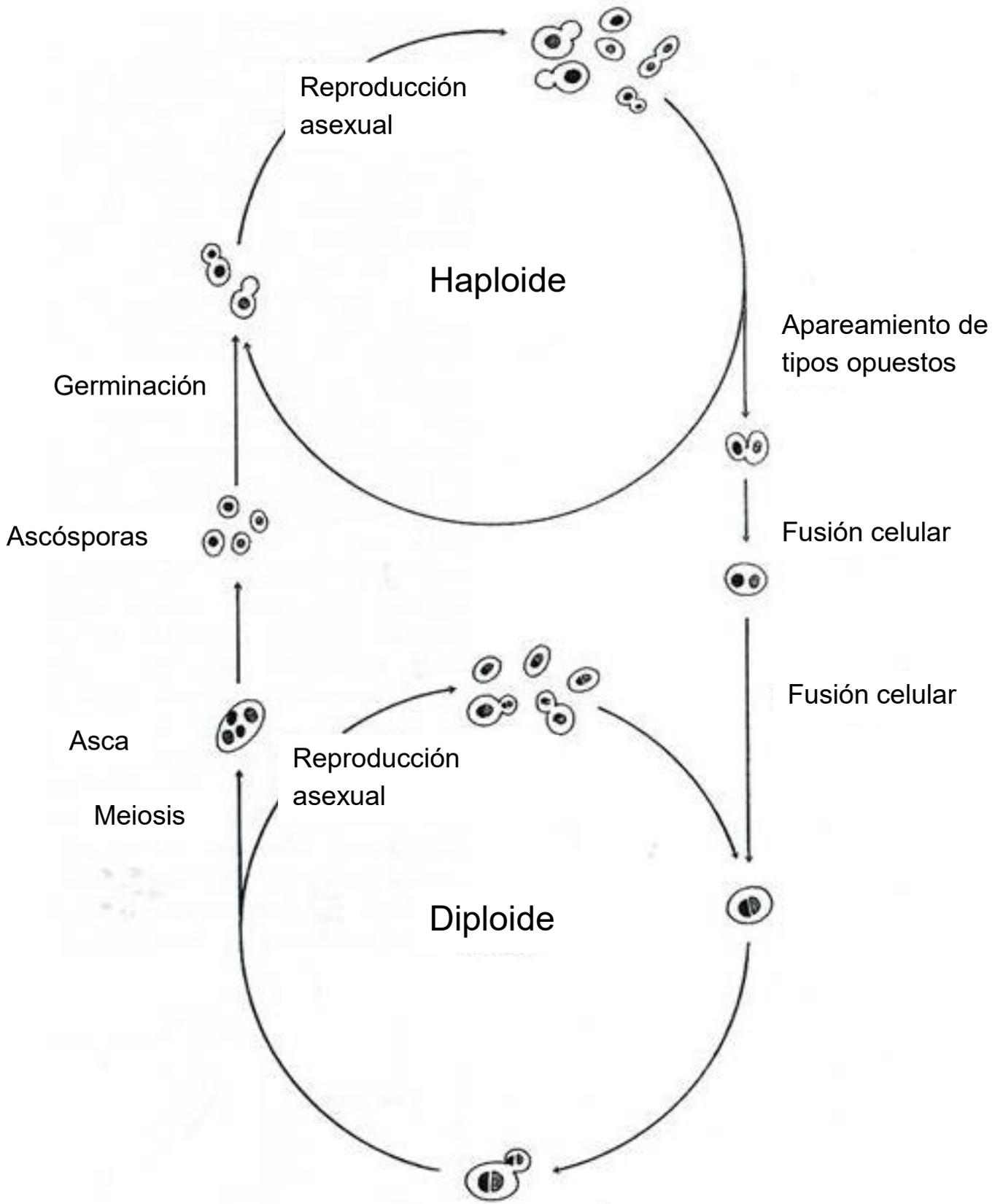


Figura 5. Ciclo biológico de *Saccharomyces cerevisiae*.

S. cerevisiae ha sido ampliamente utilizado por los seres humanos desde hace miles de años y es posiblemente una de las especies microbianas más importantes en la historia de la humanidad (Chambers et al. 2010). Esta relación se debe a un solo rasgo: su capacidad para producir alcohol a partir del azúcar. También es útil para aumentar el volumen del pan, la producción de combustible y de proteína. La demanda de bebidas alcohólicas motivó a Pasteur en 1897, y la investigación de los Laboratorios Carlsberg (Hansen, 1896) al estudio científico de la levadura. Desde entonces *S. cerevisiae* ha logrado una segunda distinción: es el organismo que se usa como modelo genético mejor entendido (Chambers et al., 2010).

S. cerevisiae fue el primer eucariota en tener su genoma completamente secuenciado, y por lo tanto es el modelo biológico más estudiado, más manejable a manipulaciones y análisis genéticos (Cherry, 2011). Diversos proyectos han determinado las funciones biológicas y las interacciones genéticas de todas las partes del genoma de *S. cerevisiae* (Kelly et al., 2001; Boone, 2014). *S. cerevisiae* ha sido clave para numerosos avances importantes en la genética, la bioquímica y la biología celular (Chambers et al., 2010).

Debido a lo anterior, en este trabajo se propone a la levadura *S. cerevisiae* como nuevo modelo biológico para evaluar compuestos con una posible actividad fotoquimioprotectora, tiene la ventaja de que se pueden obtener varias generaciones en relativamente poco tiempo, además es posible estudiar en esta levadura las alteraciones a nivel genético causado por la radiación ultravioleta, es un modelo económicamente barato y no es patógeno para el ser humano.

Justificación

La radiación solar es esencial para el hombre, sin embargo, la exposición prolongada a la RUV-B produce efectos adversos en cualquier organismo. En la piel humana causa inflamación, eritema, inmunosupresión, fotoenvejecimiento y cáncer de piel. Actualmente se tiene conocimiento sobre estos padecimientos y por lo tanto de la importancia de la fotoprotección. Un gran número de personas continúan exponiéndose excesivamente a estas radiaciones sin protección alguna; aunado a esto, la disminución de la capa de ozono estratosférico provoca una mayor incidencia de radiación sobre la Tierra, lo que puede representar un riesgo para la salud. En los próximos años se espera que el cáncer de piel se incremente de manera significativa, por tal motivo existe la necesidad de encontrar sustancias que contenga compuestos químicos capaces de disminuir los efectos adversos de la RUV-B. En ese sentido, el extracto metanólico de flor de *J. mimosifolia* puede contener compuestos químicos que en su estructura molecular posean zonas cromóforas a la luz UV-B y con posible actividad antioxidante.

Es posible que la levadura sea capaz de crecer en un medio de cultivo cuya única fuente de carbono sea el extracto metanólico de flor de *J. mimosifolia*. Los compuestos que se encuentran en el extracto probablemente están constituidos de anillos aromáticos (Subramanian et al., 1972), como: fenoles simples, flavonoides (Scogin, 1980), glucósidos aromáticos, antocianinas, quinoides y esteroides (Mahran et al., 1991), y la jacaranona, que es un éster de glucosídico de p-hidroxiquinona (Cometa et al., 1993).

Por lo tanto, nuestras preguntas científicas son: ¿*Jacaranda mimosifolia* posee propiedades fotoprotectoras? y ¿Éstas se pueden determinar usando *S. cerevisiae* como modelo biológico?

Hipótesis

El extracto metanólico de flor de *Jacaranda mimosifolia* posee sustancias fotoquimioprotectoras que se pueden evaluar en el modelo biológico de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Objetivos

6.1. Objetivo general.

Evaluar las propiedades fotoprotectoras del extracto metanólico de la flor de *Jacaranda mimosifolia* usando a *Saccharomyces cerevisiae*, como modelo biológico.

6.2. Objetivos particulares.

- A. Obtener el extracto metanólico de la flor de *J. mimosifolia*.
- B. Obtener las cinéticas de crecimiento de *S. cerevisiae* en diferentes medios de cultivo para ser usados en pruebas de desafío.
- C. Determinar si *S. cerevisiae* es capaz de crecer en un medio de cultivo cuya única fuente de carbono es el extracto metanólico de *J. mimosifolia*.
- D. Evaluar el efecto fotoprotector del extracto de *J. mimosifolia* en *S. cerevisiae* expuesta a RUV-B.
- E. Determinar el efecto fotoprotector del extracto de *J. mimosifolia* por medio de la expresión diferencial de proteínas, entre los diferentes experimentos de exposición a la RUV-B.

Estrategia experimental

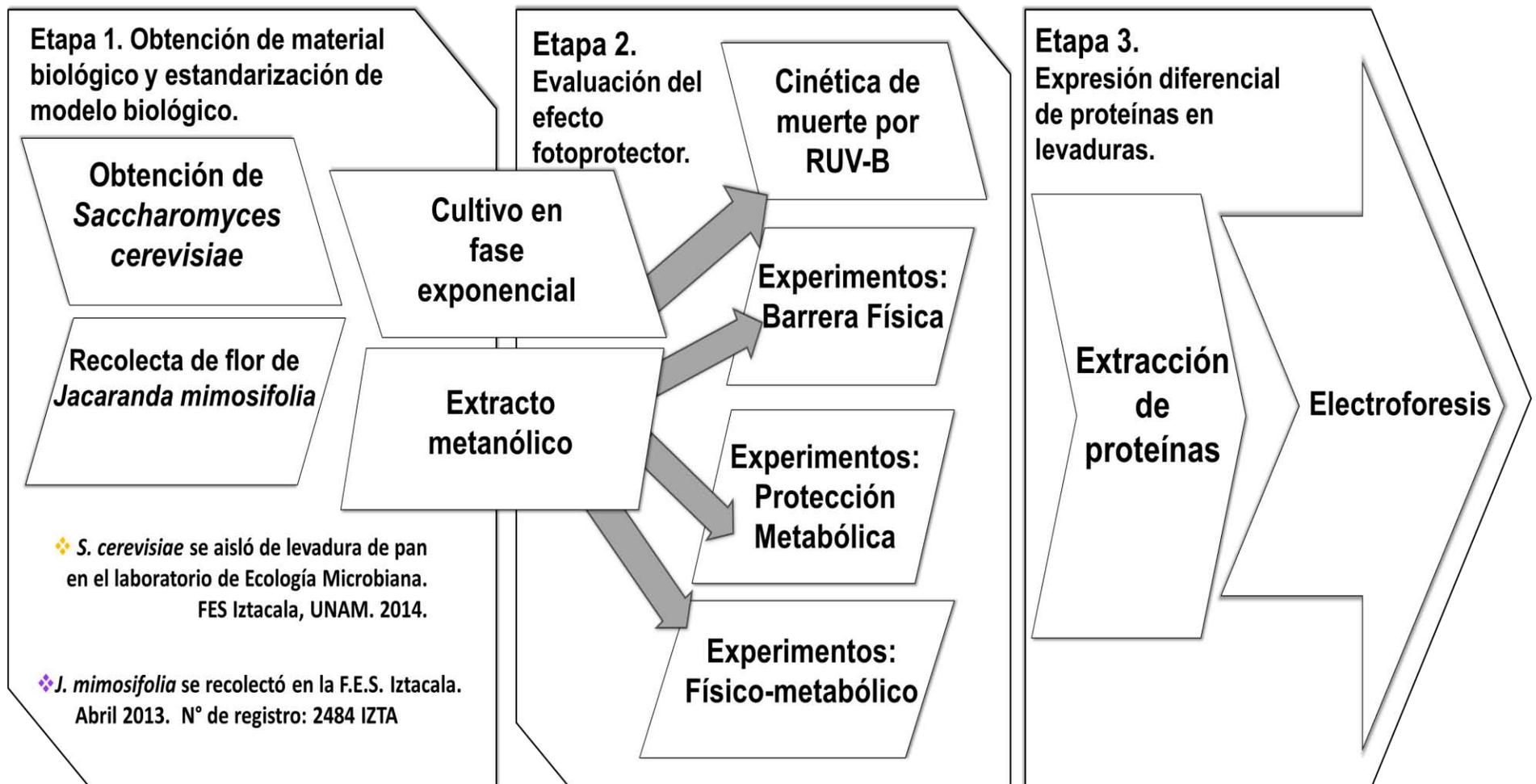


Figura 6. Diagrama metodológico

Etapa 1

7.1.1. Obtención del material vegetal.

Las flores se recolectaron en el mes de febrero, en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México. Un ejemplar con hojas, flores y frutos se recolectó para su identificación en el herbario de la FES-I, UNAM, al cual se le asignó el número de registro: 2484 IZTA.

7.1.2. Obtención del extracto metanólico de flor.

Las flores (1 Kg) fueron recolectadas se limpiaron y se maceraron en metanol (CH_3OH). La solución se filtró y posteriormente se destiló a presión reducida, en un rotavapor Heidolph a una temperatura de 60°C y a una velocidad de 60 rpm, se recuperó el destilado para después calcular el rendimiento del extracto.

7.1.3. Espectro de absorción del extracto metanólico.

Para obtener el espectro de absorción en la región del ultravioleta, se tomaron 50 μg de extracto metanólico de flor que fue disuelto en 1 mL de CH_3OH , el barrido se realizó a partir de 190 a 350 nm en un espectrómetro PerkinElmer Lambda 25 UV/VIS, a una longitud de onda de 190 a 350 nm.

7.1.4. Obtención del cultivo axénico.

El inóculo inicial de *S. cerevisiae* fue aislado a partir de levadura usada para la producción de pan por el Maestro en Microbiología Andrés Martínez Cortés del laboratorio de Fitoquímica de la FES-Iztacala. La resiembra fue realizada de acuerdo a la técnica de estría cruzada (figura 7), en agar de dextrosa y papa (PDA). Ya reactivado el cultivo, se hizo crecer en medio líquido Sabouraud. Se prepararon muestras para realizar una observación al microscopio óptico y comprobar la pureza del cultivo (figura 7).

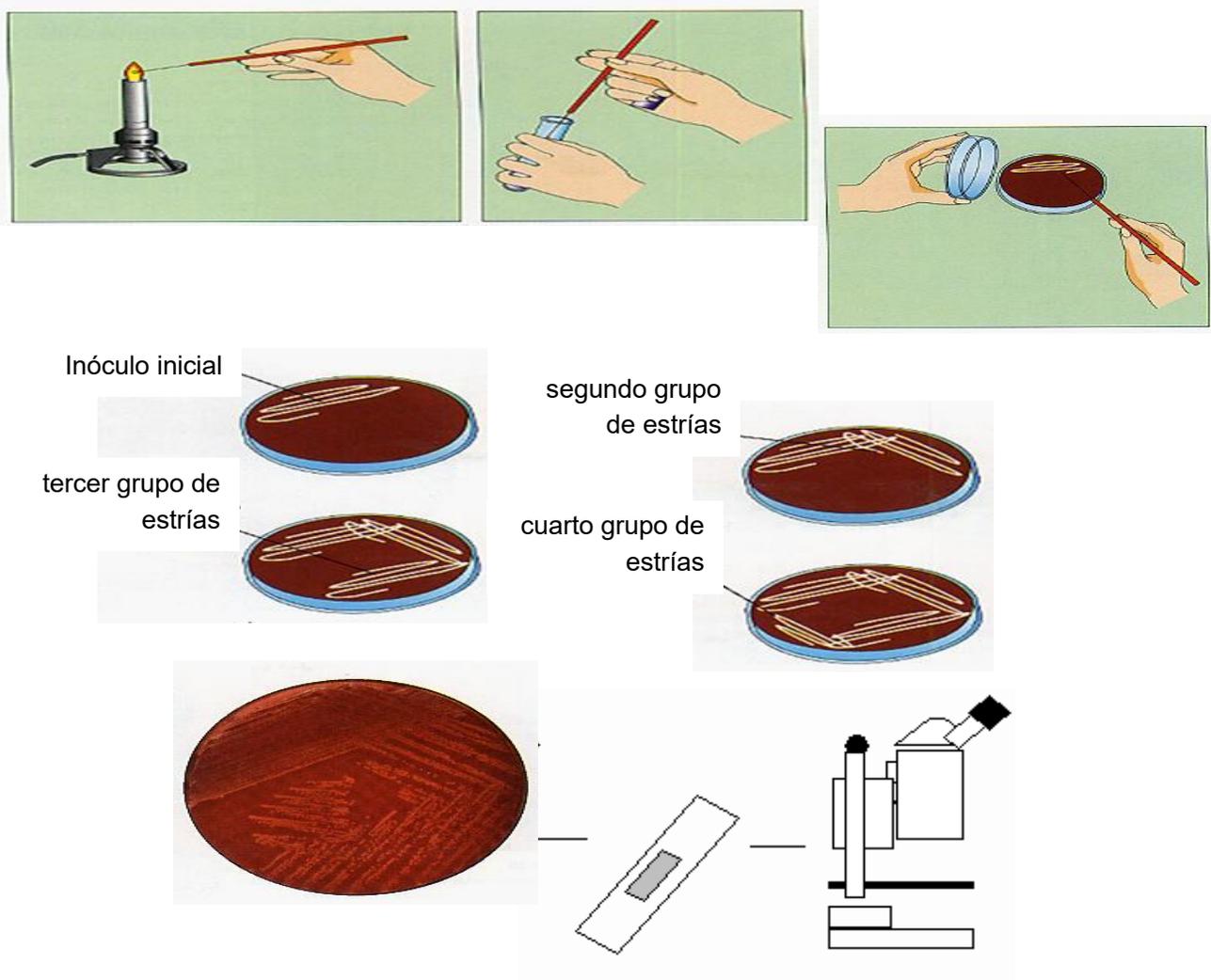


Figura 7. Esquema de la obtención de *S. cerevisiae* en cultivo axénico en PDA y su observación al microscopio óptico.

7.1.5. Cinética de crecimiento en medio líquido.

Una vez asegurada la pureza del cultivo de *S. cerevisiae* se procedió a la evaluación del crecimiento. Para obtener la cinética de crecimiento de la población de levaduras, el cultivo de *S. cerevisiae* se mantuvo dentro de una incubadora en medio líquido Sabouraud a 30°C durante 20 horas. Las mediciones se realizaron a las 0, 4, 8, 12, 14, 16, 18 y 20 horas de crecimiento, utilizando un tubo estéril con medio líquido Sabouraud como tubo blanco. A partir de las 10 horas de haber realizado la siembra, se comprobó el crecimiento mediante turbidimetría usando un espectrofotómetro Coleman a una longitud de onda de 600 nm.

7.1.6. Cinética de crecimiento en medio sólido.

7.1.6.1. Preparación del inóculo.

Para determinar la cinética de crecimiento de la levadura, se utilizó la técnica de dilución (Toro C., 2005., Davis, 1984). El inóculo inicial se preparó haciendo crecer la levadura en medio líquido durante 16 horas, el cultivo se centrifugó a 3500 rpm durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se suspendió en 10 ml de solución salina fisiológica (SSF). Se cuantificaron los sobrevivientes realizando 3 diluciones: con tubos tipo falcon para centrifuga de 15 ml donde se resuspendieron las pastillas, se aseguró la perfecta homogeneización con SSF, se tomó 100 µl y se vertieron en otro tubo tipo falcon con 10 ml de SSF estéril (1ra. dilución), y de éste se tomaron otros 100 µl (2da. dilución) para otro tubo tipo falcon con 10 ml de SSF estéril y de éste último se tomaron 100 µl (3ra. dilución) para realizar la resiembra en PDA. (figura 8), que se incubaron a 30°C durante 16 y posteriormente contar las Unidades Formadoras de Colonia (UFC).

7.1.6.2. Cinética de crecimiento.

Las diluciones de *S. cerevisiae* se realizaron hasta las 20 horas de crecimiento en intervalos de 2 horas (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 horas). Se sembraron 100 µl con asas de siembra de vidrio esterilizadas con un mechero, para homogeneizar cada una de las cajas petri con PDA, tres cajas por tiempo de crecimiento. Las cajas se mantuvieron en incubación a 30°C durante 24hrs. Después se realizaron el conteo de las placas y las gráficas del crecimiento.

En muchos casos se cuentan las células vivas y esto suele hacerse mediante el recuento de células viables. Una célula se define como viable cuando colocada en un medio adecuado, es capaz de dividirse y dar descendencia. El método habitual de lograr esto es sembrar pequeñas alícuotas de diluciones adecuadas de un cultivo original sobre placas de Petri con medio sólido. Cada célula viable dará origen a una colonia visible después del tiempo adecuado de incubación. Contando las colonias visibles y teniendo en cuenta la dilución de la que proceden, así como el volumen de alícuota utilizado, es fácil deducir el número de células viables en la suspensión original. El recuento se refiere no a número de células viables reales sino a unidades formadoras de colonia (UFC). Por lo tanto, una UFC corresponde, como mínimo, a una levadura, pero sobre todo una levadura con agrupaciones, la medida por siembra en placa infravalora el número real de individuos, porque cada UFC puede corresponder a dos o más individuos que estaban juntos al ser sembrados en la placa.

“Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia*, usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” M.A.R.E.

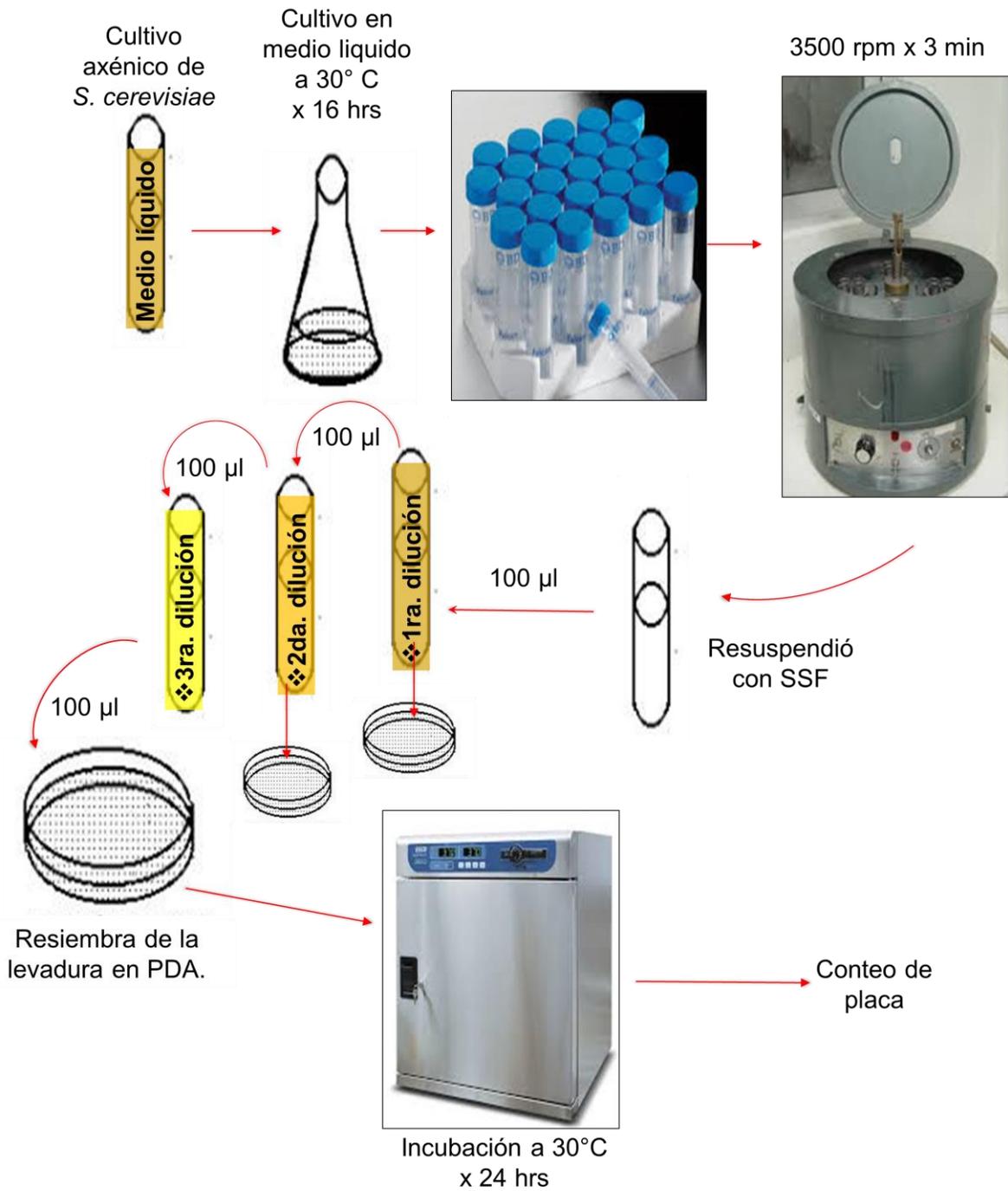


Figura 8. Crecimiento de *S. cerevisiae* en medio sólido, mostrando la técnica de dilución.

Etapa 2

***S. cerevisiae* expuesta a UV-B.**

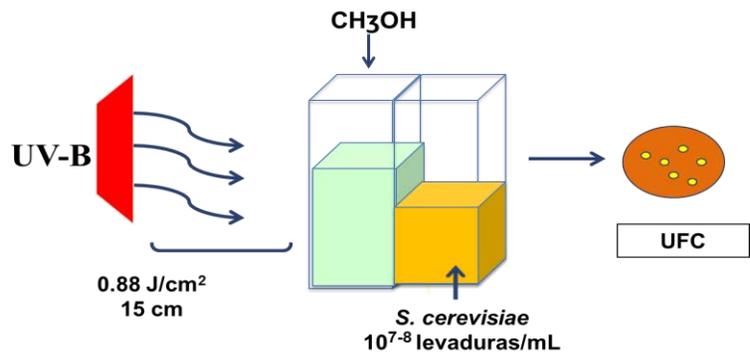
7.2.1. Experimentos de desafío.

Una vez establecido el tiempo de incubación necesario para que la población de levaduras alcance la fase exponencial, se procedió a planear los experimentos para la evaluación de las propiedades fotoprotectoras del extracto metanólico de flor de *J. mimosifolia*. Esta etapa del proyecto consta de 4 experimentos de desafío (figura 10).

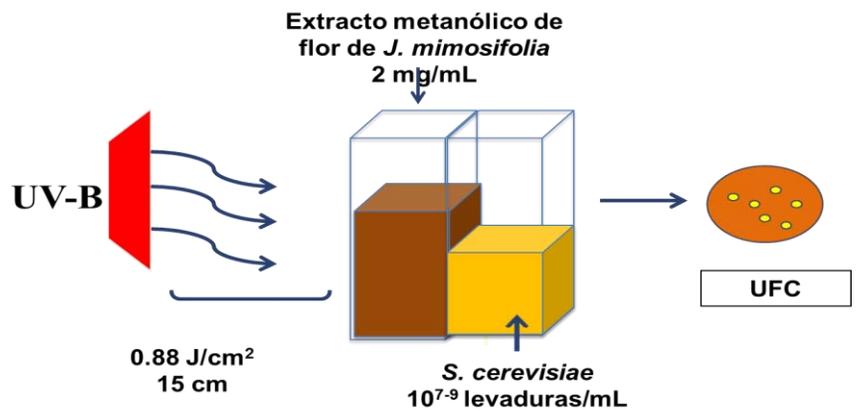
- A. El primer experimento fue exponer a *S. cerevisiae* a RUV-B sin protección.
- B. El segundo experimento fue irradiar a la levadura con una protección física, utilizando el extracto de *J. mimosifolia* como barrera.
- C. Para el tercer experimento se preparó un medio de cultivo utilizando el extracto metanólico como fuente de carbono para el cultivo de *S. cerevisiae*, para que la levadura pueda crecer en éste, determinando si los metabolitos presentes en el extracto pudieran proteger a nivel metabólico contra el daño por RUV-B.
- D. Y por último, se hizo un experimento para determinar la protección combinada, tanto a nivel físico como a nivel metabólico, en este caso el extracto se utilizó como barrera física y como medio de cultivo.

“Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia*, usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” M.A.R.E.

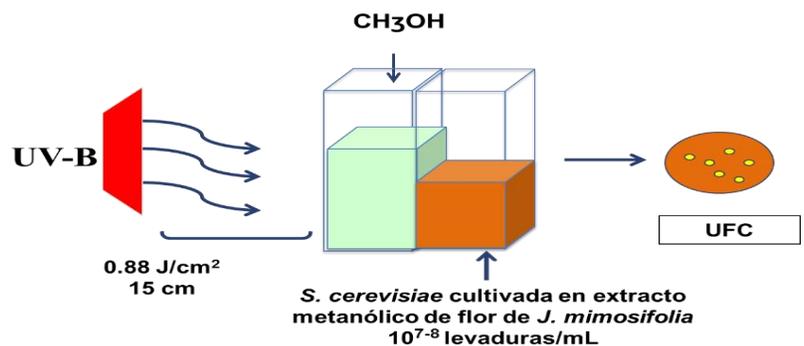
1. Exposición a RUV-B sin protección.



2. Exposición a RUV-B con protección física.



3. Exposición a RUV-B con protección metabólica.



4. Exposición a RUV-B con protección físico-metabólica.

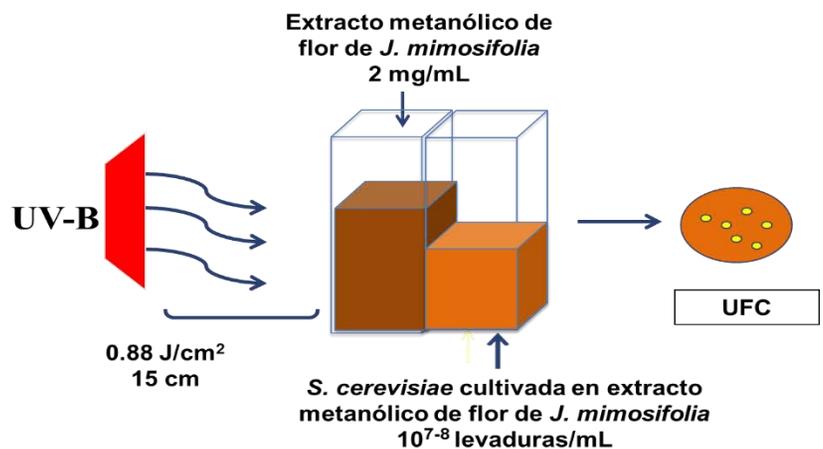


Figura 9. Esquemas de experimentos de desafío: 1. Experimento sin protección a irradiación UV-B; 2. Experimento con barrera física. 3. Experimento con barrera metabólica; 4. Experimento con barrera física y metabólica.

7.2.2. Experimento de irradiación con UV-B sin protección.

El inóculo de la población de levaduras en fase exponencial se centrifugó a 3500 rpm durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con SSF. Los tiempos de irradiación fueron: 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 segundos. En cada tiempo de irradiación se colocaron cada una de las unidades experimentales, constituidas por 2 cubetas de cuarzo una con CH₃OH y otra con las células de levadura en 2 ml de SSF, ambas cubetas se fijaron para evitar algún movimiento, primero se colocó la cubeta que contenía CH₃OH de cara a lámpara de UV-B y detrás de ésta, la cubeta con levaduras (figura 9.1). Las cubetas se irradiaron a una distancia de 15 cm de la lámpara de luz UV-B, la dosis utilizada fue de 0.88 J/cm², la cual se determinó con un radiómetro Spectroline DM-300HA (figura 10).

En cada tiempo de irradiación se cuantificaron los sobrevivientes realizando 3 diluciones en SSF, (de manera similar a la manera mencionada en el apartado 1.F). Después se realizó el conteo de placa para obtener el número de sobrevivientes y con estos datos construir las gráficas del experimento, para obtener las constantes de mortalidad (K) de *S. cerevisiae* expuesta a RUV-B.

“Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia*, usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” M.A.R.E.

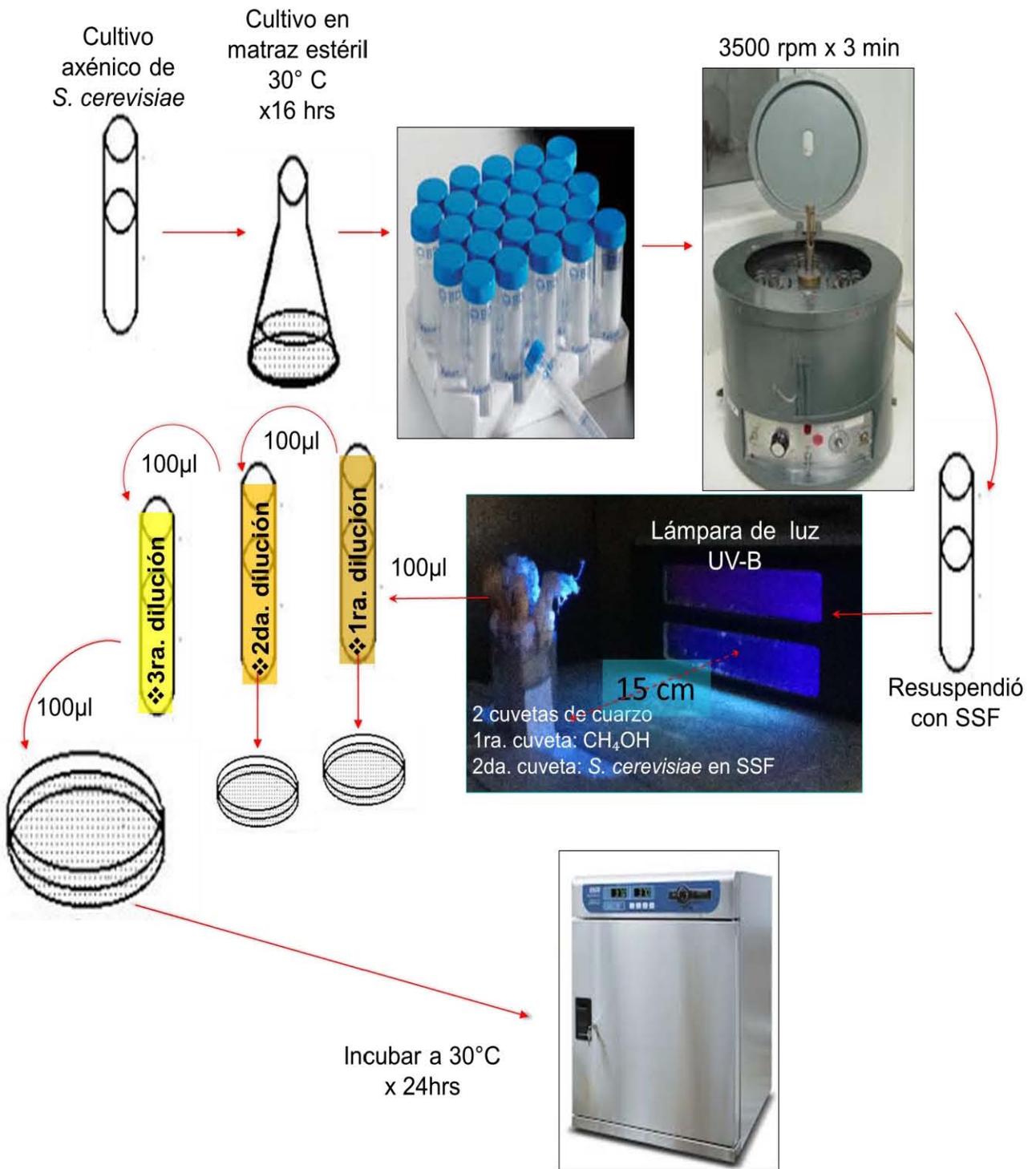


Figura 10. Diagrama ejemplificando el experimento de la cinética de muerte de *S. cerevisiae* por exposición a la RUV-B.

7.2.3. Protección física.

En el primer experimento de protección se utilizó el extracto metanólico de *J. mimosifolia* como barrera física en contra de la irradiación por UV-B. Con el inóculo de 16 horas se procedió a centrifugar a 3500 rpm durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con SSF.

El experimento de protección física consta de 8 tiempos de irradiación: 15, 30, 60, 90, 120, 210 segundos, 90 y 180 minutos. El extracto de *J. mimosifolia* se disolvió 2 mg/mL en metanol para obtener la solución fotoprotectora. Primero se colocó la cubeta que contenía la solución fotoprotectora de cara a lámpara de UV-B y detrás de esta, la cubeta con SSF con levaduras en crecimiento exponencial (Figura 9. 2.) Cuantificando sobrevivientes y obteniendo las K.

7.2.4. Protección a nivel metabólico.

7.2.4.1 Adaptación de *S. cerevisiae* al extracto de *J. mimosifolia*.

Para que *S. cerevisiae* pueda crecer en un medio de cultivo cuya única fuente de carbono sea el extracto metanólico de *J. mimosifolia*, se realizaron distintas resiembras de la levadura en diferentes medios con el propósito de activar metabólicamente a la levadura y conseguir su adaptación al extracto de *J. mimosifolia*. A partir de una población de *S. cerevisiae* en fase exponencial en medio solido:

- ❖ Se resembró en cajas con agar bacteriológico y extracto de *J. mimosifolia* (39 g/L) como fuente de carbono, dejando incubar a 30°C durante 16 horas.
- ❖ Resiembra de colonias aisladas e inoculación en extracto de *J. mimosifolia* a una concentración de 1 g/L disuelto con SSF, dejando incubar a 30°C durante 32 horas.

7.2.4.2. *S. cerevisiae* cultivada en extracto y expuesta a RUV-B.

Cuando la población de levaduras que creció en contacto con el extracto alcanzó la fase exponencial, se centrifugó a 3500 rpm durante 3 minutos, el sobrenadante constituido por extracto de *J. mimosifolia* y amortiguador se decantó, la pastilla se resuspendió con SSF, procediendo a irradiar con UV-B la levadura adaptada metabólicamente al extracto metanólico de *J. mimosifolia*.

Este experimento constó de 8 tiempos de irradiación: 1.5, 3, 4.5, 7.5, 12, 15, 24 y 30 minutos. Colocando dos cubetas por tiempo de exposición a la RUV-B. La primera cubeta contenía CH₃OH y detrás de esta la cubeta con las levaduras (figura 9.3). Repitiendo el proceso de los anteriores experimentos: conteo de placa, obtención del logaritmo de sobrevivientes y la gráfica del experimento.

7.2.5. Protección a nivel físico-metabólico.

Se realizó un cuarto experimento donde *S. cerevisiae* se irradió con protección contra la RUV-B. Las levaduras fueron cultivadas en un medio cuya única fuente de carbono fue el extracto de flor de *J. mimosifolia*, además de utilizar el extracto como barrera física durante la exposición a la RUV-B (figura 9.4). Las condiciones de cultivo de la levadura en el extracto son similares a las del apartado anterior 2. D. La solución fotoprotectora se elaboró de acuerdo al apartado 2. C. Se llevó a cabo el conteo de placa correspondiente, de acuerdo a lo realizado a los tres anteriores experimentos de desafío.

7.2.6. Análisis y recuperación de material biológico irradiado.

Después de cada uno de los experimentos de desafío se realizó el conteo de placa y se construyeron las gráficas de cada uno de los experimentos, obteniendo las líneas de tendencia y los logaritmos de UFC (Unidades Formadoras de Colonia) que indican un número aproximado del número de sobrevivientes para cada uno de los experimentos en cada tiempo de irradiación.

Además, se realizaron gráficas de dispersión con los datos de todos los experimentos de desafío omitiendo aquellos tiempos de exposición a la RUVB en que la levadura no sobrevive a la exposición, para obtener las constantes de mortalidad de cada uno de los desafíos.

Utilizando como criterio de elección el número de UFC que sobrevivieron a la irradiación en cada tiempo, se establecieron los tiempos adecuados para recuperar suficiente material celular y obtener las proteínas de levaduras irradiadas.

Del experimento con protección física se recuperaron las células irradiadas a los 90, 210 segundos, 180 y 210 minutos, mientras que del experimento sin protección se recuperaron a los 90, 180 y 210 segundos. Una vez establecidos los tiempos adecuados de irradiación se procedió a recuperar el material biológico para comparar los distintos experimentos. Para el control negativo, se utilizaron resiembras de *S. cerevisiae* con crecimiento exponencial en medio sólido PDA. En este grupo experimental la levadura no está expuesta a la RUV-B y crece en condiciones ideales.

Etapa 3

Para todas las pruebas de desafío incluyendo controles negativos, se recuperaron las células para su posterior análisis con diferentes técnicas de extracción de proteínas y así evaluar una posible expresión diferencial de éstas proteínas por exposición a la RUV-B.

Concluyendo el experimento de irradiación, se procedió a recuperar el material expuesto a RUV-B de las cubetas de cada uno de los tiempos de irradiación en un tubo tipo falcón de 15 mL estéril, después se centrifugó y se decantó el sobrenadante, una vez obtenida la pastilla está se recuperó en tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles con micropipeta y puntas estériles. Cada tubo se sumergió en una cuba con nitrógeno líquido, durante 30 segundos, repitiendo el proceso 2 veces. Se almacenó inmediatamente en un congelador REV-CO a -74°C para su posterior uso en la extracción de proteínas.

Para la extracción de proteínas se utilizó el buffer RIPA, la mezcla de reactivos tiene un amortiguador que permite la lisis celular y la solubilización de proteínas eficientemente, evitando su degradación y la interferencia con la inmunorreactividad de las proteínas y actividad biológica. La fórmula del buffer RIPA es: 10 mM Tris-Cl (pH 8-0), 1mM EDTA, 0.1% SDS, 140 mM NaCl, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) según Sigma-Aldrich Co. LLC en 2015.

Características del buffer RIPA:

- Práctico: listo para usar la solución; no hay necesidad de montar y preparar componentes.
- Flexible: compatible con muchas aplicaciones, incluyendo ensayos de proteína, inmunoensayos y purificación de proteínas.
- Versátil: permite la extracción de citoplasmática, membrana y proteínas nucleares.
- Se describe la formulación proporcionando a los usuarios un control completo y el conocimiento de los posibles problemas de compatibilidad.

7.3.1. Extracción de proteínas.

La extracción de proteínas se realizó siguiendo los siguientes pasos: a cada uno de los tubos Eppendorf de 1.5 mL con células de *S. cerevisiae*, se le agregó amortiguador RIPA a una proporción de 1:5 p/v de acuerdo al contenido de cada uno de los tubos. Se procesaron las muestras de irradiación con protección física, irradiación sin protección y 2 controles negativos en donde la levadura creció en condiciones ideales y sin exposición a RUV-B. Después de agregar RIPA a cada uno de los tubos Eppendorf, se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 20 min y después se centrifugaron a 10 000 rpm por 20 min, se recuperó el sobrenadante en tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles.

Se llevó a cabo una cuantificación de proteínas por el método de Bradford, la curva patrón se construyó de acuerdo a la siguiente tabla (tabla 2), se midió ABS con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 1.1 a 595 nm.

	TUBO						
Reactivo (mL)	1	2	3	4	5	6	7
Bradford	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
BSA (100 µg/mL)	0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0
Agua destilada	0.5	0.45	0.4	0.35	0.3	0.25	0.5
Muestra problema	0	0	0	0	0	0	0.01

Tabla 2. Preparación de la curva patrón para la cuantificación de proteínas.

7.3.2. Electroforesis.

Para realizar una comparación de posibles expresiones diferenciales de proteínas se realizó una electroforesis con gel de poliacrilamida al 12% en una caja de electroforesis Mini Protean Bio-Rad, con una fuente de poder Bio-Rad Power Pac 300 a 120 V, 40 mA durante 3 horas, en cada uno de los pocillos destinados a cada uno de las muestras, se cargaron un total de 20 µL de muestra en cada pozo, 5 µL son amortiguador de carga, el Marcador de Peso Molecular (MPM) fue de la marca BenchMark™ elaborado por Thermo Fisher Scientific Inc en 2014, los geles fueron tenidos con tinción de azul de coomassie.

“Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia*, usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” M.A.R.E.

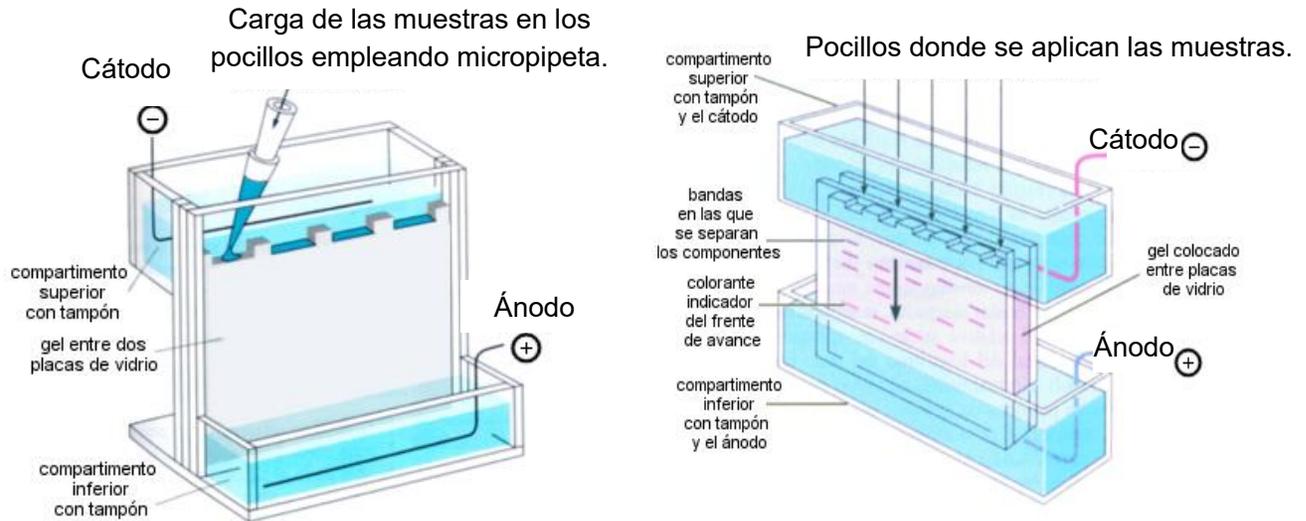


Figura 11. Diagrama de cámara de electroforesis. Posición de cargas eléctricas (cátodo - y ánodo +). Aplicación y desplazamiento de muestras en los pocillos.

7.3.2.1 Análisis de expresión diferencial de proteínas.

Terminada la separación de proteínas en la electroforesis, se tomaron fotografías y realizó la preservación de los geles en papel celofán dulce, para su posterior digitalización. Se hizo la estimación de los pesos moleculares en kiloDaltones (kDa) de las bandas de interés. Para esto se revelaron y se representaron las bandas por la movilidad (distancia avanzada o, mejor, cociente entre ésta y el avance del frente de electroforesis) frente al logaritmo del tamaño (kDa), sobre la recta ajustada se interpolan las distancias de avance de las muestras problema, calculando así su tamaño en kDa (G-Biosciences, 2014).

Para determinar posibles proteínas presentes y/o ausentes, se realizó un análisis comparativo de cada uno de los experimentos, así como de los valores de intensidad, realizando comparación entre ellos con ayuda del software ImageJ. Es un programa Java de procesamiento de imágenes de dominio público inspirado por el NIH Image para Macintosh. Puede mostrar, editar, analizar, procesar, guardar e imprimir 8 bits, imágenes de 16 bits y 32 bits. Puede leer muchos formatos de imagen, incluyendo TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS y "crudo". Calcula el área y el valor de píxel estadísticas de selecciones definidas por el usuario. Puede medir distancias y ángulos. Se puede crear histogramas de densidad y perfil de línea. Es compatible con las funciones estándar de procesamiento de imágenes como la manipulación de contraste, nitidez, suavizado, detección de bordes y el filtrado de la mediana, hace transformaciones geométricas como escalado, rotación y volteretas. La imagen puede ser ampliada hasta 32:1 y hasta 1:32.

Resultados y discusión

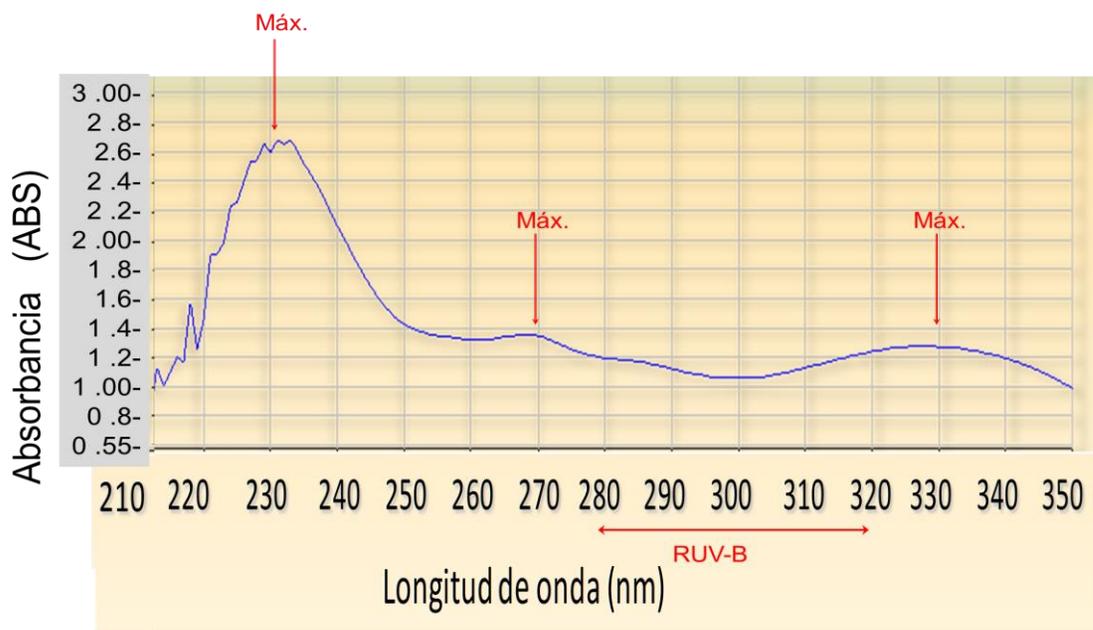
Etapa 1

8.1.1. Rendimiento del extracto.

Se recolectaron 1 Kg de flores de *J. mimosifolia*. El rendimiento del extracto fue de 10 % de sólidos, esto para un extracto metanólico es un rendimiento alto. Este resultado es similar para extractos de otras flores, que por lo general son ricos en glicósidos y antocianinas (Subramanian et al., 1972; Camacho, 2001).

8.1.2. Espectro de absorción en la región UV-B del extracto metanólico de flor de *J. mimosifolia*.

El extracto metanólico de flor de *J. mimosifolia* mostró una absorción continua desde 210 nm hasta 350 nm en el barrido realizado en el espectrómetro (gráfica 1). De acuerdo a esta medición, el extracto mostró una absorción de luz que abarca la zona de UV-A, UV-B y UV-C los máximos de absorción están localizados a los 233, 270 y 330 nm.



Gráfica 1: Espectro de absorción del extracto metanólico de flor de *J. mimosifolia*.

La lámpara que se utiliza para los experimentos de desafío irradia con una longitud de onda principal de 312 nm, ésta longitud de onda se encuentra en la región B del ultravioleta, dos de los picos máximos de absorción (270 y 330 nm) están cerca de la longitud de esta región. Debido a ello, se considera que el extracto metanólico tiene absorción en la zona de la RUV-B y puede evaluarse la actividad fotoprotectora.

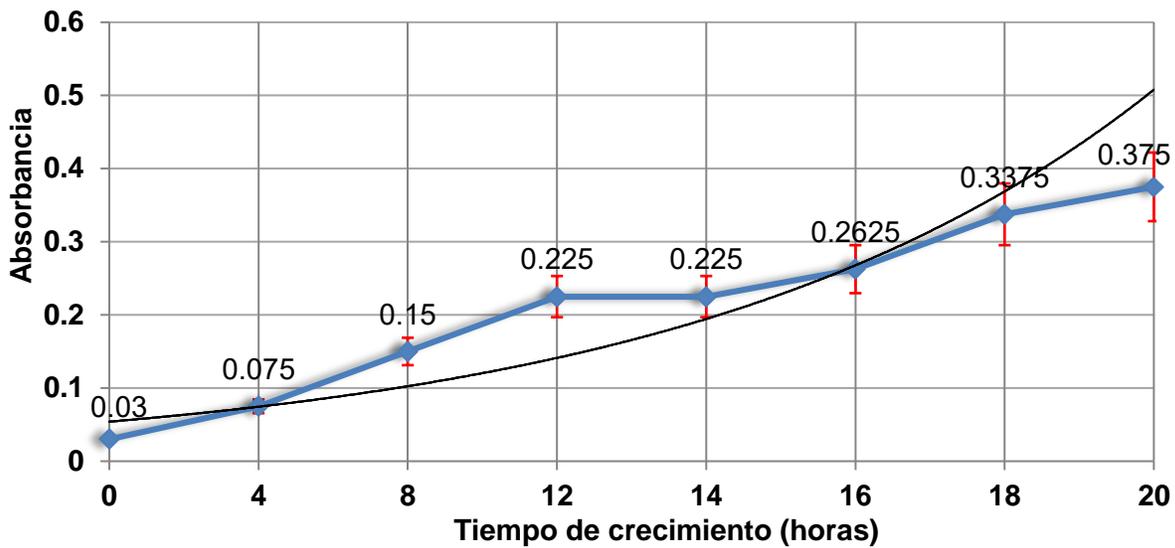
8.1.3. Cultivo axénico de *S. cerevisiae*.

La observación e identificación de un cultivo puro de *S. cerevisiae* fue realizada satisfactoriamente. Para asegurar las condiciones de pureza del cultivo de *S. cerevisiae* se hicieron varias resiembras por estría cruzada en cajas con medio PDA y en medio líquido Sabouraud. Los cultivos celulares de *S. cerevisiae* en PDA, se observaron al microscopio óptico.

8.1.4. Crecimiento de *S. cerevisiae*.

La población de levaduras a las 16 horas de haber realizado la siembra en medio líquido Sabouraud y con una incubación 30°C se encuentra en fase exponencial. Se realizó una comprobación por turbidimetría óptica, obteniendo 0.3 de absorbancia (gráfica 2). La base de estos métodos, consiste en la medición de la cantidad de luz dispersada o transmitida a través de un cultivo microbiano. Las suspensiones microbianas dispersan la luz, al igual que cualquier partícula pequeña suspendida en agua (efecto Tyndall). La dispersión de la luz es proporcional a la masa del cultivo (Davis, 1984).

Para los experimentos de fotoprotección, se requiere que la población de *S. cerevisiae* se encuentre en fase exponencial tanto para alcanzar un volumen celular adecuado como para asegurar que la levadura esta metabólicamente activa. Esto puede determinarse mejor gráficamente, obteniendo la certeza de que a través de un número de generaciones se produce una línea recta cuando el logaritmo de la masa celular se representa gráficamente en función del tiempo (Davis, 1984).



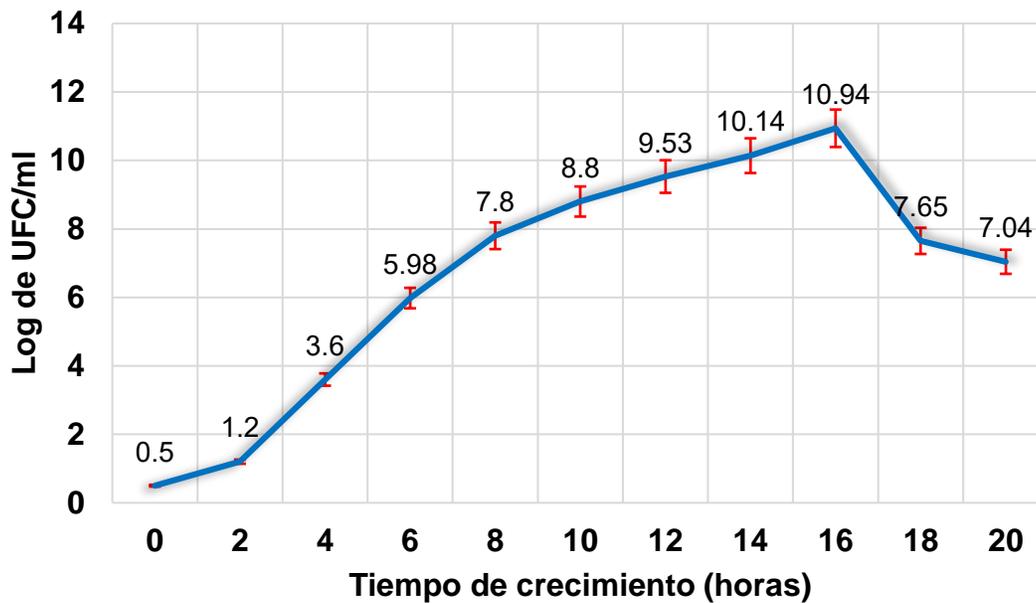
Gráfica 2: Cinética de crecimiento: muestra el crecimiento de *S. cerevisiae* de acuerdo a las mediciones hechas con un espectrofotómetro Coleman a 600 nm.

8.1.5. Conteo de placa.

A las 16 horas de crecimiento, la población de levadura se encuentra en fase exponencial (gráfica 3). El crecimiento poblacional muestra un aumento significativo de UFC, pero a las 18 horas la población de las levaduras deja de crecer.

En la cinética de crecimiento el logaritmo de las UFC decayó casi 3 órdenes de magnitud a las 18 horas de incubación, estableciendo este tiempo como en el que la levadura entra en fase estacionaria (gráfica 3). Este experimento confirmó la primera cinética, el cual fue medido a través de espectrofotometría (gráfica 2). En ambas cinéticas, la levadura se encuentra en fase exponencial a las 16 horas.

En un recipiente de cultivo cerrado una población no puede crecer indefinidamente a ritmo exponencial. La limitación de la reproducción se produce porque se agota el suministro de un nutriente esencial o porque se acumula algún producto metabólico tóxico. El periodo durante el cual cesa el crecimiento de una población se denomina fase estacionaria (Davis, 1984).



Gráfica 3: Cinética de crecimiento: número de organismos en fase exponencial de *S. cerevisiae* en conteo de UFC.

Etapa 2

8.2.1. Experimentos de desafío con y sin protección a la RUV-B.

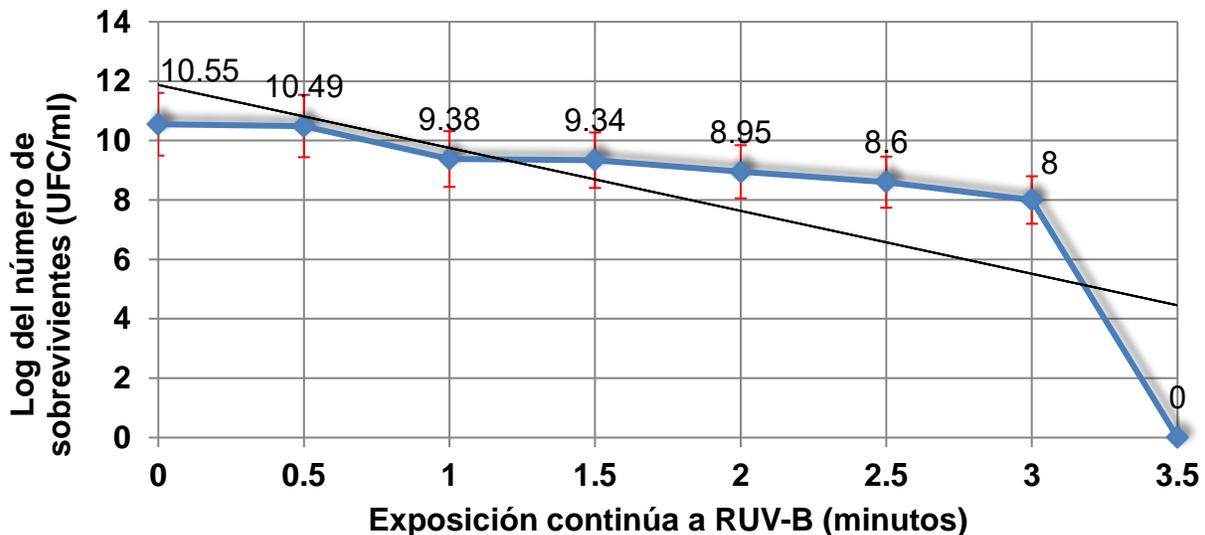
Para llevar a cabo este proyecto se planificaron y estandarizaron 4 experimentos de desafío con exposición a la RUV-B. Cada uno de ellos se realizó con repeticiones (de 3 a 5) para asegurar la reproducibilidad y la significancia, así como para reducir la variabilidad de los resultados. Además de tener el suficiente material biológico irradiado para el análisis y comparación del efecto fotoprotector a nivel molecular en las proteínas de las levaduras de cada uno de los experimentos de desafío.

8.2.2. Cinética de muerte de *S. cerevisiae* por exposición a UV-B sin protección.

Con los datos obtenidos en la etapa anterior acerca del crecimiento de la levadura, se estableció que dichos microorganismos en fase exponencial sobreviven hasta los 3 minutos de irradiación continua (gráfica 4), no observando sobrevivientes a los 3.5 minutos de irradiación. El coeficiente de mortalidad (K : 0.8471) indica que la RUV-B es letal para la levadura. En la gráfica 4 se muestra el declive de la población de levaduras al minuto de exposición a la RUV-B. Después de 3 minutos y 30 segundos, la población de levaduras no sobrevive a la irradiación UV-B según el conteo de placa.

Debido a los daños celulares causados por la RUV-B (que se conocen como impactos), las levaduras ya no pueden realizar la reparación, la población de *S. cerevisiae* muere totalmente a los 3.5 minutos de irradiación continua con UV-B. Según los resultados obtenidos en la gráfica 4, la población decae un orden de magnitud logarítmica al minuto de exposición a la RUV-B y a los 3 minutos de exposición la disminución es más significativa, disminuyendo en 2 órdenes de magnitud.

La inactivación o muerte de un microorganismo viene dada por su incapacidad para dar origen a un nuevo clon; este efecto es el resultado de una serie de reacciones químicas, consistentes, por ejemplo, en un cambio a nivel de un grupo químico o en la rotura de un enlace determinado. En una población, los individuos que han sufrido diversas acciones de ese tipo son inactivados (Davis, 1984).



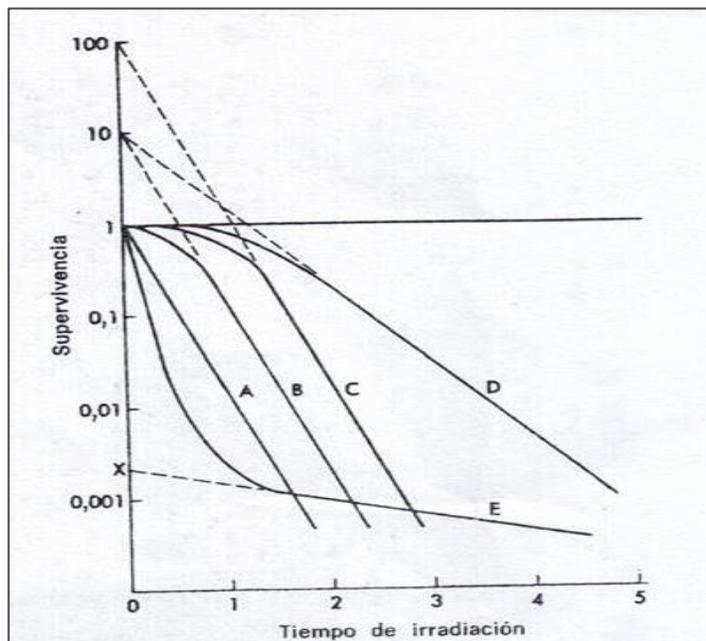
Gráfica 4: Cinética de muerte de *S. cerevisiae* por exposición a RUV-B continua sin protección. Muestra el declive significativo de UFC a 1 minuto por efecto de la irradiación continua de UV-B.

Las curvas de cinética de muerte por exposición a UV-B se denominan curvas de supervivencia. Para los experimentos realizados en este trabajo se considera que las curvas obtenidas en los cuatro experimentos de desafío se denominan curvas de impacto múltiple por que necesitan realizar impactos o daños a varios blancos metabólicos, varias veces. Se muestran según el ejemplo de la figura 12, estas curvas se inclinan cerca de su origen, antes de adoptar una dirección lineal, ya que antes de que se produzca la inactivación es necesario que se acumulen varios cambios (impactos) en una unidad determinada (Davis, 1984).

Figura 12: Curvas de supervivencia de microorganismos irradiados con luz UV-B.

- A. Curva correspondiente a un impacto único.
- B. Curva de 10 impactos.
- C. Curva de 100 impactos.
- D. Curva de 10 impactos en microorganismos con un blanco de tamaño menos que el que se representa en B.

Fuente: Tratado de microbiología. Davis D., Dulbecco R., Eisen H. N. y Gisenberg H. S. 1984.

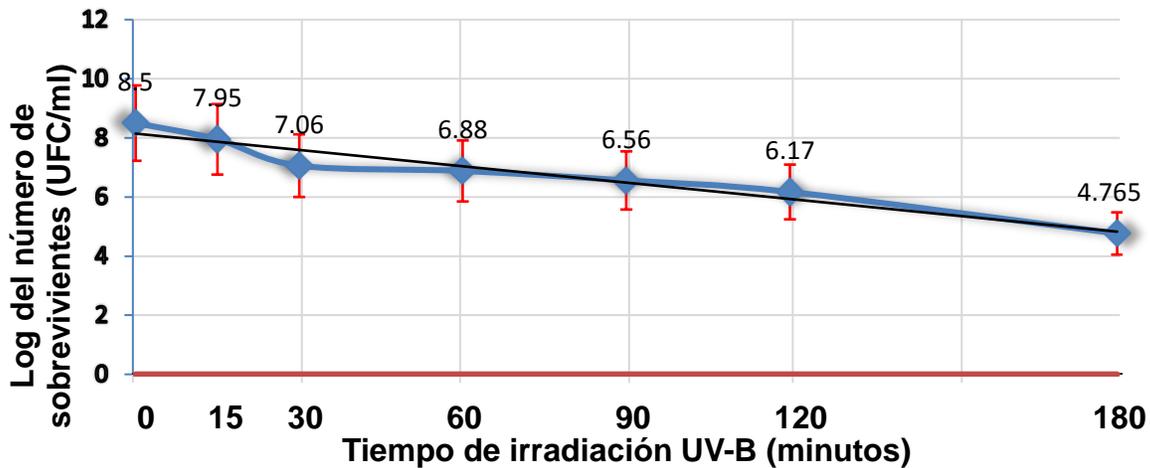


El mecanismo que da lugar a la producción de curvas de impacto múltiple es la disminución de la capacidad de reparación que se produce a elevadas dosis de radiación. De este modo, la reparación posterior a la replicación es nula y la recombinación se produce con escasa frecuencia (Davis, 1984). Por lo cual la RUV-B es letal para *S. cerevisiae* con el efecto multimpacto.

La exposición de una población de levaduras a la RUV produce especies reactivas de oxígeno las cuales reaccionan con otros componentes celulares (proteínas, lípidos, etc.) alterando su función y pueden contribuir de forma secundaria al daño celular causado por la RUV (Birrell et al., 1998). Lo anterior explicaría el efecto letal de la RUV-B en la levadura *S. cerevisiae*.

8.2.3 Experimento con protección física.

El extracto metanólico de *J. mimosifolia* protege de la muerte celular inducida por luz UV-B a la población de levaduras, porque todavía hay sobrevivientes a las 3 horas de exposición a la radiación (gráfica 6).



Gráfica 5: Experimento de desafío con protección física. *S. cerevisiae* expuesta a RUV-B continua y protegida con extracto de *J. mimosifolia* como barrera física.

Aunque no se sabe el tiempo exacto en el que la totalidad de la población muere por la exposición a RUV-B, se observa claramente aumento del tiempo de mortalidad celular debido a la protección del extracto metanólico de flor de *J. mimosifolia*. El experimento comenzó con una población de levaduras correspondiente a un log 8.5 de UFC, en dos horas de exposición a la RUV-B la población decreció el 2 ordenes de magnitud logarítmica y a las tres horas disminuyó 4 ordenes con respecto al inicio del experimento, de acuerdo a esto el extracto protegió de la muerte celular a las levaduras expuestas a la RUV-B.

El extracto metanólico provee a la levadura de una defensa física en contra de la RUV-B, al aumentar la tolerancia a dicha radiación. Esto se puede deber a la presencia de los compuestos químicos presentes en *J. mimosifolia* (fenoles y flavonoides) (Subramanian et al., 1972; Scogin, 1980; Mahran et al., 1991) en el extracto que se pueden considerar fotoprotectores porque contienen moléculas cromóforas que pueden absorber, reflejar o dispersar fotones de RUV.

La RUV tiene la energía suficiente para causar cambios químicos en las moléculas sobre las que incide, sin embargo para que estos puedan ocurrir se deben cumplir dos condiciones: a) El fotón debe tener la energía suficiente para llevar a cabo el proceso y b) las moléculas irradiadas deben de absorber el fotón; sólo cuando se cumplen ambas, a las sustancias se les denomina cromóforas. (Vollhardt y Schore, 2002).

Algunas moléculas cromóforas absorben energía en región ultravioleta, lo anterior depende de su estructura molecular (Vollhardt y Schore, 2002). Los compuestos capaces de absorber la RUV son básicamente aquellos que en su estructura cuenten con sistemas π , en forma de dos enlaces conjugados que puedan presentar traslapamiento de los orbitales o la deslocalización electrónica (Vollhardt y Schore, 2002). En una molécula orgánica los electrones ocupan orbitales moleculares enlazantes en el estado basal. La RUV tiene la cantidad de energía necesaria para transferir los electrones de valencia a los orbitales de mayor energía denominadas como antienlazantes, por lo tanto la molécula se encuentra en un estado electrónico excitado, lo anterior se refiere como la transición de un electrón de un enlace π a un orbital antienlazante π^* (March, 1992; Vollhardt y Schore, 2002). De esta manera, la energía del fotón es convertida a otra forma de energía en el interior del cromóforo (Brown et al., 2003). Lo anterior se rige por las leyes de la mecánica cuántica, cada molécula sólo puede absorber fotones de cierta energía y como la energía de un fotón es inversamente proporcional a la longitud de onda, cada sustancia cromófora tiene un espectro particular de absorción a la luz (Diffey y Kochevar, 2007).

Cuando un cromóforo absorbe la luz, sus electrones adquieren mayor energía y se dice que están en un primer estado excitado llamado singulete. Éste existe sólo por unos pocos nanosegundos (10^{-9} segundos), posteriormente los electrones regresan a su estado basal emitiendo el exceso de energía como: a) fluorescencia, b) en forma de calor, c) convirtiéndose en un segundo estado excitado llamado triplete ó d) induciendo reacciones fotoquímicas. El estado de triplete es más estable que el singulete y existe por un periodo de tiempo más prolongado, alrededor de varios microsegundos (10^{-6} segundos). El estado de triplete regresa al estado basal de manera similar al singulete emitiendo en este caso fosforescencia (March, 1992; Diffey y Kochevar, 2007).

Debido a la absorción de luz UV, los cromóforos presentes en el extracto metanólico de *J. mimosifolia* protegen a la levadura de la RUV-B, al reducir la incidencia de los fotones en las células de *S. cerevisiae*, reduciendo los daños celulares y la mortalidad celular.

Las reacciones fotoquímicas que se pueden inducir por la RUV incluyen la ruptura homolítica de los enlaces que genera radicales libres, el rearrreglo intermolecular, la fotoisomerización, la abstracción de un átomo de hidrógeno y la fotosensibilización. Durante la fotosensibilización, una molécula en estado excitado (en singulete o triplete) transfiere su exceso de energía a otra molécula (March, 1992). La RUV puede convertir a la sustancia cromófora en una o varias moléculas diferentes denominadas fotoproductos que pueden tener efectos importantes en los sistemas biológicos como daño a ácidos nucleicos, proteínas, lípidos etc. (Diffey y Kochevar, 2007) y estos al acumularse pueden causar la muerte de la levadura.

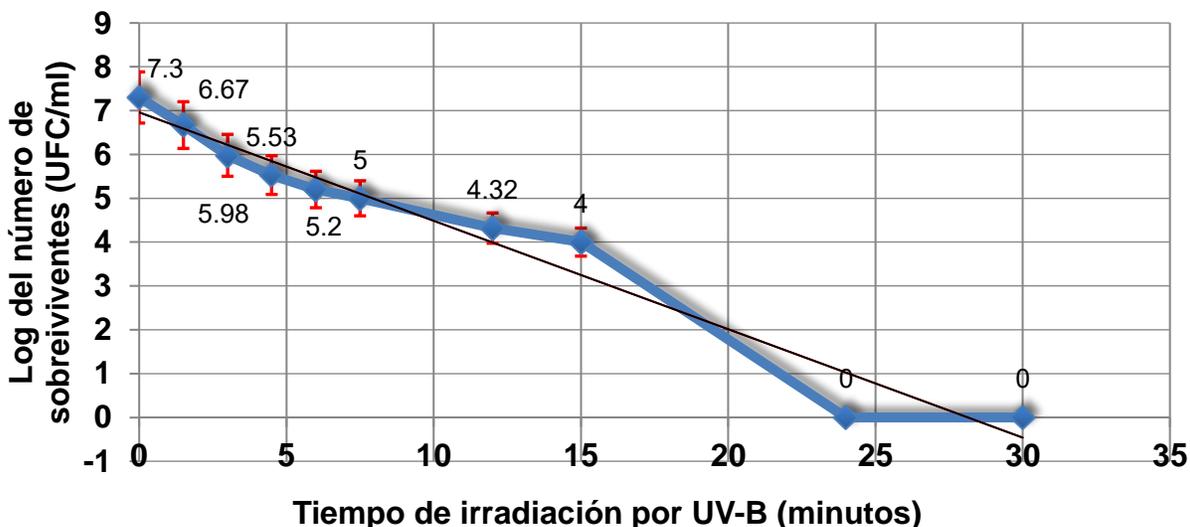
8.2.4. Experimento con protección a nivel metabólico.

Con el fin de activar metabólicamente a la levadura y así asegurar su crecimiento en el extracto metanólico de flor de *J. mimosifolia* se realizaron varias resiembras de *S. cerevisiae*. Para comprobar el crecimiento de la levadura se obtuvo la absorbancia en pruebas de turbidimetría, que fue de 0.24 ABS a las 32 horas de haber realizado la resiembra. Además, para alcanzar un crecimiento exponencial es necesaria la incubación por 32 horas. Este retardo en el ritmo de crecimiento de la levadura se puede explicar por la composición química del extracto. En el medio con extracto metanólico de flor de *J. mimosifolia* los nutrientes necesarios para la célula no están ni en cantidades ni en una forma química que sea fácilmente metabolizada por la levadura como en un medio rico o específico como el medio líquido Sabouraud o el medio sólido de PDA. Por lo que se dice que la levadura debe adaptarse al extracto y alimentarse del mismo.

En el medio con extracto, los azúcares en forma de glicósidos que están presentes, probablemente pueden ser utilizados por las células de levadura para obtener la energía que necesita la célula. A la población de levaduras le es más difícil metabolizar los compuestos del extracto de flor que los compuestos presentes en el medio sólido de PDA o en el medio líquido Sabouraud, por lo que crecen a un ritmo más lento.

La población de *S. cerevisiae* expuesta a la RUV-B logra sobrevivir más de 15 minutos a la exposición a la RUV-B (gráfica 7) y a partir de los 24 minutos ya no hay sobrevivientes.

Existe diferencia de mortalidad con respecto al control sin protección, ya que en este grupo experimental la población muere a los 3 minutos de exposición a la RUV-B.



Grafica 6: Experimento de desafío metabólico. *S. cerevisiae* expuesta a RUV-B y protegida con extracto de *J. mimosifolia* a nivel metabólico.

De alguna manera *S. cerevisiae* es capaz de metabolizar los compuestos químicos que contiene el extracto metanólico de flor de *J. mimosifolia* y algunos de ellos pudieron disminuir el daño celular causado por la RUV-B. De acuerdo al probable perfil fitoquímico del extracto metanólico, los principales compuestos presentes en dicho extracto pueden ser flavonoides, que tienen una estructura química muy definida. De manera general, son moléculas que tienen 2 anillos bencénicos unidos a través de una cadena de 3 átomos de carbono, los autores los denominan simplemente como compuestos C₆C₃C₆ (Bahor y Siddeaqi, 1999).

Los flavonoides se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central C₃: chalconas, flavanonas, flavanonoles, antocinidinas, catequinas, epicatequinas, aurona, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, etc.

Dentro de las plantas se ha demostrado que estas sustancias se encuentran la mayoría de veces, ligados a moléculas de carbohidratos. A este tipo de combinación núcleo flavonoide básico + una o varias unidades de carbohidratos, se les denomina glucósidos y cuando no tienen ligadas moléculas de carbohidratos se les denomina agliconas de flavonoides (Baker et al., 1995).

Un glucósido es cualquier molécula en la cual un azúcar se enlaza a través de su carbono aromático a otro compuesto de diferente naturaleza química, mediante un enlace O-glucosídico o un enlace S-glucosídico; a estos últimos se los conoce como tioglucósidos. Muchos autores consideran además que el glúcido este enlazado a una molécula que no sea azúcar, para que la molécula califique como glicósido.

El componente no carbohidrato del glucósido se conoce como aglicona y el azúcar es la glicona. La glicona puede consistir en un solo monosacárido o varios unidos entre sí, conocidos como oligosacáridos (Sarry y Gunata, 2004).

La glicona y porciones de aglicona se pueden separar químicamente por hidrólisis ácida, numerosas enzimas pueden formar y romper enlaces glucosídicos. Las enzimas más importantes de este tipo son las glucósido hidrolasas. Cuando la glicona es separada de la aglicona, está puede ser almacenada en vacuolas celulares, de acuerdo a los requerimientos celulares pueden existir dos procesamientos celulares de las agliconas: a) Polimerización: los compuestos aromáticos y heterocíclicos tienden a ser convertidos en estructuras insolubles de alto peso molecular que se incorporan a las paredes celulares, ya que estas ofrecen una matriz de polisacáridos y proteínas donde pueden formarse polímeros; b) Degradativas: donde los productos son convertidos a estructuras del metabolismo primario (Sarry y Gunata, 2004).

La pared celular de la levadura es capaz de absorber antocianinas y otros componentes del color (Feuillat, 2006). *S. cerevisiae* posee pectinasas (poligalacturonidasas) que pueden catalizar la hidrólisis de las pectinas lo cual favorece la extracción de los antocianos. Estas enzimas se activan durante la primera fase de la fermentación alcohólica. Por otra parte, también existen las actividades enzimáticas del tipo glicosidasa de las levaduras que conducen a una disminución de la forma glicosilada de los antocianos, ya que la forma aglicona es más inestable (Feuillat, 2006). Se ha reportado que la actividad β -glucosidasa de ciertas cepas de *S. cerevisiae*, tiene un efecto positivo liberando la aglicona volátil de los glicósidos terpénicos (Zumárraga y Barbero).

Además varios metabolitos secundarios producidos durante la fermentación alcohólica, como el ácido pirúvico y el acetaldehído pueden reaccionar con compuestos fenólicos favoreciendo la estabilización de los pigmentos en la levadura (Feuillat, 2006). Esto puede indicar que la levadura incorpora los compuestos aromáticos presentes en el extracto de *J. mimosifolia*, aprovechándolos como defensa en contra de la RUV-B.

Las levaduras son organismos con una muy buena adaptabilidad a las diferentes condiciones del medio, son capaces de aprovechar los nutrientes al máximo y ajustar su metabolismo y su reproducción. Los tratamientos biológicos, tanto aeróbico, como anaeróbico o mixto, son considerados como efectivos para la remoción de sustancias tóxicas y del exceso de materia orgánica presente en el medio (Garzón, 2009).

La capacidad que poseen los hongos para degradar compuestos aromáticos complejos como parte de su metabolismo natural, ha permitido que sean usados en la degradación de diversos compuestos xenobióticos. Esto puede deberse a que las células fúngicas, son menos sensibles a variaciones en temperatura, pH, nutrientes y aireación. Adicionalmente gracias a su alta tasa metabólica y a su rápida colonización de superficies que permite un crecimiento y una adaptación rápida (Cabral, 2005).

Las fuentes de carbono utilizadas por las levaduras varían desde los carbohidratos hasta los aminoácidos. Entre los azúcares que *S. cerevisiae* puede utilizar están monosacáridos como la glucosa, fructosa, manosa y galactosa, entre otros. También son capaces de utilizar disacáridos como la maltosa y la sacarosa y trisacáridos como la rafinosa (Spohner et al., 2016).

También es capaz de utilizar otras fuentes de carbono distintas a carbohidratos y aminoácidos. Entre las más destacadas se encuentra la capacidad de utilizar tanto etanol como glicerol. Por norma general las levaduras mantienen dos tipos de metabolismo muy bien diferenciados. Por una parte, en condiciones en las que existen altas concentraciones de glucosa, fructosa o maltosa, la tendencia es a realizar una fermentación alcohólica de estos, es decir, se realiza la glucólisis y posteriormente se forma etanol. Una vez que estos azúcares escasean, se produce la respiración del etanol, vía ciclo de Krebs. Evolutivamente esto es un proceso que, *a priori*, no es ventajoso por ser energéticamente desfavorable para la reproducción del organismo, dado que se obtiene mucha menos energía en el primer proceso que en el segundo (Cordell, et al., 2013).

Las levaduras, además de necesitar una fuente de carbono, necesitan tanto fuentes de nitrógeno: como el amonio, la urea o distintos tipos de aminoácidos, y fuentes de fósforo. Además, son necesarias vitaminas como la Biotina, también llamada Vitamina H, y distintos elementos traza. La capacidad para utilizar diferentes compuestos nitrogenados es una de las características que se usa para distinguir entre las diferentes especies de *Saccharomyces* (Brock, 1978).

S. cerevisiae produce preferentemente alcohol por medio de la degradación de azúcares por medio de la fermentación anaeróbica, incluso cuando el oxígeno está disponible para la respiración aeróbica. Este rasgo clave, conocido como el efecto Crabtree (Pronk et al., 1996), se piensa que es una adaptación a ambientes altos de azúcar. Aunque la fermentación del azúcar por *S. cerevisiae* es de aproximadamente diez veces menos metabólicamente eficiente que la respiración aeróbica en términos de la producción de ATP (Pfeiffer et al., 2001; MacLean et al. 2006).

El mecanismo enzimático de absorción se da por la acción de oxidasas y peroxidasas, estas enzimas no presentan una especificidad alta, por lo tanto, pueden tener actividad sobre la estructura de diferentes sustratos fenólicos (Cabral, 2005).

El extracto metanólico de flor, probablemente está constituido por fenoles: flavonoides, taninos y glicósidos: antocianinas, son familias de compuestos que están constituidos por anillos aromáticos y largas cadenas de carbono.

S. cerevisiae puede tolerar condiciones alcalinas, anóxicas y de baja biodisponibilidad de compuestos capaces de ser metabolizados, entonces las levaduras disfrutarán de una ventaja selectiva debido a los efectos de interferencia de su propia fermentación (Goddard, 2008).

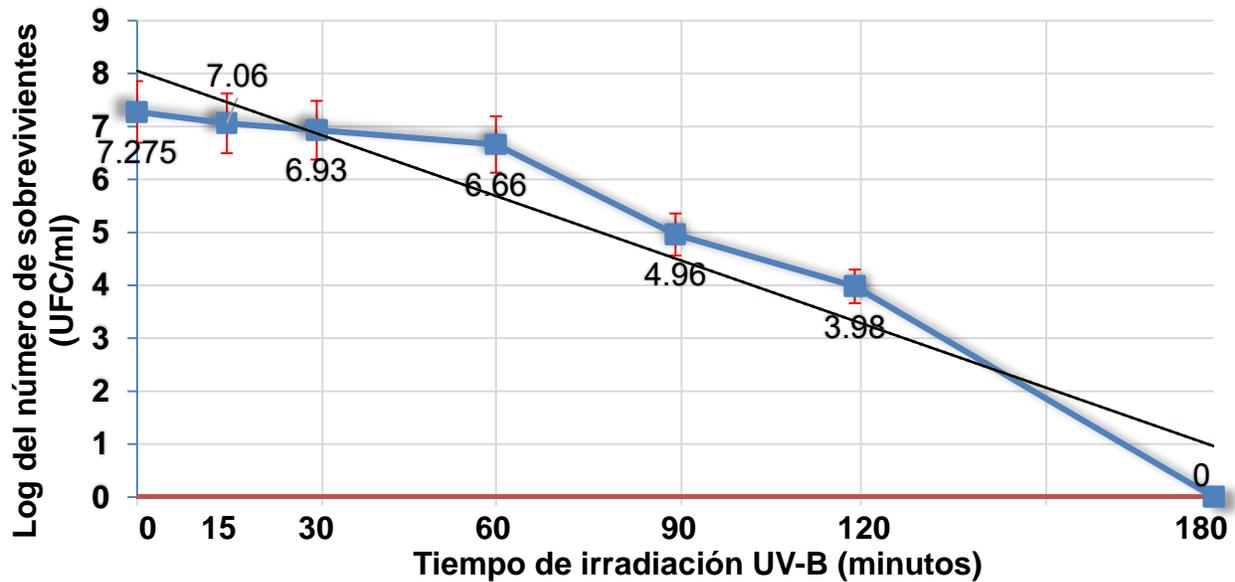
Además, después de haber superado o interferido con sus competidores, *S. cerevisiae* puede entrar en un “cambio diaúxico” y cambiar de marcha metabólica para utilizar el etanol acumulada como un sustrato para respiración aeróbica, recuperando algunos (pero no todos) de la energía desperdiciada por fermentación (Thomson et al., 2005). Esta reducción del coste metabólico de la fermentación inicial está disponible como consecuencia de uno o ambos de los dos beneficios anteriores, pero se asocian generalmente con la segunda, en la llamada estrategia “maquillaje-acumular-consumir” (Piskur et al., 2006).

El efecto Crabtree se cree que se originó en la época en que el ancestro del clado *Saccharomyces* sometió a toda una duplicación del genoma (Piskur et al., 2006). Mientras que la mayoría de la duplicación de copias de genes se perdieron posteriormente, muchos de los genes que sobreviven juegan un papel en el metabolismo del azúcar y se mantienen porque dos copias permiten una mayor expresión génica relativa. Además, la presencia de dos copias de un gen permite mantener la función ancestral, mientras que el otro está libre a divergir y adquirir nuevas funciones, por ejemplo: ADH1 y ADH2 (Kellis et al., 2004). Esto explicaría la versatilidad metabólica de *S.cerevisiae*.

La mayor parte de las levaduras crece mejor en medios en los que está disponible una buena cantidad de agua. Sin embargo, muchas de ellas pueden crecer en medios con relativamente poca cantidad de agua como en soluciones con una concentración elevada de solutos (sal o azúcar), condiciones similares a las que existen en el medio de cultivo con extracto de *J. mimosifolia*.

8.2.5. Experimento con protección a nivel físico-metabólico.

En este experimento el extracto fue empleado de manera exógena para la protección con barrera física y como medio de cultivo para *S. cerevisiae* (gráfica 8).



Gráfica 7: Experimento con protección físico-metabólica.

La población de levaduras perece a las 3 horas de exposición. Estas levaduras crecieron en contacto con el extracto metanólico y que además son protegidas de la RUV-B utilizando el extracto como barrera física, se dice que tienen doble protección contra la RUV-B. Mientras que la población de levaduras que solo es protegida con barrera física a las 3 horas de irradiación presenta sobrevivientes.

Debido al retardo en el ritmo de crecimiento de *S. cerevisiae* en el medio con extracto, la población inicial en el experimento con doble protección es inferior comparada con la población en el experimento con protección física. El log de UFC al principio de cada experimento era: 7.2 y 8 respectivamente.

Aunque la población con doble protección pereció a las 3 horas de exposición a la RUV-B, la disminución en el número de levaduras es evidente a partir de los 90 minutos.

Este experimento comprobó el efecto fotoprotector del extracto al reducir la mortalidad celular causada por la RUV-B. Además sirvió para determinar que el efecto fotoprotector del extracto metanólico funciona mejor de manera física (o de filtro).

8.2.6. Comparación de los datos de sobrevivencia de los desafíos de irradiación.

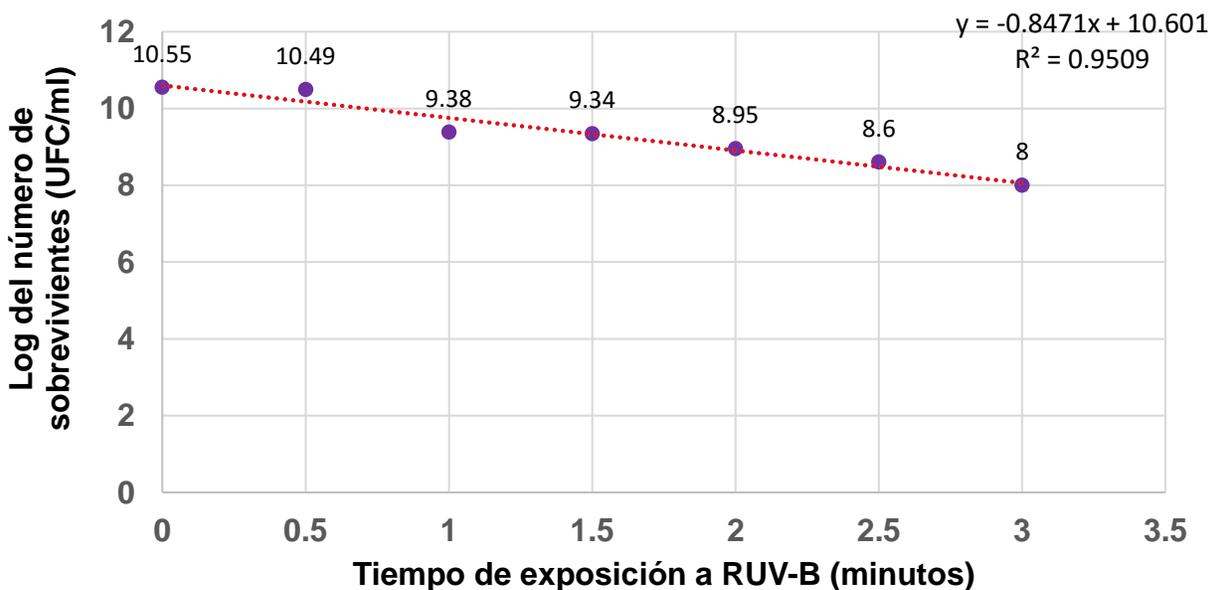
8.2.6.1. Tasas de mortalidad.

Para comparar el efecto fotoprotector del extracto metanólico, se realizaron gráficas de dispersión de cada uno de los experimentos de desafío (gráfica 9) omitiendo aquellos tiempos en los que la levadura no sobrevive a la exposición de RUV-B.

Los diagramas de dispersión son una herramienta de análisis que representa en forma gráfica la relación existente entre dos variables pudiendo observar la dependencia o influencia que tiene una variable sobre la otra, permitiendo visualizar de forma gráfica su posible correlación (Durán et al., 2009).

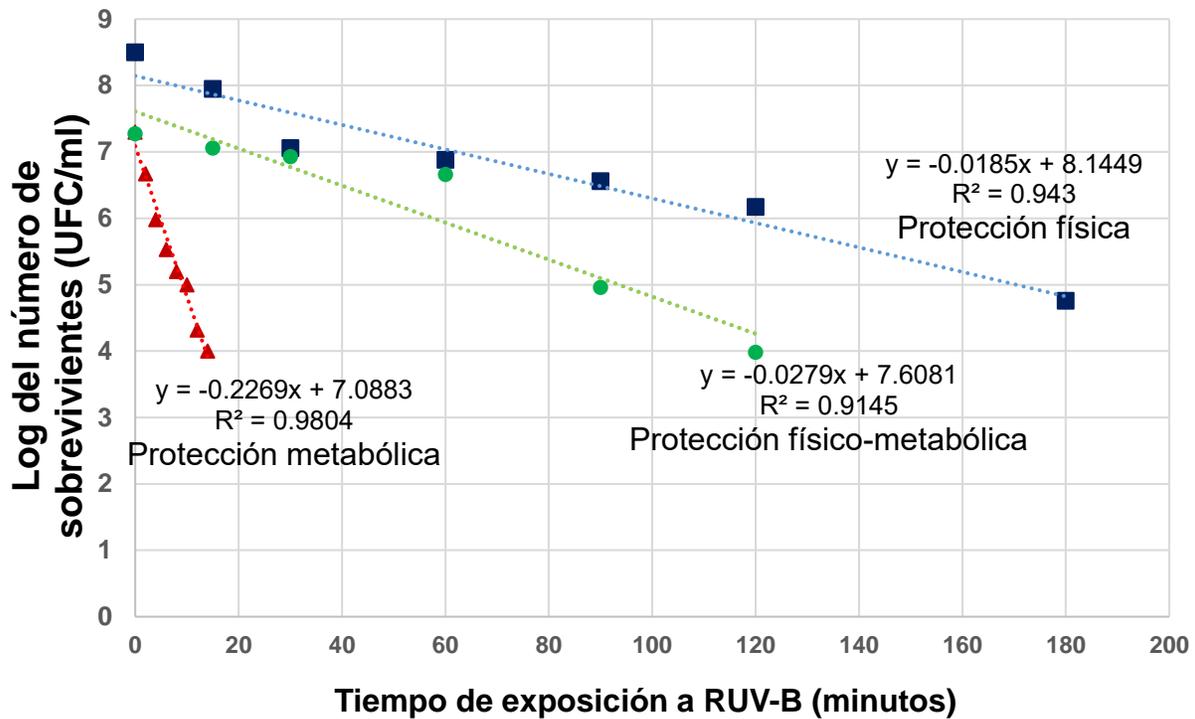
De acuerdo a las rectas obtenidas en las gráficas de dispersión la correlación es negativa, y se observa como la nube de puntos obtenida adquiere una forma de recta decreciente, cuando los puntos de la nube se encuentran próximos a la recta se le conoce como fuerte, en el caso que se encuentren distantes a la recta es conocida como débil.

Al observar las gráficas (9 y 10) de cada uno de los experimentos, se pudo constatar que el extracto metanólico de flor de *J. mimosifolia* ejerce protección de la RUV-B al reducir la tasa de mortalidad de la levadura expuesta a la RUV-B (tabla 4). Sin protección: $K=0.8471$ y con protección física $K=0.0184$.



Gráfica 8: Cinética de muerte de *S. cerevisiae* por exposición a la RUV-B sin protección.

“Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia*, usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” M.A.R.E.



Gráfica 9: Comparativo del tiempo de sobrevivencia a la RUV-B.

De acuerdo a las K se puede saber de manera cuantitativa el número de veces que el extracto de *J. mimosifolia* protege a *S. cerevisiae* de la RUV-B (tabla 3). Este dato se obtiene dividiendo la constante de mortalidad del experimento sin protección a la RUV-B sobre la constante de mortalidad que se obtuvo en cada uno de los tres experimentos con protección (Durán et al., 2009).

Exposición a RUV-B	K	Veces que protege
Sin protección	0.8471	-----
Protección metabólica	0.2269	4.06
Protección físico-metabólica	0.0279	30.36
Protección física	0.0184	46

Tabla 3: Tasas de mortalidad y un comparativo donde de manera cuantitativa se expresa el número de veces que el extracto protege a la levadura de la RUV-B.

El extracto utilizado como barrera física protege a la levadura de la RUV-B 46 veces comparado con la levadura que fue expuesta a la RUV-B y sin ninguna protección. En cambio, la levadura que creció en el medio de cultivo con extracto la protección fue de 4.06, y la levadura que tiene protección física y que creció en el medio de cultivo con extracto tiene 30.36 veces de protección.

La levadura adaptada al extracto de *J. mimosifolia* sobrevive 15 minutos de exposición a la RUV-B (gráfica 8), se observó una sobrevivencia 5 veces mayor comparada con la levadura sin protección a la exposición por UV-B.

8.2.6.2. Población de levaduras al inicio de cada experimento.

Otro punto de comparación con diferencias significativas y que complementa la evidencia de la fotoprotección del extracto metanólico de flor de *J. mimosifolia* en las levaduras expuestas a la RUV-B, está en las diferencias en los órdenes logarítmicos de las UFC al inicio de cada experimento.

En las levaduras del experimento sin protección a la RUV-B, el logaritmo de la UFC al inicio del experimento fue de 10.55, mientras que en el resto de experimentos los órdenes logarítmicos de las UFC fueron al menos 2 ordenes más bajos, en el experimento con protección físico-metabólica se obtuvo el logaritmo de las UFC más bajo con 7.2 (tabla 4). Aunque la población de levaduras es menor de acuerdo a las diferencias en los órdenes logarítmicos de las UFC entre los experimentos de desafío con y sin protección a la RUV-B, las levaduras sobreviven más tiempo a la exposición continua de RUV-B a pesar de que su población es tres órdenes menores logarítmicamente.

De manera más simple, hay más levaduras sobrevivientes donde hay menos levaduras que fueron expuestas a las más altas dosis de RUV-B continuamente.

Experimento de desafío a la RUV-B	Población: Logaritmo de las UFC al inicio del experimento	Sobrevivencia a la RUV-B (min)	Mortalidad a la RUV-B (min)
Sin protección física	10.5	3	3.5
Con protección física	8.5	+180	-----
Con protección físico-metabólica	7.2	120	180
Con metabólica	7.3	+15	24

Tabla 4. Muestra los distintos experimentos de desafío. El orden logarítmico con que inicia cada experimento de desafío, también el tiempo en que la levadura no sobrevive a la RUV-B continua y por ultimo muestra el tiempo en que la levadura sobrevive a la UV-B continua en cada uno de los experimentos de desafío a la RUV-B.

Otra observación significativa fue el retraso en que la levadura entra en fase exponencial en los experimentos en que la levadura creció en el extracto como fuente de nutrientes. La levadura tardó aproximadamente el doble de tiempo en entrar en fase exponencial en los experimentos que involucran al extracto como protector metabólico. El tiempo en el que la levadura alcanza la fase exponencial se prolongó de 16 a 32 horas para los experimentos de protección metabólica y protección físico-metabólica, así mismo la población inicial (logaritmo de las UFC) al inicio de estos experimentos de protección también fueron los órdenes logarítmicos más bajos obtenidos durante el conteo de placa de cada experimento.

8.2.6.3. Tiempo de mortalidad de la población expuesta a RUV-B.

La levadura sin protección sobrevive 3 minutos de exposición a RUV-B, mientras que la levadura con protección física sobrevive 180 minutos, observando una resistencia 60 veces mayor a la RUV-B, de acuerdo al tiempo en el que es posible encontrar sobrevivientes a la RUV-B.

En el experimento donde el extracto fue utilizado como barrera física a la RUV-B, las levaduras sobreviven más de 3 horas de exposición. Sin embargo, cuando la levadura es protegida y cultivada en el extracto metanólico, la población no sobrevive 3 horas de irradiación, las curvas obtenidas indican que a las dos horas de exposición a RUV-B decrece 2 órdenes y 3 órdenes de magnitud logarítmica respectivamente, ambas curvas muestran un comportamiento de impacto múltiple.

En el experimento con protección metabólica, la levadura sobrevive 15 minutos de exposición a la RUV-B, se observa el efecto fotoprotector del extracto cuando *S. cerevisiae* crece en un medio cuya única fuente de carbono es el extracto metanólico de flor de *J. mimosifolia*. La población de levaduras es más pequeña al inicio de los experimentos con protección metabólica, aun así, sobreviven 15 minutos (protección metabólica) y dos horas de exposición a la RUV-B (protección físico-metabólica).

La población de levaduras de ambos experimentos decrece significativamente a las 3 horas de exposición a RUV-B. La población de *S. cerevisiae* que no fue inoculada el extracto encontramos supervivientes a las tres horas de exposición, pero la población decrece 4 órdenes de magnitud, mientras que *S. cerevisiae* que creció en contacto con el extracto la población decrece totalmente y no sobrevive a las 3 horas de exposición a RUV-B (gráfica 9).

Los logaritmos de las UFC de los diferentes experimentos muestran claramente la diferencia del orden logarítmico de las UFC en cada uno de los experimentos de desafío con y sin protección a la RUV-B (tabla 4).

De acuerdo a los experimentos de desafío y las gráficas correspondientes de supervivencia a la exposición de RUV-B, podemos observar que el extracto tiene actividad fotoprotectora en las células de *S. cerevisiae*, al reducir la tasa de mortalidad celular y prolongar el tiempo de supervivencia a la exposición continua de RUV-B (gráfica 10).

En *S. cerevisiae*, las respuestas ante el estrés producido por diferentes agentes (temperatura, falta de nutrientes, etanol, oxidantes, metales pesados, pH, RUV-B, etc.) comparten mecanismos comunes, aunque existen cambios genéticos y bioquímicos específicos dependiendo del agente causante del estrés. *S. cerevisiae* “detecta” el estrés oxidativo y genera una respuesta a nivel molecular induciendo los sistemas de defensa antioxidantes primarios y secundarios. En respuesta a este estrés oxidativo, se activan en la célula rutas de transmisión de señal y factores de transcripción específicos, que aumentan la expresión de genes que codifican para las proteínas antioxidantes. Esta respuesta específica al estrés oxidativo tiene como función disminuir los niveles de especies reactivas de oxígeno, así como de reparar los daños producidos por oxidantes (Costa y Moradas-Ferreira, 2001).

Sin embargo, sus mecanismos de defensa antioxidantes, no pueden atenuar el daño causado por las altas dosis de RUV-B a las que dichas levaduras son sometidas en este trabajo. En los experimentos de desafío se observó que la reducción de la mortalidad y la supervivencia de las levaduras a la irradiación, se debió probablemente a la presencia de un fotoprotector, en este caso el extracto metanólico de flor de *J. mimosifolia*. El extracto de *J. mimosifolia* demostró tener una actividad fotoprotectora y puede ser evaluado con el conteo de las UFC de los microorganismos irradiados.

El extracto puede ser utilizado como barrera física o barrera metabólica o actuar de manera simultánea. Existen reportes de que en el extracto puede estar relacionado con la presencia de ácidos ursólico y oleanólico. Recientemente se demostró que estos triterpenos con actividad antioxidante no enzimática actúan como un inhibidor de la apoptosis causada por la hiperglucemia. (Aggarwal y Shishodia, 2006; Yin y Chan, 2007; Bai et al., 2007; Yang et al., 2007; Oh et al., 2007).

El perfil fitoquímico del extracto es rico en glicósidos flavonoides, los grupos hidroxilo fenólicos que confieren a estos flavonoides gran potencial terapéutico mediante la inhibición de la peroxidación lipídica (Rios et al., 1992).

Los flavonoides han despertado gran interés debido a su potencial antioxidante e inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y reducen significativamente la tendencia a enfermedades trombóticas (Pratt y Birac, 1979; Conforti et al., 2004; Sánchez Perez et al., 2005).

También actúan como purificadores de especies reactivas de oxígeno y quelantes de metales, contribuyen a la reducción del daño oxidativo (Peres et al., 2000). Los estudios *in vitro* han demostrado que los flavonoides también inhiben la producción de óxido nítrico que es factor de necrosis tumoral por las células de Kupffer (macrófagos localizados en el hígado) cuando son estimuladas por una lesión (Kawada et al., 1998).

Las levaduras tienen una gran similitud con las células animales y con las vegetales tanto a nivel macromolecular como de organelos, y se ha demostrado que cierto número de proteínas de las levaduras tienen funciones intercambiables con sus homólogas humanas. Más del 25% de las proteínas implicadas como responsables de enfermedades humanas hereditarias, han revelado una similitud aminoacídica con las proteínas de levaduras. Dado que el genoma humano codifica para un número elevado de proteínas, muchas de ellas desconocidas hasta el momento, se ha sugerido la posibilidad de que la mayoría de las proteínas de levaduras posean homólogos en humanos (Oliver, 1997). Por tanto, *S. cerevisiae* es un modelo muy conveniente para análisis de los mecanismos involucrados en la respuesta al estrés causados por la RUV-B. La manipulación genética y fisiológica, a través de la manipulación de las condiciones ambientales y de crecimiento (Moradas-Ferreira y Costa, 2000), la secuenciación del genoma de *S. cerevisiae*, han permitido realizar diversos análisis sobre cambios que se producen en el transcriptoma (es el conjunto de genes que se están expresando en un momento dado en una célula) durante el proceso de adaptación celular a condiciones de estrés (Ter Linde et al., 1999; Kuhn et al., 2001; Momose e Iwahashi, 2001; Boer et al., 2003).

Etapa 3

8.3.1. Extracción de proteínas de células de *S. cerevisiae*.

En cada experimento se recuperaron levaduras irradiadas para la extracción de material celular y así comparar el daño causado por exposición a RUV-B, los tiempos en los que se recuperaron las células variaron de acuerdo a la sobrevivencia de las levaduras y el declive poblacional causado por la irradiación, además se cuidó de que los tiempos en los que se recuperó material biológico fueran similares a fin de realizar una buena comparación de daño a nivel molecular, para tratar de identificar posible expresión diferencial proteica a causa de la exposición a la RUV-B.

Se analizaron los experimentos de desafío de exposición a la RUV-B con protección física y sin ninguna protección. Los experimentos metabólico y físico-metabólico no se procesaron debido a que las pastillas obtenidas tenían una consistencia viscosa por la presencia de compuestos fenólicos en los medios de cultivo, lo que dificultó su manejo para la obtención de proteínas.

En esta etapa se utilizaron varias técnicas (Anexo 1), algunas ya conocidas y otra se estandarizaron para este trabajo, sin embargo, sólo una se reporta y es tratada con amplitud.

Se decidió realizar la extracción con buffer RIPA, una vez extraídas las proteínas, se procedió con la cuantificación utilizando el reactivo de Bradford (tabla 5). Posteriormente se hizo electroforesis (figura 16 y 17), los bandeos de la electroforesis, se procesaron con ImageJ (gráficas 14 y 15), software que mide intensidad de colorimetría de las bandas, se obtuvieron los pesos moleculares en kiloDaltones (kDa) de todas las bandas presentes en los geles (tabla 6).

Muestra		Concentración de proteínas (µg/ml)
<i>S. cerevisiae</i> sin exposición a RUV-B		7.875
Barrera Protección Física	90 seg RUV-B	9.894
	210 seg RUV-B	10.11
	180 min RUV-B	6.216
	210 min RUV-B	7.009
Sin Protección Física	90 seg RUV-B	6.649
	180 seg RUV-B	11.336
	210 seg RUV-B	6.937
	90 seg RUV-B	8.524
	180 seg RUV-B	13.355

Tabla 5: Concentración de proteínas según el reactivo de Bradford.

Los geles de electroforesis desnaturizante se digitalizaron para identificar el patrón de bandeo proteico. Se presentaron e identificaron 17 bandas. Las diferentes intensidades colorimétricas de las bandas están relacionadas con la cantidad de proteínas de cada una de las muestras. En el gel 1 (figura 13) se muestran los resultados con protección física y sin exposición a RUV-B, en los que se evaluó la intensidad colorimétrica tomando como referencia la banda número 5 debido a que se presentó en todos los carriles con una intensidad similar (gráfica 12). En el gel 2 (figura 14) se presentan los resultados sin protección a la RUV-B, donde se tomó como referencia la banda número 6 (gráfica 13).

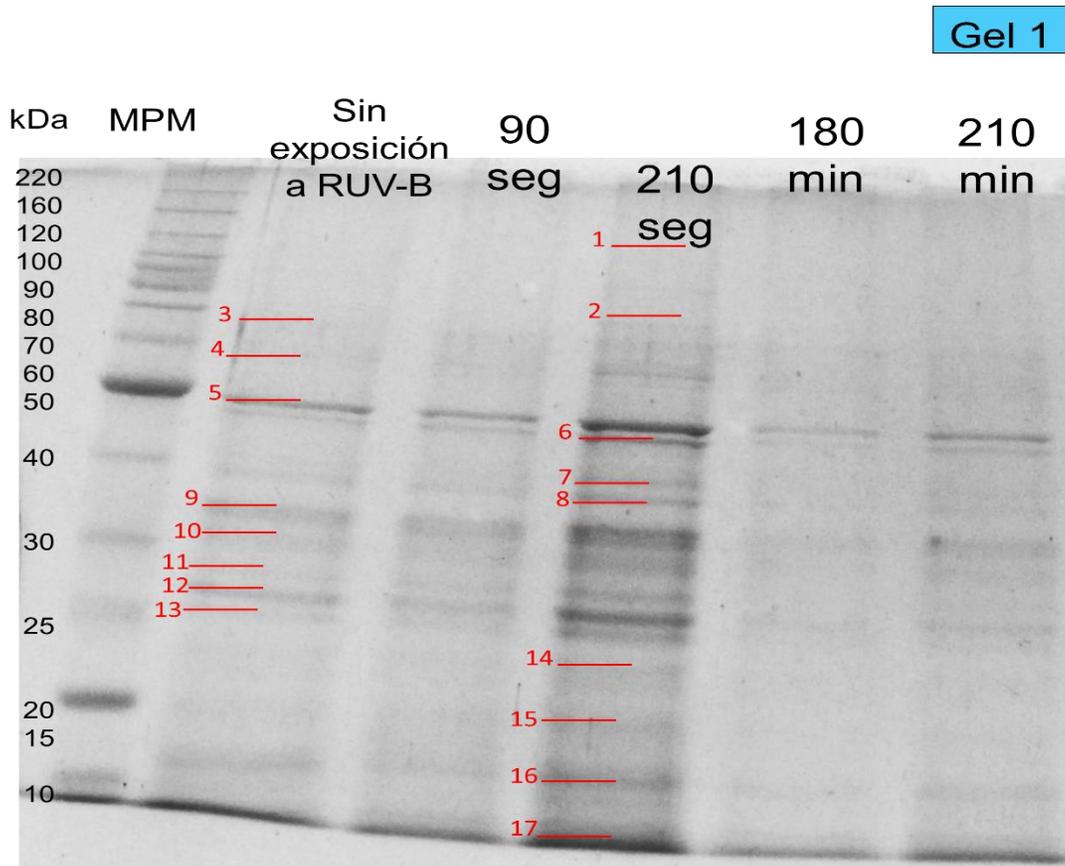
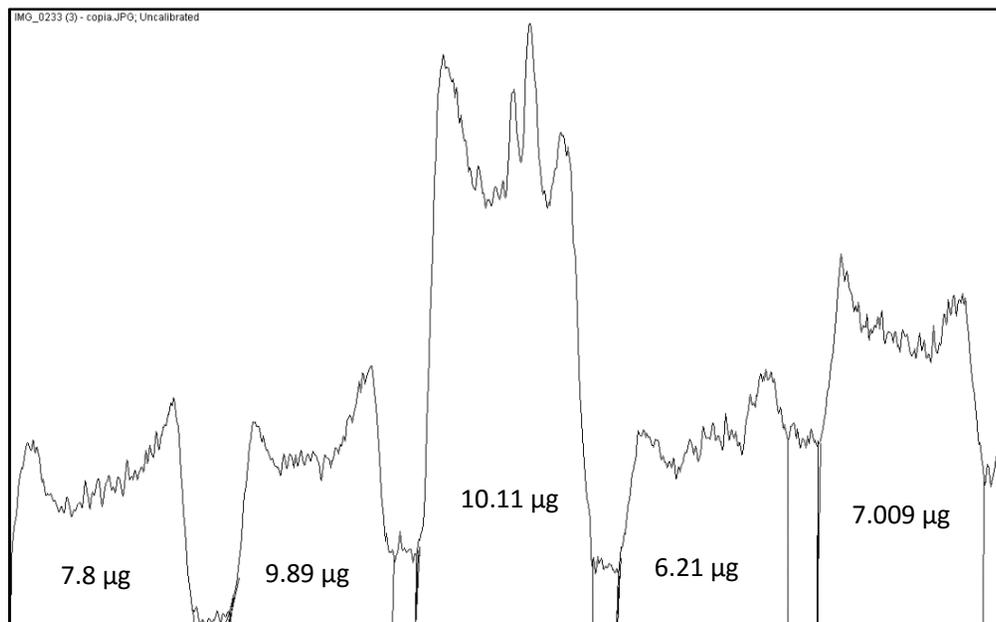


Figura 13: Gel de poliacrilamida resaltando las bandas de los tiempos cero y los diferentes tiempos de exposición a RUV-B con protección con barrera física. Simbología: MPM: marcador de peso molecular.



Gráfica 10: Densitometría: muestra la intensidad colorimétrica de la banda número 5 en cada uno de los carriles, según el software ImageJ.

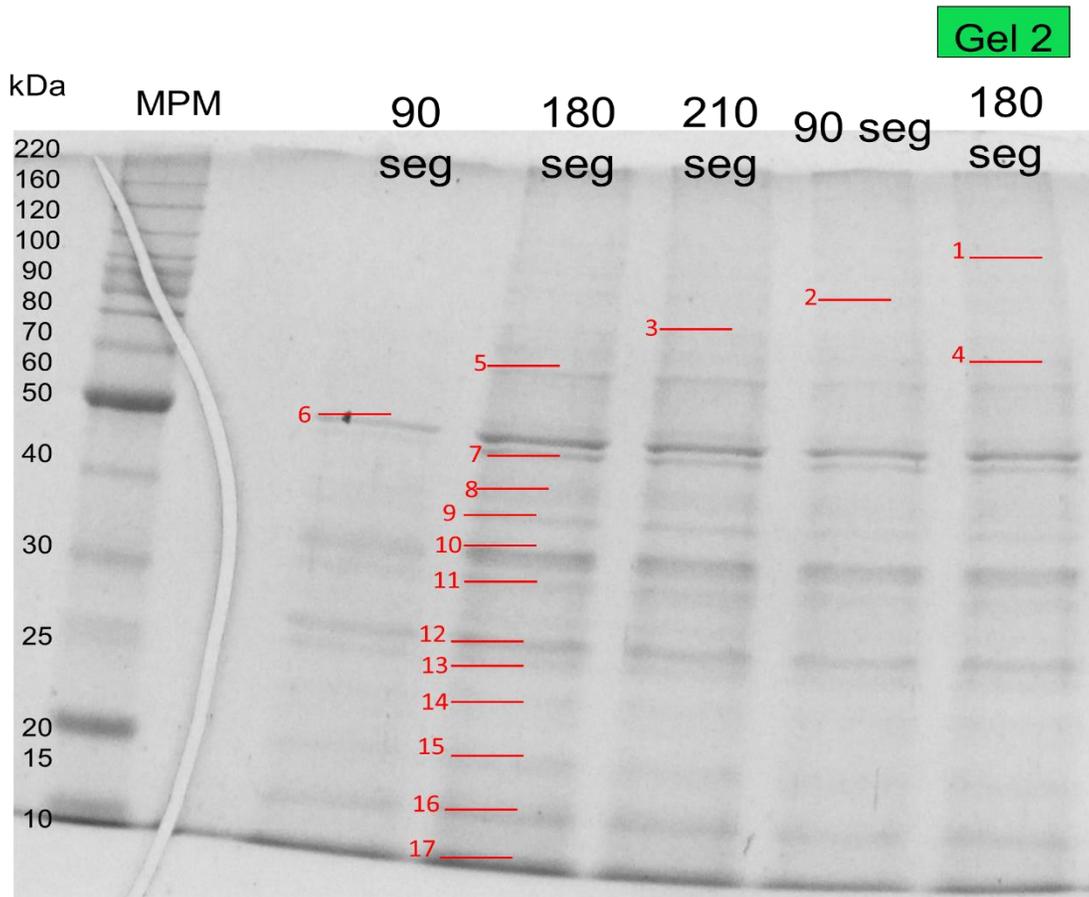
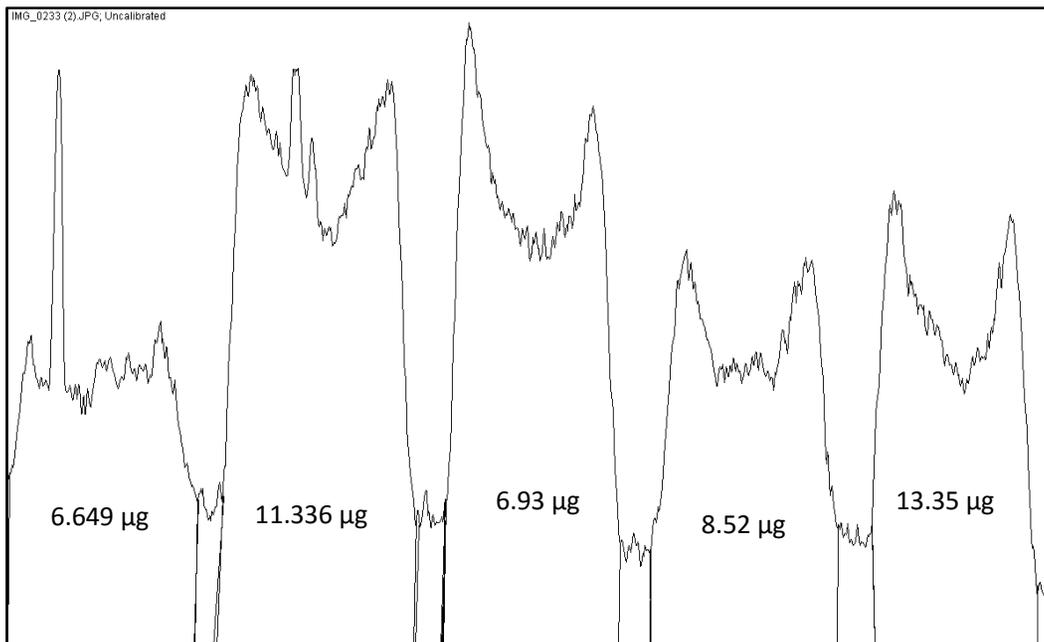


Figura 14: Gel de poliacrilamida resaltando las bandas de los tiempos con exposición sin protección a la RUV-B. Simbología: MPM: marcador de peso molecular.



Gráfica 11: Densitometría: muestra la intensidad colorimétrica de la banda número 6 en cada uno de los carriles, según el software ImageJ.

En las electroforesis se observa que existe cierta similitud en el número de bandas visibles entre los diferentes carriles. Es importante mencionar que, aunque no existe una expresión diferencial de proteínas, el patrón de bandeado característico del grupo que no fue expuesto a la radiación se mantiene de forma general en los grupos irradiados con protección. En el caso de los grupos expuestos a RUV-B sin protección el número de bandas aumentó en cada uno de los tiempos de exposición (tabla 6).

# número de banda	Peso molecular (kDa)	Sin exposición a RUV-B	Protección física				Sin protección				
			90 seg	210 seg	180 min	210 min	90 seg	180 seg	210 seg	90 seg	180 seg
1	93.45			X							X
2	81.73			X	X				X	X	
3	71.49	X	X	X				X		X	X
4	62.52	X	X	X	X	X			X	X	X
5	47.82	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6	45.33	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7	39.54			X			X	X	X	X	X
8	36.58	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9	31.99	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10	27.98	X	X	X		X	X	X	X	X	X
11	23.2			X			X	X	X	X	X
12	21.4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13	18.72	X	X	X		X	X	X	X	X	X
14	16.37	X	X	X		X	X	X	X	X	X
15	14.32	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
16	11.87	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
17	9.08	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Tabla 6: Pesos moleculares de cada una de las bandas resultantes en la electroforesis.

Se realizó una estimación con el programa de libre acceso ImageJ, dividiendo el área obtenida sobre la concentración de proteínas de cada tiempo de irradiación, además se le asignaron valores relativos a cada uno de los carriles, de acuerdo a lo obtenido en las densitometrías y utilizando los valores de concentración obtenidos con el método de Bradford (tabla 7).

En la tabla 6 se puede observar que las concentraciones de proteínas y la intensidad colorimétrica concuerdan, es decir, en donde se tiene más proteínas se tiene mayor intensidad colorimétrica. La mayor concentración de proteínas totales se presentó en los tiempos de 90 y 210 segundos de exposición a la RUV-B con barrera física; en los grupos sin barrera física la mayor concentración de proteínas fue a los 180 segundos de exposición a la RUV-B.

Gel	Muestra	Porcentaje	Concentración de proteínas. Bradford (µg/ml)	Valor relativo
Gel 1 Protección Física	Sin exposición a RUV-B	10.54	7.875	0.77
	90 seg de RUV-B	10.822	9.894	0.97
	210 seg RUV-B	29.608	10.11	1
	180 min RUV-B	12.511	6.216	0.614
	210 min RUV-B	18.879	7.009	0.693
Gel 2 Sin protección	90 seg RUV-B	15.004	6.649	0.657
	180 seg de RUV-B	26.174	11.336	1
	210 seg RUV-B	21.971	6.937	0.686
	90 seg RUV-B	15.758	8.524	0.843
	180 seg RUV-B	15.332	13.355	1.32

Tabla 7: Comparativo de la concentración de proteínas y el valor relativo obtenido a partir de la densitometría.

Con los resultados obtenidos en la electroforesis no fue posible determinar una expresión diferencial de proteínas a causa de la RUV-B. Sin embargo, se sabe que en levaduras expuestas a algún tipo de daño como choque térmico, presión osmótica, estrés oxidativo ó radiación UV, las proteínas involucradas o relacionadas a los procesos mencionados se expresan en un nivel alto a causa del estrés ambiental ocasionado (Cuero et al., 2013)

En diversos trabajos se ha investigado y comprobado que la RUV puede promover un aumento en la tasa del ciclo celular y alteraciones morfológicas que son indicativo de que se inició con el proceso de apoptosis. También se han estudiado cambios en la expresión de genes que son afectados por sensibilidad a la radiación UV (Birrell et al., 1998; Cabiscol et al., 2000).

Los mecanismos que se modifican en *S. cerevisiae* por efecto de la RUV-B no están bien establecidos. La expresión de genes asociados a la defensa antioxidante y/o fotoprotectora supondría un decrecimiento del estrés oxidativo y la reparación del daño a causa de los rayos UV. Las fotoliasas son un ejemplo de enzimas capaces de reparar el daño causado por la RUV-B, ya que actúan a nivel de ADN rompiendo los dímeros de pirimidina ciclobutano que son la mutación más frecuente en el genoma por exposición a la radiación ultravioleta (Guintini, et al., 2015).

8.3.2. Consideraciones finales.

Este trabajo enriquece más el conocimiento sobre las posibles actividades biológicas de los metabolitos secundarios presentes en el género *Jacaranda*. Se evaluó la actividad fotoprotectora de un extracto metanólico de flor, donde se reportan compuestos polares con actividad antioxidante conocida. Un extracto metanólico puede contener varios principios activos que pueden ser fotoprotectores y presentar cierta sinergia al momento de actuar en contra del daño por RUV-B.

Se sabe que *S. cerevisiae* soporta fluctuaciones como la cantidad de nutrientes disponibles, la temperatura y la presencia de agentes nocivos, tales como radiaciones y sustancias químicas tóxicas, se seleccionó a estas levaduras como un modelo valioso en la evaluación de sustancias fotoquimioprotectoras. Se sugieren futuros estudios y evaluaciones de estas sustancias utilizando este modelo biológico. Esta levadura es un modelo adecuado para la evaluación de sustancias fotoprotectoras, ya que su manejo es fácil y práctico, la reproducción en la manera de manejo del modelo es sencilla y se puede observar el deterioro poblacional claramente, al ir decreciendo el logaritmo del número de sobrevivientes progresivamente conforme aumenta el tiempo de irradiación continua, además al tener estudios del genoma completo de *S. cerevisiae* es posible encontrar mutaciones específicas a causa de la RUV-B.

Conclusiones

El extracto metanólico de flor de *J. mimosifolia* absorbe la luz UV-B.

S. cerevisiae es capaz de crecer en un medio de cultivo cuya única fuente de carbono es el extracto metanólico de *J. mimosifolia*.

La RUV-B es letal para población de *S. cerevisiae* a los 3 .5 minutos de exposición.

El extracto metanólico de *J. mimosifolia* tiene un efecto fotoprotector al evitar la muerte de la levadura inducida por la RUV-B, cuando el extracto es utilizado como barrera física y/o medio de cultivo para *S. cerevisiae*.

La exposición a la RUV-B probablemente provoca en las levaduras un incremento en la síntesis de proteínas.

S. cerevisiae puede ser utilizado como modelo biológico para evaluar extractos con posible actividad fotoprotectora.

Anexo 1

A. Kit de extracción de ADN UltraClean All Prep para células vegetales.

El kit de aislamiento de ADN microbiano UltraClean® está diseñado para aislar el ADN genómico de alta calidad a partir de microorganismos. Una variedad de microorganismos, incluyendo las esporas bacterianas y fúngicas.

1. Se añadió 1,8 ml de microbiana de cultivo (levaduras) a un tubo de 2 ml y se centrifugo a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se centrifugaron los tubos a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente y se eliminó completamente el sobrenadante con una punta de pipeta. Este paso se concentraron los pellets de las células microbianas. En algunos casos puede tomar más tiempo para sedimentar las células por completo. Es importante para sedimentar las células por completo y eliminar todos los medios de cultivo en este paso.

2. Se resuspendió el sedimento celular en 300 µl de la solución Microbead y se mezcló suavemente. Se transfirieron las células y se volvieron a resuspender en un tubo Microbead. La solución Microbead contiene sales y un tampón que estabiliza y se dispersa homogéneamente las células microbianas antes de la lisis.

3. Comprobar Solución MD1. Si se precipita Solución MD1, se calienta la solución a 60°C hasta que el precipitado se haya disuelto. Se añadió 50 µL de solución MD1 al tubo con Microbead. Solución MD1 contiene SDS y otros agentes de confusión requeridas para la lisis celular. Además de ayudar en la lisis celular, SDS es un detergente aniónico que descompone los ácidos grasos y lípidos asociados con la membrana celular de varios organismos. Si hace frío, se precipitará. El calentamiento a 60 ° C se disolverá la SDS y no dañará el SDS o los otros agentes de confusión. Además, la solución MD1 se puede usar mientras está todavía caliente.

4. Tubos con Microbead se aseguran en un vortex a velocidad máxima durante 10 minutos. Este paso crea las condiciones combinadas químicas / mecánicas requeridas de lisis para liberar los ácidos nucleicos deseados a partir de células microbianas. La acción de vórtice es típicamente todo lo que se requiere, sin embargo, más robustos batidores de talón también se pueden usar. En la mayoría de los casos, los tiempos pueden ser más cortos con otros dispositivos, este proceso es compatible con las máquinas de preparación rápida.

5. Se centrifugó los tubos a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Asegurando de no superar los 10.000 x g ya que los tubos pueden romperse. Con esto los restos celulares se envía a la parte inferior del tubo mientras que el ADN es permanece en el sobrenadante.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml.
7. Se obtiene entre 300 a 350 μ l de sobrenadante. El volumen esperado puede variar dependiendo del tamaño del sedimento celular original del paso 1.
8. Se añadió 100 μ l de la solución MD2, al sobrenadante. Vortex durante 5 segundos. A continuación, se incubo a 4 ° C durante 5 minutos.
9. Se centrifugó los tubos a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g la solución MD2 contiene un reactivo para precipitar el ADN material no orgánico e inorgánico que incluye restos de células y proteínas. Es importante eliminar la contaminación de materia orgánica e inorgánica que puede reducir la pureza del ADN.
10. Para evitar el sedimento, se transfirió todo el volumen del sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml. El pellet en este punto contiene materiales orgánicos e inorgánicos no de ADN, incluyendo restos de células y proteínas.
11. Se agitó para mezclar la solución MD3 antes de su uso. Se añadió 900 μ L de solución MD3 al sobrenadante y se agitó durante 5 segundos. Solución MD3 es una solución salina altamente concentrada. Se establece la condición de alta sal necesaria para unirse al ADN a la membrana de la vuelta de filtro en el siguiente paso.
12. Se centrifugó a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Se requiere un total de 2 a 3 cargas para cada muestra procesada. Desechar todo el flujo a través del líquido. El ADN se une selectivamente a la membrana de sílice en el dispositivo de filtro de la vuelta. Los contaminantes pasan a través de la membrana de filtro, dejando sólo el ADN unido a la membrana.
13. Se añadió 300 μ l de la solución de MD4 y a temperatura ambiente centrifugar durante 30 segundos a 10.000 x g. La solución MD4 es una solución de lavado a base de etanol se utiliza para

limpiar aún más el ADN que está unida a la membrana de filtro de sílice en un filtro de spin. Esta solución de lavado elimina los residuos de sal y otros contaminantes, al tiempo que permite el ADN para permanecer unida a la membrana de sílice.

14. Se desechó el flujo. Este flujo a través de está desechos con una solución de lavado de etanol y contaminantes que no se unió a la membrana de sílice de la vuelta del filtro.

15. Se centrifugó a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g. Este paso elimina la solución residual MD4 (solución de lavado de etanol). Es fundamental para eliminar los restos de solución de lavado, ya que puede interferir con las aplicaciones de ADN corriente abajo.

16. Teniendo cuidado de no derramar líquido sobre la cesta de filtro giratorio, el lugar de la vuelta de filtro en un nuevo tubo de recogida de 2 ml. Es importante que no queden restos de la solución de lavado a base de etanol.

17. Se añadió 50 μ l de la solución de MD5 en el centro de la membrana de filtro blanco. Cuando se colocar la solución MD5 (tampón de elución) en el centro de la pequeña membrana blanca se asegurará de que toda la membrana se humedece. Esto dará lugar a una liberación más eficiente de ADN.

18. Se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 x g. A medida que la solución MD5 pasa a través de la membrana de sílice, el ADN se libera y fluye a través de la membrana, y en el tubo de la colección. El ADN se libera, ya que sólo se puede unir a la membrana de filtro giratorio de sílice en presencia de sal. Solución MD5 es 10 mM Tris pH 8 y no contiene sal.

19. Se descartó filtro centrifugado. El ADN en el tubo está listo para cualquier aplicación aguas abajo. Se almacenó el ADN congelado (-20°C), la solución MD5 no contiene EDTA.

B. Kit de extracción de ADN All Prep para células animales.

El tejido y células de ADN kit de aislamiento de UltraClean® es ideal para aislar ADN genómico a partir de tejidos animales, así como células cultivadas. Sin el uso de disolventes orgánicos como el fenol y cloroformo, este kit es seguro y fácil de usar. El tejido y células kit de aislamiento de ADN UltraClean® está diseñado para el aislamiento de ADN a partir de muestras de 1-25 mg de tejido o hasta 5 x 10⁶ células.

1. Se agitó para mezclar la solución TD1. Se añadió 700 µl de solución de TD1. A continuación, se añadió 1-25 mg de células. Si el aislamiento de ADN es a partir de células cultivadas, se lavó con PBS para eliminar el medio residual y se centrifuga a 5000 x g para sedimentar las células. Se añadió 1 ml de solución TD1 y se mezcla a fondo utilizando una pipeta o vortex hasta que se dispersa la materia sólida.
2. Evitando las perlas, se transfirió todo el volumen de la muestra de líquido a un filtro giratorio y se centrifugó a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente. El ADN se une selectivamente a la membrana de sílice del filtro giratorio. Los contaminantes pasan a través de la membrana de filtro, dejando sólo el ADN unido a la membrana.
3. Se añadió 400 µl de la solución TD2 y se centrifugó a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente. La solución TD2 es una solución de lavado a base de etanol utilizado para limpiar el ADN que está unida a la membrana de sílice del filtro giratorio. La solución TD2 elimina las sales residuales, desechos celulares y proteínas al tiempo que permite el ADN para mantenerse unido a la membrana.
4. Centrifugar de nuevo a 10.000 x g durante 1 minuto, eliminando TD2 solución residual. El segundo giro eliminó TD2 residual. Es fundamental para eliminar todo rastro de la solución de lavado debido a que el etanol puede interferir con muchas aplicaciones posteriores tales como PCR, digestiones de restricción y electroforesis en gel.
5. Coloque con cuidado el filtro giratorio en un nuevo tubo de 2 ml estéril.
6. Se añadió 50 µl de la solución TD3 al centro de la membrana de filtro blanco. La solución TD3 es un tampón de elución. La colocación de TD3 en el centro de la pequeña membrana de filtro blanco aseguró de que toda la membrana se humedezca. Esto dará lugar a una liberación más eficiente y completa de ADN de la membrana de sílice de la vuelta de filtro. Cuando la solución de TD3 pasa a través de la membrana de sílice, el ADN que se une en presencia de alta concentración de sal ahora se libera selectivamente por la solución de TD3 que carece de sal.
7. Se centrifugó a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente.
8. Se desechó el filtro giratorio. El ADN se transfirió a un tubo estéril de 2 ml con este último paso el ADN ya está listo para cualquier aplicación aguas abajo. No se requieren medidas adicionales. Para obtener un mayor rendimiento, una segunda elución 50 µl puede llevar a cabo. Recomendamos almacenar el ADN congelado (-20°C a -80 °C). La solución TD3 no contiene EDTA.

C. Reactivo TRIzol® de Invitrogen.

Es un reactivo listo para usar, diseñado para aislar el ARN total de alta calidad (así como el ADN y las proteínas) a partir de muestras líquidas de humano, animal, vegetal, levadura, bacteriana, viral y origen en una hora. TRIzol LS es una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina, y otros componentes propietarios que facilitan el aislamiento de una variedad de especies de ARN de tamaño molecular grande o pequeño. TRIzol mantiene la integridad del ARN debido a la inhibición altamente eficaz de la actividad de la RNasa durante la homogeneización de la muestra. Permite el procesamiento simultáneo de un gran número de muestras, y es una mejora para el método de aislamiento de ARN de una sola etapa (Chomczynski y Sacchi, 1987). TRIzol permite al usuario realizar la precipitación secuencial de RNA, DNA y proteínas a partir de una sola muestra. Después de homogeneizar la muestra con TRIzol se añadió cloroformo, y se deja que el homogeneizado a separarse en una capa transparente superior acuosa (que contiene el ARN), una interfase y una capa orgánica inferior rojo (que contiene el ADN y las proteínas). RNA se precipita de la capa acuosa con isopropanol. El ADN se precipitó de la capa de interfase / orgánica con etanol. La proteína se precipitó a partir del sobrenadante de fenol-etanol por precipitación isopropanol. El precipitado de ARN, ADN, o proteína se lava para eliminar impurezas y, a continuación, se resuspendieron para su uso en aplicaciones posteriores. El ARN aislado se puede usar en RT-PCR, análisis de Northern Blot, Dot Blot hibridación, poli (A) + selección, traducción in vitro, ensayo de protección de RNasa, y la clonación molecular. El ADN aislado puede ser utilizado en la PCR, y la restricción de digestión de la enzima, y transferencias de Southern. Las proteínas aisladas se pueden utilizar para transferencias Western, la recuperación de alguna actividad enzimática, y algo de inmunoprecipitación.

También está diseñado para el procesamiento de muestras líquidas (por ejemplo, de sangre y de preparaciones de virus).

La única diferencia entre TRIzol®, y TRIzol® LS se encuentra en la concentración de los componentes. TRIzol® LS está más concentrado, por lo que se requiere menos reactivo con relación a la muestra. No utilizar el reactivo TRIzol® LS sin diluir con muestras sólidas. El procesamiento de muestras sólidas con resultados TRIzol® LS de reactivos en el rendimiento disminuyó en comparación con el reactivo TRIzol®.

Procedimiento para el aislamiento de proteínas: Las proteínas están aislados de la capa sobrenadante de fenol-etanol que quedó después de la etapa de precipitación de ADN. Se aisló la proteína utilizando precipitación de proteína o proteína de diálisis.

1. Precipitación de proteínas: Se añadió 1,5 ml de isopropanol a la capa de fenol-etanol por 1 ml de reactivo TRIzol® LS utilizado en la homogeneización inicial.
2. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 10 minutos a $4^\circ C$ para sedimentar la proteína. Se retiró y desechó el sobrenadante.
4. Se procedió a la etapa de lavado de la proteína con la proteína de pellets restante. Se preparó una solución de lavado que consiste en hidrocloreuro de 0,3 M de guanidina en 95% de etanol.
5. Se lavó el sedimento de proteína con 2 ml de la solución de lavado por 1 ml TRIzol® LS utilizado en la homogeneización inicial.
6. Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras de proteína se pueden almacenar en 0,3 M hidrocloreuro de guanidina-95% de etanol durante al menos un mes a $4^\circ C$ o durante al menos un año a $-20^\circ C$. 4. Centrifugar a $7500 \times g$ durante 5 minutos a $4^\circ C$. Se retiró y desechó la solución de lavado.
7. Se repitieron los pasos 2-4, dos veces más. Se añadió 2 ml de etanol al 100% de proteína de pellets después del tercer lavado y agitar.
8. Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a $7500 \times g$ durante 5 minutos a $4^\circ C$. Se retiró y desechó el lavado con etanol.
9. Se dejó secar al aire el sedimento de proteína durante 5-10 minutos. Sin permitir que el precipitado se secará.
10. Se procedió a la etapa de resuspensión de proteínas: se añadió la resuspensión de proteínas SDS al 1% a la proteína de pellets (200 μl) y se pipeteo de hacia arriba y hacia abajo hasta que la proteína es volvió a suspender. Para disolver completamente la proteína de pellets, fue necesario incubar la muestra a $50^\circ C$ en un baño de agua. Se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 10 minutos a $4^\circ C$ para sedimentar cualquier material insoluble. Se transfirió el sobrenadante que contiene la proteína a un nuevo tubo y se procedió almacenamiento de las muestras a $-20^\circ C$.

D. Hidróxido de sodio (NaOH).

Proceso de preparación de ADN de ebullición: una alícuota de 1000 µl de suspensión de células de *S. cerevisiae* se transfirió a microtubos y se incubó a 90 ° C en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos. La suspensión que contiene el ADN se homogeneizó enérgicamente por vórtice durante 10 segundos y el tubo se congeló en hielo. La muestra de ADN fue almacenada a -18 ° C.

Proceso de congelación-descongelación: las muestras se dejaron descongelar a temperatura ambiente y se homogeneizaron por vórtice durante 10 s.

Proceso de extracción de ADN con tampón de lisis celular estándar: Alícuotas de 1000 µl de suspensión de células de *S. cerevisiae* se centrifugaron a 10.000 xg durante 15 minutos y los sedimentos de células de levadura se transfirieron a microtubos que contienen 500 µL 50 mM, EDTA 10 mM, SDS al 2,0%. La mezcla se incubó a 60 ° C durante 1 hora en un baño de agua. Un volumen igual (500 µl) de fenol saturado con tampón. Cloroformo (1:1) se añadió a la solución de ADN. La mezcla se homogeneizó vigorosamente por vórtice, y se centrifugó para la separación de fases en una centrífuga a 10.000 x g durante 15 minutos. La capa acuosa superior (que contiene el DNA) se transfirió cuidadosamente a un tubo limpio, evitando la interfaz de fenol y se añadió un volumen igual de cloroformo. La mezcla se mezcló vigorosamente por vórtice y se centrifuga a 10.000 x g durante 15 min. Se repitió la extracción con cloroformo.

La capa acuosa superior se transfirió a un tubo de centrifuga limpio y un volumen igual de isopropanol frío se añadió a la muestra de ADN. La mezcla se mezcló vigorosamente por vórtice, después el tubo se dejó en reposo en un baño de hielo-agua durante 30 minutos y se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min. Para recuperar el ADN precipitado, las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se descartó. Los sedimentos se lavaron con etanol enfriado con hielo al 70%, y se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 min. El sedimento de ADN resultante se seca al aire y se disolvió en 100 µL de TE (Tris-HCl mM pH 10,7,6, EDTA 1 mM pH 8,0). La muestra de ADN fue almacenada a -18 ° C.

E. Romper la célula con un choque térmico.

Subiendo la temperatura de la célula a 100°C y bajándola inmediatamente a 0°C, con esta técnica no se obtuvo un bandeado favorable. Para la extracción del ADN se toma un pellet calibrado (10 µl).

El inóculo se deposita en un tubo de ensayo o tubo Eppendorf, estéril, con tapón de rosca, que contiene 2 ml de agua desionizada estéril libre de nucleasas. Se resuspendieron las células en el agua por agitación en un vortex durante 20s y los tubos se calentaron a baño María (100 °C) durante 20 min, acto seguido se enfriaron en hielo (0°C) por 10 min. Utilizando puntas de micropipeta nuevas se tomó 1 ml de cada muestra y se depositó en un tubo Eppendorf nuevo y estéril. Las muestras se centrifugan a 12 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante, que contiene el ADN se separó con una micropipeta de 100 µL y se depositó en otro tubo Eppendorf nuevo y estéril, el cual se etiquetó y se almacenó a -20°C hasta su utilización para la reacción de la PCR o electroforesis.

F. Extracción de proteínas totales utilizando buffer RIPA, con esta técnica además de su bajo costo y poco tiempo que se destinó al proceso de extracción, se obtuvieron los mejores resultados en la electroforesis, decidiendo por esta técnica como la ideal para realizar la extracción de proteínas.

“Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia*, usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” M.A.R.E.

Anexo 2

 UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA
HERBARIO IZTACALA

FESI/HI/009/2016

MIGUEL ANGEL ROMERO ESPINOSA
Alumno de la Carrera de Biología
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM
Presente

Por este conducto me permito proporcionar a usted la identificación taxonómica del material botánico de respaldo del Proyecto de Tesis de Licenciatura “**Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia* D. Don (BIGNONIACEAE), usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen**”, que se realiza en el Laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de esta Facultad, bajo la dirección del Dr. José Guillermo Ávila Acevedo.

Así mismo, le informo que la planta ha sido integrada en la **Colección Etnobotánica** del Herbario Iztacala con el siguiente número de registro:

Nombre Científico	Familia Botánica	Nombre Popular	No.de Registro
<i>Jacaranda mimosifolia</i> D. Don	BIGNONIACEAE	“Jacaranda”	2484 IZTA

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 29 de febrero del 2016


M. EN C. MA. EDITH LÓPEZ VILLAFRANCO
Responsable del Herbario IZTA



Av. De los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepanli, Estado de México.
C.P. 54090. A. P. 314. Tel./Fax: 5623-1378.
herbario_izta@campus.iztacala.unam.mx

“Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia*, usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” M.A.R.E.



Figura 15: Fotografía del ejemplar botánico, montado e identificado taxonómicamente en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, U.N.A.M.



Referencias

- Acosta S. M., 1992, Vademecum de Plantas Medicinales del Ecuador. Fundación Ecuatoriana de Estudios Sociales FESO. Abya-Yala, Quito, p. 112.
- Aggarwal BB, Shishodia S 2006. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemistry Pharmacology* 71: 1397-1421.
- Afaq, F., Mukhtar, H. 2001. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 63:61-69.
- Adhami N., Gilliam A.C., Katiyar S.K., O'Brien T.G., Mukhtar H. 2001. A definitive role of ornithine decarboxylase in photocarcinogenesis. *Mutation Research*, 571:153-173.
- Ahmad N., Mukhtar H. 1999. Green Tea in Chemoprevention of Cancer. *Toxicological Science* 52 (Supplement), 111-117.
- Alonso-Lebrero J.L., Domínguez-Jiménez C., Tejedor A., Brieva A., Pivel J.P. 2003. Photoprotective properties of a hydrophilic extract of the fern *Polypodium leucotomos* on human skin cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology*, 70:31-37.
- Avila-Acevedo J.G., Castañeda C. M., Benítez F.J., Durán D.A., Barroso V.R., Martínez C.G., Muñoz L.J.L., Martínez C.A., Romo de Vivar A. 2005. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia*, 76 (3-4):301-309.
- Avril. M.R., et al., 2002. Sol y piel. Beneficios, riesgos y prevención. Masson S.A. Barcelona.
- Asadi, S., Ahmadiani, A., Esmaeili, M.A., Sonboli, A., Ansari, N., Khodaghali, F., 2010. In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: a comparative study. *Food Chemistry Toxicology*. 48, 1341–1349.
- Babor, A. y Siddequi, A. Bioactive Naturally Occurring Flavonoids. *Hamdard Medicus*, 1999, vol. 52, no. 1.
- Baker, W.; Ollis, W. D. 1995. Proceedings of the Plant Phenolics. Recent development in the chemistry of natural phenolic compounds. *Natureforsch.* 50:311-312.
- Bai X, Qui A, Guan J. 2007. Antioxidant and protective effect of an oleanolic acid-enriched extract of *A. deliciosa* root on carbon tetrachloride induced rat liver injury. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 16,1: 169-173.
- Birrell G.W, Giaever G, Chu A.M et al., 2001. A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes affecting UV radiation sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12608–12613.
- Blatt, C. T. T.; Dos Santos, M. D.; Salatino, A. 1998. Flavonoids of Bignoniaceae from the “cerrado” and their possible taxonomic significance. *Plant Systematics and Evolution*. 1998, 210: 289–292.
- Bjorn, L.O. Widell, S., Wang, T. 2002. Evolution of UVB regulation and protection in plants. *Advances in Space Research*. 30: 1557-1562.

“Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia*, usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” M.A.R.E.

- Boer VM, Winde JH, Pronk JT y Piper MD. 2003. The genome-wide transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus or sulfur. *Journal of Biology Chemistry* 278; 3265-3274.
- Bogin, S. M y Gómez, M.M. Informativo rural, 2006. E.E.A INTA San Luis, 3(9):8. FICES (UNSL). http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/manejo%20silvopastoril/59-jacaranda.pdf consultado en abril 2015.
- Boone C. Yeast Systems Biology: Our Best Shot at Modeling a Cell. *Genetics* 2014; 198: 435–437.
- Botion, L.M., Ferreira, A.V.M., Côrtes, S.F., Lemos, V.S., Braga, F.C., 2005. Effects of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina on lipid metabolism and intestinal tonus. *Journal of Ethnopharmacology* 102: 137–142.
- Brandão, M.G.L., Zanetti, N.N.S., Oliveira, P., Graef, C.F.F., Santos, A.C.P., Monte-Mór, R.L.M., 2008. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the official pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology* 120, 141–148.
- Brandão, M.G.L., Pignal, M., Romaniuc, S., Graef, C.F.F., Fagg, C.W., 2012. Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779–1853). *Journal of Ethnopharmacology*. 143: 488–500.
- Brock T.D., 1978. *Biología de los microorganismos*. 2ed. Universidad de Wisconsin. Prentice Hall, Inc. New Jersey, E.U.A. 397-398 y 703-715 pp.
- Brown, T., Le May. H.E., Bursten, B.E., Buraige, J.R. 2003. *Chemistry. The central science*. Pearson Education. Editorial: Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey. EUA.
- Cabral Goncalvez I., S. Pentha, M.Matos, ARSantos ,F. Franco and H.M. Pinherio. 2005. Evaluation of integrated anaerobic/aerobic SBR system for the treatment of wool dyeing effluents. *Biodegradation*. 16, 81-89.
- Cabisco E, Piulats E, Echave P et al., 2000. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biology Chemistry* 275:27393–27398.
- Cáceres A. *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*. 1996. Guatemala, Editorial Universitaria, 401p.
- Camacho F. 2001. Antiguos y nuevos aspectos de la fotoprotección. *Dermatología y Dermocosmética clínica*. 4(7):441-448.
- Carvalho C.A, Lourenço M.V, Bertoni BW, França SC, Pereira PS, Fachin AL and Pereira AMS. 2009. Atividade antioxidante de *Jacaranda decurrens* Cham., Bignoniaceae. *Revista de Brasileira Farmacognosia* 19: 592-598.
- Chambers PJ, Pretorius IS. 2010. Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *European Molecular Biology Organization Reports*.11: 914–920.
- Chan-Bacab, M.J., Peña-Rodríguez, L.M., 2001. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports* 18, 674–688.

“Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia*, usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” M.A.R.E.

- Cevallos M.V., Elaboración y control de calidad de una crema corporal hidratante a base de mucilagos y aromas naturales. Tesis de Grado Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnico de Chimborazo, Facultad de Ciencias. Escuela Bioquímica y Farmacia. Ecuador, 2013.
- Cherry JM, Hong EL, Amundsen C, *et al.* *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Research* 2011; 40: D700–D705.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y el Uso de la Biodiversidad. 2012. Biodiversidad Mexicana, Micrositio: Vecinos verdes, árboles comunes de las ciudades. <http://www.biodiversidad.gob.mx/Difusion/cienciaCiudadana/urbanos/ficha.php?item=Jacaranda%20mimosifolia> consultado en septiembre 2013.
- Cometa F., Tomassini L., Nicoletti M., Pieretti S. Phenylpropanoid glycosides. 1993. Distribution and pharmacological activity. *Phytotherapy Research*. 64:195-217.
- Conforti F, Statti G, Tundis R, Loizzo MR, Bonesi M 2004. Antioxidant and cytotoxic activities of *Retama raetam* subsp. *gussonei*. *Phytotherapy Research* 18(7): 585-587.
- Cordell, B.; McCarthy, J. 2013. A Case Study of Gut Fermentation Syndrome (Auto-Brewery) with *Saccharomyces cerevisiae* as the Causative Organism. *International Journal of Clinical Medicine* 04(7): 309.
- Costa V y Moradas-Ferreira P- 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*. 22, 217-246.
- Cuero R., McKay D. S., 2013 Induction and construct UV protective yeast plasmid. *Journal of Biotechnology*. 166(3): 76-83.
- Davis D., Dulbecco R., Eisen H. N. y Gisenberg H. S. 1984. Tratado de microbiología. Salvat Editores, S. A. Mallorca, Barcelona. España.
- de Miranda, F.; Vilar, J.; Alves, I.; Cavalcanti, S.; Antonioli, 2001. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex Griseb. Inner bark aqueous extract. *BMC Pharmacology*. 1(1):6.
- Diffey, B., Kochevar, I.E. 2007. Basic principles of photobiology. In: Lim, H.W., Honigsmann, H., Hawk, J.L.M. (Eds). *Photodermatology*. Informa Healthcare. New York.
- Di Stati, L.C., Oliveira, G.P., Carvalhaes, M.A., Queiroz-Junior, M., Tien, O.S., Kakinami, S.H., Reis, M.S., 2002. Medicinal plants popularly used in the Brazilian tropical Atlantic forest. *Phytotherapy Research* 73: 69–91.
- Dong Z. 2003 Molecular mechanism of chemopreventive effect of resveratrol. *Mutation Research* 523-524: 145-160.
- Durán D. A., Vargas V. A., Cisneros C. A. E. 2009. Bioestadística. Editor: José Jaime Ávila Valdivieso. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. Páginas:

“Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia*, usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” M.A.R.E.

- Endringer, D.C., Valadares, Y.M., Campana, P.R.V., Campos, J.J., Guimarães, K.G., Pezzuto, J.M., Braga, F.C., 2010. Evaluation of Brazilian plants on cancer chemoprevention targets in vitro. *Phytotherapy Research* 24, 928–933.
- Evans Shultes R., Hofmann A. *Plantas de los Dioses: orígenes del uso de los alucinógenos*. 1979. Mc Graw-Hill Book Company. Inglaterra.
- Fernández, M. E. 1998. *Anales de la Asociación Química Argentina*. 56, 135–137.
- Ferreres, F., Grosso C., Gil-izquierdo A., Valentão P., Andrade P. B., 2013. Phenolic compounds from *Jacaranda caroba* (Vell.) A. DC.: Approaches to neurodegenerative disorders. *Food Chemical Toxicology*. 57:91-98
- Feuillat M. 2006. Oenological impact of manno-proteins and peptides from yeast: examples of interaction with wine polyphenols. *New trends in the use of specialty inactivated yeast during winemaking*. XVIIIes Entretiens Scientifiques Lallemand (Firm). Blagnac, France.
- Friesen, V. 2004. *Una guía para plantas leñosas del Chaco. Iniciativa para la Investigación y Transferencia de Tecnología Agraria Sostenible*. Loma Plata. Paraguay.
- Gachet S. M., Wolfgang S., 2008. *Jacaranda- An ethnopharmacological and phytochemical review*. *Journal of Ethnopharmacology* 121(1):14-27.
- García-Bores A.M., Bello C., Campos Y., Benítez J.C., Flores S., Canales M., Hernández T., Avila-Acevedo J.G. 2010. Photoprotective activity of *Yucca periculosa* polyphenols. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9 (2),100 – 108.
- Garzón Jiménez R.C., 2009. *Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes Clases Químicas por hongos y bacterias Inmovilizados sobre fibra de agave *Tequiliana webber* var. Azul*. Tesis de grado en Microbiología industrial. Laboratorio de Residuos Peligrosos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, México. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Gavilanes M.L, Brandão M. 1992. *Espécies arbóreas padronizadas do cerrado mineiro e sua distribuição no Estado*. *Ethnopharmacology Research*. 16: 40–45.
- G-Biosciences. 2014. *Protein Electrophoresis. Handbook and Selection Guide*. Geno Technology Inc., USA. Consultado digitalmente en: http://www.gbiosciences.com/PDF/Handbook/Protein_Electrophoresis_Handbook.pdf y <http://info.gbiosciences.com/blog/bid/196974/Determining-Protein-Molecular-Weight-with-SDS-PAGE-An-Overview-of-the-Process> consultados en septiembre 2015.
- Goddard MR. *Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation*. *Ecology* 2008; 89: 2077–2082.
- Guintini L., Charton R., Peryresaubes F., Thoma F., 2005. Nucleosome positioning, nucleotide excision repair and photoreactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA repair*. 36: 98-104.
- Guldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J., y Hegemann, J.H. 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research* 24: 25 19-2524.
- Hagman A, Sall T, Compagno C, Piskur J. *Yeast “Make-Accumulate-Consume” Life Strategy Evolved as a Multi-Step Process That Predates the Whole Genome Duplication*. *PLOS ONE* 2013; 8.

“Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia*, usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” M.A.R.E.

- Hansen E C. Practical studies in fermentation being contributions to the life history of microorganisms. E & FN Spon, London, 1896.
- Hirschmann GS, Arias AR. 1990. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 29: 159–172.
- Hockberger, P.E., 2002 A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochemical Photobiology*. 76. 561-579.
- Hollands-Barca I. E., Gómez-Barry H., Miyares Cao C. M. 2003. Modelo biológico para evaluar la acción fotoprotectora de un extracto de cordón umbilical humano. *Revista Cubana de Farmacia*. 37(1):1561-1588.
- Instituto de Investigación y Proyección sobre Ambiente Natural y Sociedad (IARNA). Universidad Rafael Landívar (URL), Guatemala, 2011. Serie Divulgativa No. 14. Arboreto Landivariano. Dirección: Juventino Gálvez. Coordinación operativa: Cesar Castañeda. Asesoría: María Mercedes López Selva. Asistentes técnicos: José Castillo.
- Johnson, L.N., Noble, M.E.B. y Owen, D.J. 1996. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*. 85:149-158.
- S. K. Katiyar, N. J. Korman, H. Mukhtar, and R. Agarwal. 1997. Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(8):556–566.
- Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T 1998. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and *N*-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupfer cells. *Hepatology* 27: 1265-1274.
- Kelly DE, Lamb DC, Kelly SL. Genome-wide generation of yeast gene deletion strains. *Comparative and Functional Genomics* 2001; 2: 236–242.
- Kerr C., 1998. The effects of two UVB radiation-absorbing sunscreens on UV radiation-induced carcinogenesis, suppression of the contact hypersensitivity response and histological changes in the hairless mouse. *Mutation Research* 1998; 422:161–164.
- Konger R.L., Derr-Yellin E., Hojati D., Lutz C., Sundberg J.P. 2016. Comparison of the acute ultraviolet photoresponse in congenic albino hairless C57BL/6J mice relative to outbred SKH1 hairless mice. *Experimental Dermatology*. doi:10.1111/exd.13034
- Konigsberg Fainstein, M., Aguilar-Maldonado B., Bourges R. H., Boveris A., D. Boveris A., Bucio Ortiz L., Buentello Volante B. Radicales libres y estrés oxidativo. 2008. Editorial: El Manual Moderno, S.A. de C.V., ISBN:978-607-448-150-1 Versión electrónica.
- Koshiishi I., Mitani H., Sumita T., Imanari T. 2000. 1,25 Dihydroxyvitamin D3 prevents the conversion of adipose tissue into fibrous tissue in skin exposed to chronic UV irradiation. *Toxicology Applied Pharmacology* 2001;173(2):99-104.
- Kuhn KM, Derisi JL, Brown PO y Sarnow P. 2001. Global and specific translational regulation in the genomic response of *Saccharomyces cerevisiae* to a rapid transfer from a fermentable to a non fermentable carbon source. *Molecular and Cellular Biology* 21;918-927.
- Lancha, J. M. y T. Sempere. 1988. Diccionario de ciencias naturales. Usos y etimologías. Madrid: Siglo Veintiuno de España Editores, SA.

“Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia*, usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” M.A.R.E.

- Lema A. A., 2013. Separación y posible identificación de metabolitos secundarios de la *Jacaranda (Jacaranda mimosifolia)* con fines de aporte a una técnica de análisis químico” Tesis de Grado Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnico de Chimborazo, Facultad de Ciencias. Escuela Bioquímica y Farmacia. Ecuador, 2013.
- MacLean RC, Gudelj I. Resource competition and social conflict in experimental populations of yeast. *Nature* 2006; 441: 498-501.
- Mahabir P. Gupta, Pierre-Alain Carrupt, and Kurt Hostettmann Mewes, H.W., Albermann, K, Bahr, M., Frishman, D., Gleissner, A., Hani, J., Heumann K, Kleine, K., Maielr, A., Oliver, S. G., Pfeiffer, F. Zollner, A. 1997. Overview of the yeast genome, *Nature*. 387:7-65.
- Mahran G.H., EL-Fishawy A.M., Abdel-Monem M., Hilal A.M. 1991. Flavonoid content and certain biological activity of *Jacaranda mimosifolia* D. don growing in Egypt. *Bulletin Pharmacologic* 29:83-86.
- March, J. 1992. *Advanced organic chemistry. Reactions, mechanism and structure*. 4 ed. John Wiley & Sons.
- Martin F., Hay A. E., Quinteros Condoretty V. R., Cressend D., Reist M., 2009. Antioxidant Phenylethanoid Glycosides and a Neolignan from *Jacaranda caucan*. Center for Pharmacognostic Research on Panamanian Flora (CIFLORPAN), College of Pharmacy, University of Panama, Panama. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 852–856.
- Martínez Bailón C., 2012. Efecto quimioprotector del verbascósido en el desarrollo de neoplasias en piel de ratones SKH-1. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Momose e Iwahashi H. 2001. Bioassay of cadmium using a DNA microarray: genoma-wide expression patterns of *Saccharomyces cerevisiae* response to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (10): 2353-2360.
- Martínez, H. 2012. Sociedad Mexicana de Oncología, Comité de tumores de piel y melanoma. <http://www.smeo.org.mx/pacientes/comitetumor.php> consultado en octubre 2013.
- Moradas-Ferreira P y Costa V. 2000. Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death, *Redox Report* 5; 277-285.
- Muñoz F. *Plantas Medicinales y Aromáticas. Estudio, cultivo y procesado*. 1987. Madrid, Ed. Mundi-Prensa, 365 p.
- Nicolas J.P. *Plantes Médicinales des mayas K'iché du Guatemala*. 1999. Paris, Ibis Press, 310p.
- Niembro A., 1990. *Árboles y Arbustos Útiles de México*. Editorial: Limusa p. 109.
- Oh CJ, Kil IS, Park CI, Yang CH, Park JW 2007. Ursolic acid regulates high glucose-induced apoptosis. *Free Radical Research* 41: 638-644.
- Oliver, S.G. 1996. A network approach to the systematic analysis of yeast gene function. *Genome Research* 12:241-242.
- Oliver, S.G. 1997. From gene to screen with yeast. *Nature Reviews Genetics* 7:405-409.

“Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia*, usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” M.A.R.E.

- O.M.S. Radiación ultravioleta [Nota descriptiva no. 271]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2009. Disponible en: <http://www.who.int/bulletin/volumes/87/8/09-030809/es/> consultado en octubre 2013.
- Park M.J. y Bae Young-Seuk. 2013. Fermented *Acanthopanax koreanum* root extract reduces UVB- and H₂O₂-induced senescence in human skin fibroblast cells. *Journal of Microbiology and biotechnology*. 26(7): 1224~1233
- Peres W, Tuñón MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, Gallego JG 2000. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *Journal of Hepatological*. 33: 742-750.
- Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S. 2001. Cooperation and competition in the evolution 545 of ATP-producing pathways. *Science*. 292, 504–507.
- Piñeros CJ. Extractos naturales de plantas medicinales concepto, preparación y usos. Bogotá: Fondo Editorial Universitario, Escuela de Medicina Juan. N. Corpas (FEDICOR); 1988.
- Piskur J, Rozpedowska E, Polakova S, Merico A, Compagno C. 2002 How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetic*. 22(4):183-186.
- Prada-Medina C., Aristizabal Tessmer E. T., Quintero R. N., Serment-Guerrero J., Fuentes J.L., 2016. Survival and SOS response induction in ultraviolet B irradiated *Escherichia coli* cells with defective repair mechanisms. *International Journal of Radiation Biology*. 92(6)321-328.
- Pratt DE, Birac PM 1979. Source of antioxidant activity in soybeans. *Journal of Food Society*. 44: 1720-1722.
- Pronk JT, Steensma HY, Van Dijken JP. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 12:1607-1633.
- Ramiro Gómez J.F., Jiménez Ramírez S.L. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Colección Salud. Editorial Universidad de Antioquia. 2da Edición 2007.Colombia. páginas: 129-131.
- Rios JL, Mañez S, Paya M, Alcaraz MJ 1992. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. *Phytochemistry*. 31: 1947-1950.
- Rothstein, R.J. 1983. One step gene disruption in yeast. *Methods in Enzymology*. 101:202-211.
- Sanchez-Perez Y, Carrasco-Legleu C, Garcia-Guellar C, Hernández-García S, Salcido-Neyoy M, Aleman-Lazarini L, Villa-Trevino S 2005. Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters* 217: 25-32.
- Sarry, J.E. and Gunata, Z. 2004. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chemistry* 87:509–521.
- Scogin R. Anthocyanins of the *Bignoniaceae*. 1980. *Biochemical Systematics and Ecology*. 8:273-276.
- Shih, J.C., Chen, K., Ridd, M.J., 2009. Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annual Review of Neuroscience* 22(1): 197–217.

“Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia*, usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” M.A.R.E.

- Schütz R., Kuratli K., Richard N., Stoll C., Schwager J. 2016. Mitochondrial and glycolytic activity of UV-irradiated human keratinocytes and its stimulation by a *Saccharomyces cerevisiae* autolysate. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 159 :142-148.
- Sigma-Aldrich Co. LLC. 2015. Sigma-Aldrich Products are sold exclusively through Sigma-Aldrich, Inc. Trademarks of Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r0278?lang=es®ion=MX> consultado en: octubre 2015.
- Spichiger, R.-E.; Perret, M.; Figeat, M.; Jeanmonod, D. *Systematic Botany of Flowering Plants: a New Phylogenetic Approach to Angiosperms of the Temperate and Tropical Regions*; Science Publish Enfield, 2004; p 330.
- Sponner S.C., Schaum V., Quitmann H., Czemark P. 2016. *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. Institute of Bioprocess Engineering and Pharmaceutical Technology, University of Applied Sciences Mittelhessen, Giessen, Germany; Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, Giessen, Germany.
- Subramanian S.S., Nagarajan S., Su Lochana N. Flavonoids of eight bignoniaceous plants. *Phytochemistry*. 1972. 11:1499.
- Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L., Zhang, Y., 2011. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Journal of Food Chemistry Toxicology*. 49, 2689–2696.
- Ter Linde JJ, Liang H, Davis RW, Steensma HY, Van Dijken JP y Pronk JT. 1999. Genome-Wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 181; 7409-7413.
- Thomson JM, Gaucher EA, Burgan MF, *et al.* Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Natural Genetics* 2005; 37: 630–635.
- Toro C. Daniel R. 2005. Manual de introducción a la microbiología. Universidad de Caldas, Colombia. Primera edición noviembre 2005. Asociación de Editoriales Universitarias de Colombia. ASEUC. 118p.
- Villareal M.L., Alonso D., Melesio G. (1992) Cytotoxic activity of some Mexican plants used in traditional medicine. *Phytoteraphy*. 63:518-522.
- Vollhardt, K.P.C., Schore, N.E. 2002. *Organic chemistry. Structure and function* 3 ed. W.H. Freeman and Company. U.S.A.
- Wei H., Zhang X., Wang Y., Lebwohl M., 2002. Inhibition of ultraviolet light induced oxidative events in the skin and internal organs hairless mice by isoflavone genistein. *Cancer Letters* 185:21-29.
- Wright T.I., Spencer J.M., Flowers F.P. 2006. Chemoprevention of nonmelanoma skin cancer. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54 (6):993-946.
- Yang ZG, Li HR, Lu SG, Wang J, Daikonya A, Kitanaka S 2007. Triterpenoids from *Hippophae rhamnoides* L. and their nitric oxide production-inhibitory and DPPH radical-scavenging activities. *Chemical Pharmacology Bulletin* 55: 15-18.

“Determinación de las propiedades fotoprotectoras de *Jacaranda mimosifolia*, usando como modelo biológico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” M.A.R.E.

- Yi, L.-T., Li, C.-F., Zhan, X., Cui, C.-C., Xiao, F., Zhou, L.-P., Xie, Y., 2010. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the flavonoid naringenin in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology Biological Psychiatry* 34(7): 1223–1228.
- Yin MC, Chan KC 2007. Nonenzymatic antioxidative and antiglycative effects of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 7177-7181.
- Youdim, M.B.H., Edmondson, D., Tipton, K.F., 2006. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Natural Reviews of Neuroscience*. 7, 295–309.
- Zhang, H.-Y., Yang, D.-P., Tang, G.-Y., 2006. Multipotent antioxidants: from screening to design. *Drug Discovery Today*. 11(15): 749–754.