



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA
AVANZADA**

**Nanoencapsulación de compuestos bioactivos con
actividad antioxidante de *Justicia spicigera* Schldl. (Muicle).**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN TECNOLOGÍA AVANZADA

PRESENTA

OSCAR SAÚL HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

DIRECTORES DE TESIS

DR. MIGUEL ÁNGEL AGUILAR MÉNDEZ

DRA. MARÍA EUGENIA RAMÍREZ ORTIZ

México D.F., Julio de 2015



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **México, D.F.** el día 3 del mes de Julio del año **2015**, el que suscribe **Oscar Saúl Hernández Rodríguez** alumno del Programa de **Maestría en Tecnología Avanzada**, con número de registro B-130710, adscrito al **Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (Unidad Legaria)**, manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Miguel Ángel Aguilar Méndez** y **Dra. María Eugenia Ramírez Ortiz** y cede los derechos del trabajo titulado **Nanoencapsulación de compuestos bioactivos con actividad antioxidante de *Justicia spicigera* Schltdl. (Muicle)**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN. Legaria 649, Col. Irrigación, 11500 México, D.F. Teléfono 01-5557296300 ext. 67769 e-mail **saul.hdz.rdz@gmail.com; maguilarme@ipn.mx**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Oscar Saúl Hernández Rodríguez
Nombre y firma del alumno



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D.F. siendo las 13:00 horas del día 3 del mes de julio del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-IPN para examinar la tesis titulada:
Nanoencapsulación de compuestos bioactivos con actividad antioxidante de *Justicia spicigera* Schlttdl. (Muicle).

Presentada por el alumno:

Hernández Rodríguez Oscar Saúl
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

B	1	3	0	7	1	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA AVANZADA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Miguel Ángel Aguilar Méndez

Dra. María Eugénia Ramírez Ortiz

Dr. Eduardo San Martín Martínez

Dra. Mónica Rosalía Jaime Fonseca

Dra. Rocío Guadalupe Casañas Pimentel

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA
APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

Dr. José Antonio Calderón Arenas

DEL I.P.N.

AGRADECIMIENTOS:

Creyendo en la debilidad de mi memoria o simple despiste, reconozco a todos aquellos que directa o indirectamente contribuyeron a la realización de este proyecto.

Al Dr. Miguel Ángel Aguilar Méndez (Doc.) por su apoyo y confianza desde el servicio social hasta este logro, por su paciencia, sus consejos y sobre todo por enseñarme que entre alumno y asesor puede existir una gran amistad (Recuerde nunca olvidaré que es un dímerno).

A la Dra. María Eugenia por su apoyo y confianza desde LEM I hasta este momento, por su hospitalidad y por permitirme junto con Oli ser compañeros de viajes. A mi hermana académica (Magui), por compartir el tiempo de su mami.

A los Doctores: Eduardo San Martín Martínez, Mónica Rosalía Jaime Fonseca, Rocio Guadalupe Casañas Pimentel y Fernando Trejo Zárraga, por sus valiosas aportaciones para mejorar este trabajo.

Al personal del Laboratorio de Pruebas Físicas, Sr. Miguelito, Isabel y Sr. Javier, agradezco sus atenciones y apoyo brindado.

A mis compañeros del Laboratorio y Amigos: Oli, Nata, Vivi, Silver, Josué, Alicia.

A mis amigos de Servicio Social.

Al personal de CICATA-IPN.

A cada uno de ustedes... Muchas Gracias

DEDICATORIA

A Dios

A mis padres:

María del Rocío Rodríguez Estrada y Bernabé Hernández Vázquez
Porque sin ustedes, simplemente NADA hubiera sido posible, ustedes merecen
todo el crédito.

A mí (amo) hermano favorito

Carlos Daniel Hernández Rodríguez
Por creer en mí e impulsarme a crecer.

A **TODA** mi familia que contribuyó con su granito de arena, para crear los
cimientos de mi vida.

A Oli...por su infinita paciencia...y su valiosa amistad.

A Jokis, Aleks, Eddy, por creer en mí, SERAIAS.

A los, Amig de Dios, porque me han enseñado a forjar mi carácter.

A la memoria de mis abuelos y padres en la fe

Pedro Rodríguez Camacho (2007 †)

Gonzalo Hernández López (2014 †)

David Almazán Guadarrama (2015 †)

*Porque Jehová da la sabiduría,
Y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia.*

Proverbios 2:6

Contenido

Contenido	i
Índice de figuras	v
Índice de tablas	vi
Índice de ecuaciones.....	vi
Lista de abreviaturas:	vii
Resumen:.....	viii
Abstract:	ix
1 Introducción	1
2 Revisión de la literatura	4
2.1 Enfermedades crónico degenerativas.....	4
2.1.1 Estrés oxidativo	4
2.1.2 Radicales Libres	5
2.1.2.1 Origen de los radicales libres.....	6
2.2 Antioxidantes	8
2.2.1 Clasificación.....	9
2.3 Compuestos fenólicos.....	10
2.3.1 Clasificación.....	12
2.3.2 Origen de los compuestos fenólicos.....	13
2.3.3 Mecanismo de acción de los compuestos fenólicos como antioxidantes.....	13
2.4 <i>Justicia spicigera</i> Schltl. (Muicle).	15
2.4.1 Morfología.....	15

2.4.2	Clasificación Taxonómica	16
2.4.3	Distribución geográfica	17
2.4.4	Composición química	18
2.4.5	Información etnobotánica	19
2.5	Extracción	20
2.5.1	Maceración	21
2.5.2	Soxhlet.....	22
2.5.3	Extracción con fluidos supercríticos (EFS)	22
2.5.4	Extracción de fluido a presión (EFP)	23
2.5.5	Extracción asistida por microondas (EAM)	24
2.5.6	Extracción asistida por ultrasonido (EAU)	25
2.6	Condiciones de extracción	28
2.6.1	Disolventes	28
2.6.2	Frecuencia.....	28
2.6.3	Temperatura	29
2.6.4	Tiempo.....	29
2.7	Encapsulación.....	30
2.7.1	Generalidades	30
2.7.2	Encapsulación en la industria alimenticia	30
2.8	Nanoencapsulación.....	31
2.8.1	Nanopartículas biodegradables	32
2.8.2	Métodos de nanoencapsulación de fenoles.....	33
2.8.3	Nanoencapsulación mediante secado por aspersión.	35
2.8.4	Factores que influyen en la nanoencapsulación por aspersión.	36

2.8.5	Liberación controlada	37
2.8.5.1	Mecanismos de liberación.....	38
3	Justificación	39
4	Objetivos.....	41
4.1	Objetivo General	41
4.2	Objetivos Particulares	41
5	Materiales y Métodos.....	42
5.1	Materiales	42
5.1.1	Material biológico.....	42
5.1.2	Reactivos.....	42
5.2	Métodos	43
5.2.1	Preparación de extractos.....	43
5.2.1.1	Acondicionamiento del material vegetal.....	43
5.2.2	Extracción asistida por ultrasonido	43
5.2.3	Perfil fitoquímico	44
5.2.4	Contenido de fenoles totales. Método de Folin-Ciocalteu.....	47
5.2.5	Contenido de flavonoides totales.....	48
5.2.6	Capacidad reductora de hierro. Método FRAP.....	48
5.2.7	Capacidad secuestradora de radicales libres. (DPPH).....	49
5.2.8	Diseño Experimental.....	49
5.2.9	Validación del modelo.....	51
5.2.10	Síntesis de Nanopartículas.....	51
5.2.11	Rendimiento de las nanopartículas.....	52

5.2.12	Caracterización de nanopartículas por microscopía electrónica de barrido (SEM)	52
5.2.13	Evaluación de su liberación controlada.	52
6	Resultados y discusión	54
6.1	Perfil fitoquímico.....	54
6.2	Respuesta de las variables a las condiciones de extracción	55
6.2.1	Análisis del contenido total de flavonoides.	56
6.2.2	Análisis de la superficie de respuesta del contenido total de fenoles.	58
6.2.3	Análisis de la superficie de respuesta de la capacidad reductora de hierro (FRAP).....	60
6.2.4	Análisis de la superficie de respuesta de la capacidad antiradical (DPPH)	61
6.2.5	Análisis de la superficie de respuesta del rendimiento en masa.....	63
6.2.6	Optimización de los parámetros de extracción y validación del modelo.	64
6.3	Nanoencapsulación del extracto óptimo	65
6.3.1	Rendimiento de las nanopartículas.....	65
6.3.2	Morfología y tamaño de partículas.....	66
6.3.3	Liberación controlada del extracto de muicle.....	69
7	Conclusiones	71
8	Recomendaciones	72
9	Bibliografía.....	73
Anexos	87
1.-	Curva de calibración de ácido gálico	87
2.-	Curva de calibración de catequina.....	88

3.- Curva de calibración de trolox	89
4.- Control ácido ascórbico (DPPH)	90
5.- Curva de calibración concentración del extracto del muicle	91
6.- Correlación entre el contenido de fenoles y capacidad reductora de hierro .	92
7.- Correlación entre el contenido de fenoles y la capacidad antiradical (EC ₅₀).	93

Índice de figuras

<i>Figura 1: Factores que favorecen la producción de radicales libres.....</i>	7
<i>Figura 2: Donación de un electrón del antioxidante al radical libre.</i>	8
<i>Figura 3: Clasificación de antioxidantes naturales.....</i>	10
<i>Figura 4: Estructura química del fenol</i>	11
<i>Figura 5: Mecanismos de acción para la actividad antioxidante. (Leopoldini, 2011).....</i>	14
<i>Figura 6: Ejemplar adulto de Justicia spicigera Schltl. (muicle).....</i>	15
<i>Figura 7: Partes que conforman a Justicia spicigera Schltl.</i>	16
<i>Figura 8: Muicle en la República Mexicana e Islas adyacentes, Centroamérica y Estados Unidos</i>	18
<i>Figura 9: Estructura química de la kaempferitrina (de Souza et al. 2009).....</i>	19
<i>Figura 10: Tipos y métodos de extracción</i>	21
<i>Figura 11: Cavitación ultrasónica.....</i>	25
<i>Figura 12: Colapso de las burbujas de cavitación y liberación de los compuestos bioactivos. Chemat y Khan, 2011.....</i>	26
<i>Figura 13: Esquema del fundamento de la EAU.....</i>	27
<i>Figura 14: Nanopartículas biodegradables: nanocápsulas y nanoesferas. Kumari et al., 2010.....</i>	32
<i>Figura 15: Características de compuestos polifenólicos encapsulados por diversos métodos de encapsulación. Fang y Bhandari, 2010.....</i>	34
<i>Figura 16: Protección y liberación del principio activo.</i>	37
<i>Figura 17: Contenido de flavonoides totales en los tratamientos de la EAU de la Justicia spicigera Schltl.</i>	57
<i>Figura 18: Efecto de los parámetros de EAU de Justicia spicigera Schltl. en el contenido fenólico total.....</i>	59
<i>Figura 19: Efecto de los parámetros de EAU Justicia spicigera Schltl. en la capacidad reductora de hierro.</i>	61

<i>Figura 20: Efecto de los parámetros de EAU Justicia spicigera Schltdl. en la capacidad antiradical (EC₅₀ DPPH).....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 21: Efecto de los parámetros de EAU Justicia spicigera Schltdl. en el rendimiento en masa.</i>	<i>64</i>
<i>Figura 22: Micrografía de SEM de nanopartículas de gelatina (sin carga).....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 23: Micrografía de SEM de nanopartículas de gelatina con extracto de muicle.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 24: Histograma de las nanopartículas sin carga.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 25: Histograma de las nanopartículas con carga.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 26: Liberación controlada del extracto de Justicia spicigera Schltdl. (nanopartículas).</i>	<i>69</i>

Índice de tablas

<i>Tabla 1: Los radicales libres celulares más reportados.</i>	<i>7</i>
<i>Tabla 2: Clasificación de los compuestos fenólicos.....</i>	<i>12</i>
<i>Tabla 3: Clasificación taxonómica de Justicia spicigera Schltdl.</i>	<i>17</i>
<i>Tabla 4: Niveles de los factores en el análisis de la superficie de respuesta.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 5: Análisis fitoquímico cualitativo de extractos de Justicia spicigera Schltdl.</i>	<i>54</i>
<i>Tabla 6: Variables de respuesta y condiciones de extracción de Justicia spicigera Schltdl. en la EAU basados en un diseño central compuesto (DCC).....</i>	<i>56</i>

Índice de ecuaciones

<i>Ecuación 1: Porcentaje de inhibición (%) DPPH.....</i>	<i>49</i>
<i>Ecuación 2: Modelo polinomial de segundo orden.</i>	<i>50</i>
<i>Ecuación 3: Rendimiento de las nanopartículas sin carga (control).....</i>	<i>52</i>
<i>Ecuación 4: Rendimiento de las nanopartículas con carga (extracto).....</i>	<i>52</i>
<i>Ecuación 5: La ecuación final en términos reales del contenido total de fenoles.</i>	<i>58</i>
<i>Ecuación 6: La ecuación final en términos reales de la capacidad reductora de hierro.</i>	<i>60</i>
<i>Ecuación 7: La ecuación final en términos reales de la capacidad antiradical.</i>	<i>61</i>
<i>Ecuación 8: La ecuación final en términos reales del rendimiento en masa.</i>	<i>63</i>

Lista de abreviaturas:

ANOVA:	Análisis de la varianza.
CD	Concentración del disolvente
CRH	Capacidad Reductora de Hierro
CTF	Contenido Total de Fenoles
DCC	Diseño Central Compuesto
DPPH:	Llamado así por el reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
EAU	Extracción asistida por Ultrasonido
EC_{50} :	Efecto de reducción del 50% del radical DPPH (Porcentaje de inhibición)
EL	Extracto Liofilizado
ERO:	Especies reactivas de oxígeno
ET	Equivalentes de Trólox
FC:	Folin-Ciocalteu
FRAP:	Capacidad reductora de Hierro/antioxidante, por sus siglas en inglés "Ferric Reducing Antioxidant Power".
MSR	Metodología de superficie de respuesta
NSE	Nanopartículas sin extracto
NCE	Nanopartículas con extracto
OH:	Radical hidroxilo
REDOX:	Reacciones de óxido-reducción
RL:	Radicales libres
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido, por sus siglas en inglés "Scanning Electronic Microscope"
TE	Tiempo de extracción
UV:	Ultravioleta
Vis:	Visible

Resumen:

Numerosas plantas son fuente de compuestos fenólicos que poseen capacidad antioxidante una de ellas es la *Justicia spicigera* Schltldl. por lo que se han ensayado diversos métodos convencionales para su extracción y como una alternativa a estos en el presente trabajo se ha empleado la extracción asistida por ultrasonido (EAU). Para optimizar las condiciones de extracción se empleó la metodología de superficie de respuesta (MSR) utilizando un diseño central compuesto (DCC) teniendo como variables de respuesta al contenido total de fenoles, el contenido de flavonoides totales, la capacidad reductora de hierro, actividad antiradical y el rendimiento en masa, considerándose como variables independientes la concentración del disolvente (agua-etanol) y el tiempo de extracción. Además se realizó un tamizaje fitoquímico del extracto acuoso y etanólico. Los resultados indicaron que las condiciones óptimas de extracción obtenidas por MSR fueron las siguientes: 75% de etanol, 25% de agua y un tiempo de extracción de 18 minutos. En las condiciones óptimas de extracción, el contenido de fenoles totales fue de 172 ± 7 mg EAG/g EL, la capacidad reductora de hierro (FRAP) fue de 780 ± 21 μ M ET/1000 ppm, el valor de EC_{50} fue de 177 ± 8 ppm y el rendimiento en masa fue del 28%. El extracto obtenido en las condiciones óptimas fue nanoencapsulado, mediante la técnica de secado por aspersión obteniendo rendimientos de formación de 84% y 83% de las nanopartículas obtenidas sin extracto (NSE) y con el extracto (NCE) respectivamente. Las nanopartículas presentaron una morfología esférica y una distribución de tamaño uniforme obteniéndose un tamaño de partícula promedio de 526 nm para NSE y de 560 nm para NCE. Por último, se evaluó la liberación controlada del extracto en un lapso de 6 horas obteniendo un incremento de la concentración.

Palabras clave: *Justicia spicigera* Schltldl., extracción asistida por ultrasonido, metodología de superficie de respuesta, compuestos fenólicos, antioxidantes, flavonoides, secado por aspersión y nanopartículas.

Abstract:

Numerous plants are sources of phenolic compounds with antioxidant activity one of them is *Justicia spicigera* Schltdl. some authors have tried various conventional methods for extraction, although as an alternative to these has been employed ultrasound assisted extraction (UAE). To optimize the extraction conditions the response surface methodology (MSR) was employed using a central composite design (CCD). The response variables were the total content of phenols, total content of flavonoids, iron reducing ability, antiradical activity and mass yield, whereas the independent variables were concentration of solvent (water-ethanol) and the extraction time. Also a phytochemical screening was performed to aqueous and ethanol extract. The results indicate that the optimal conditions RSM obtained by extraction were: 75% ethanol, 25% water and an extraction time of 18 minutes. Under the optimal extraction conditions, the total phenol content was 172 ± 7 mg GAE/g LE, the ferric reducing/antioxidant power was 780 ± 21 μ M TE /1000 ppm, the EC_{50} value was 177 ± 8 ppm and the mass yield was 28%. The extract obtained in the optimal conditions was nanoencapsulated using the nanospraydrying technique, obtaining formation yields of 84% and 83% of the nanoparticles obtained without extract (NWTE) and with the extract (NWE) respectively. The nanoparticles showed a spherical morphology and uniform size distribution with a mean particle size of 526 nm and 560 nm for NWTE and NWE respectively. Finally, it was evaluated the controlled release during 6 hours; obtaining an increase of approximately 5 ppm per hour.

Key words: *Justicia spicigera* Schltdl., ultrasonic-assisted extraction, response surface methodology, phenolic compounds, antioxidants, flavonoids, nanospraydrying and nanoparticles.

1 Introducción

Estudios epidemiológicos han indicado que una dieta rica en compuestos fenólicos puede tener efectos preventivos contra diversas enfermedades degenerativas (Halliwell, 2008). Se ha demostrado que los compuestos fenólicos poseen una gran capacidad de capturar radicales libres, los cuales pueden causar el estrés oxidativo y por ende, ayudan en la prevención de enfermedades crónicas degenerativas y algunos tipos de cáncer (Wang y Mazza, 2002; Ishige *et al.*, 2001; Iacopini *et al.*, 2008; Katsube *et al.*, 2003).

La búsqueda de fuentes naturales de compuestos fenólicos de bajo costo, renovables y abundantes está atrayendo el interés en todo el mundo. En México, la medicina herbolaria es ampliamente utilizada, por lo que las plantas representan una fuente extremadamente rica para la obtención de extractos activos mediante los cuales se pueden aislar moléculas que puedan ser precursoras de potenciales compuestos bioactivos (Fabricant, 2001).

Justicia spicigera Schltdl. (Acanthaceae), es una planta endémica de México, conocida comúnmente como muicle o mohuite, es un arbusto de hoja perenne con flores tubulares de color naranja (Ortiz *et al.*, 2012). El muicle se utiliza como inmunoestimulante (Herrera-Arellano *et al.*, 2009), para el tratamiento de cáncer de cuello uterino (Márquez *et al.*, 1999), presión arterial alta, anemia, trastornos menstruales, parásitos intestinales; también combate padecimientos como nervios, insomnio, bronquitis, infecciones renales, desordenes intestinales incluyendo náuseas, diarrea y vómito (Domínguez *et al.*, 1990; García, 2008; Azpeitia, 1996) en cualquiera de los padecimientos, a menudo se utilizan las hojas y las ramas. Sin embargo, la información científica que sustente sus propiedades medicinales es muy escasa.

Los compuestos fenólicos con actividad antioxidante comúnmente se extraen de las plantas (Scherer y Godoy, 2009). La extracción es el paso inicial y más importante en la recuperación y purificación de compuestos bioactivos a partir de materiales vegetales. Muchos factores como la composición del disolvente, la

temperatura de extracción, la relación sólido-líquido, el pH y la presión pueden influir significativamente en la eficiencia de extracción, la actividad antioxidante y el contenido fenólico (Gan y Latiff, *et al.*, 2011; Kiassos *et al.*, 2009).

Métodos convencionales de extracción tales como la maceración, calentamiento, Soxhlet entre otros, se han empleado para extraer compuestos fenólicos de origen vegetal. Sin embargo, las desventajas de éstos métodos incluyen la pérdida de compuestos bioactivos debido a la oxidación, ionización, a la hidrólisis durante la extracción, así como a los largos tiempos de extracción (Li *et al.*, 2005). Por esta razón, se han desarrollado nuevos métodos amigables con el medio ambiente. Estos métodos promueven una disminución en el consumo de disolvente con un aumento en la proporción de extracción (Wang *et al.*, 2008; Wang y Weller, 2006). Entre ellos, la extracción asistida por ultrasonido, es una alternativa simple, eficiente y de bajo costo (Wang *et al.*, 2008; Wang y Weller, 2006; Virost *et al.*, 2010; Rostagno *et al.*, 2003; Rodríguez, *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2009; Salar Bashi *et al.*, 2012). La eficiencia de la extracción asistida por ultrasonido se debe a los efectos producidos por la cavitación acústica en el disolvente cuando la onda ultrasónica pasa a través de él. Este efecto permite una mejor penetración del disolvente en la muestra y en consecuencia el mejoramiento de la transferencia de masa desde las membranas celulares al disolvente (Rostagno *et al.*, 2003; Pan, *et al.*, 2011).

El diseño de experimentos por metodología de superficie de respuesta es menos laboriosa y consume menor tiempo para optimizar un proceso (Lee *et al.*, 2000; Bezerra *et al.*, 2008; Aybastier y Demir, 2010), por ello se considera adecuado para optimizar la extracción de los compuestos fenólicos (Aybastier *et al.*, 2011).

Por otro lado, los compuestos bioactivos con actividad antioxidante son inestables (luz, O₂, concentración etc.) además de que tienen perfiles de absorción limitada, por lo tanto, baja biodisponibilidad y bajas concentraciones en el sitio objetivo de adsorción. En los últimos años se han realizado esfuerzos para incluir moléculas con propiedades antioxidantes en avanzados portadores de carga (matrices biopoliméricas). La cubierta que cubre al agente encapsulado sirve de protección

durante el proceso de almacenamiento, consumo y digestión. Así mismo, se puede controlar el tiempo de dosificación y liberación del activo en una localización específica, incluso permite el enmascaramiento de olores y sabores desagradables. (Fang, 2010).

En este sentido, el objetivo de este trabajo fue optimizar los parámetros de extracción asistida por ultrasonido de las hojas de *Justicia spicigera* Schltdl. en el contenido de fenoles totales, contenido de flavonoides totales, capacidad reductora de hierro y actividad antiradical empleando la metodología de superficie de respuesta mediante un diseño central compuesto (DCC), así como la incorporación del extracto obtenido en las condiciones óptimas a un sistema de nanoencapsulado.

2 Revisión de la literatura

2.1 Enfermedades crónico degenerativas

Las enfermedades crónico degenerativas son enfermedades de larga duración y por lo general de progresión lenta, su evolución suele acompañar al paciente por el resto de su vida (OMS, 2010). La OMS informó en el 2010 que las enfermedades crónicas degenerativas (ECD) se encuentran dentro de las principales causas de mortalidad en el mundo, ocupando un 59.7%. Las ECD son: el Alzheimer, Parkinson, lesión cerebral hipertensiva, distrofia muscular, esclerosis múltiple, cáncer, catarogénesis, degeneración de la retina, fibroplasia retrolental, enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, diabetes mellitus, síndrome metabólico, anomalías cardiovasculares, hipertensión, trastornos nefrológicos, enfisema pulmonar, infarto, artritis reumatoide, anemia, hepatitis, pancreatitis, envejecimiento, enfermedad de Werner (envejecimiento prematuro), la aparición de arrugas prematuras y la resequedad de la piel, disfunción endotelial, dermatitis, entre otras (Uttara, *et al.*, 2009, Roberts y Sindhu, 2009). Todas ellas tienen una relación directa o indirecta en el deterioro celular producido por el estrés oxidativo (Temple, 2000).

Hoy en día, el 25% de los medicamentos comerciales se obtienen a partir de un producto natural y muchos de ellos se han utilizado para el tratamiento de ECD. Por lo tanto, se requieren nuevos fármacos y las plantas siguen siendo el principal reservorio (López-Angulo, *et al.* 2014).

2.1.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo, también referido como un desequilibrio de especies reactivas de oxígeno (ERO) -antioxidante, se produce cuando la cantidad neta de ERO excede la capacidad antioxidante. Por lo tanto, el estrés oxidativo puede ocurrir como consecuencia de un aumento general en la producción de ERO, una

depresión de los sistemas antioxidantes, o ambos (Roberts y Sindhu, 2009; Mayne, 2003).

Las ERO son conocidas por causar varias patologías como las mencionadas en el capítulo 2.1 (Souto, *et al.*, 2013). Las ERO, se forman principalmente en los organismos aerobios por el oxígeno molecular (O_2), que se encuentra en el aire que respiramos. La reducción del O_2 se produce a través de los electrones que escapan de la cadena respiratoria, dando origen al súper oxido (O_2^-), el cual puede dismutar fácilmente y formar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que en presencia de metales de transición como el hierro (Fe^{2+}) y el cobre (Cu^+), produce el radical hidroxilo (OH^-), mediante la reacción de Fenton; el radical hidroxil es considerado la especie oxidante más dañina en los sistemas biológicos y el principal responsable del daño oxidativo (Perl-Treves y Perl, 2002). Con el tiempo, este desajuste en el equilibrio entre los radicales libres y los antioxidantes puede dañar a los tejidos causando enfermedades.

2.1.2 Radicales Libres

Los radicales libres (RL) son moléculas cuyos átomos carecen de un electrón (e^-), o bien tienen electrones libres (es decir, no apareados), lo cual provoca que sean muy reactivos porque toman el electrón que les falta de una molécula vecina provocando así la oxidación de ésta última, que a su vez, al quedarse sin un electrón, se convierte en un radical libre con la capacidad de oxidar a otra molécula cercana, induciendo una reacción en cadena causando el estrés oxidativo. (Benezer-Benezer, *et al.* 2008; Turrens, 2003).

2.1.2.1 Origen de los radicales libres

Los RL se producen normal y continuamente durante el metabolismo celular, que se llevan a cabo principalmente en la mitocondria, por las diversas reacciones redox, realizadas por enzimas como la NADPH oxidasa, lipoxigenasas, cicloxigenasas y peroxidadasas (Adam-Vizi, 2005; Turrens, 2003), existen otras fuentes endógenas de RL como son las oxidaciones microsomales, los fagosomas, la autooxidación de sustratos y los neutrófilos.

Las mitocondrias son los principales lugares para la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las células (Adam-Vizi, 2005), existe evidencia que implica que los efectos mitocondriales desempeñan un papel crucial en la patogenia de estas condiciones por iniciar y promover el estrés oxidativo (Turrens, 2003).

Los RL endógenos, son producidos normalmente en el organismo y juegan un papel importante en la defensa del mismo, contra infecciones por bacterias y virus. También, participan en procesos como la maduración de los reticulocitos y la degradación de proteínas (Benezer-Benezer, *et al.*, 2008; Roche y Romero, 1994). Si bien, la concentración de éstos puede ser controlada por los sistemas antioxidantes endógenos, el problema surge cuando los RL provienen de fuentes exógenas, (Figura 1) tales como el consumo de alimentos con alto contenido de grasa, alimentos procesados, fritos o asados y con conservadores, también por el consumo excesivo de alcohol, la exposición a diversos químicos (pinturas y pegamentos) o contaminantes del medio ambiente (agentes oxidantes que se encuentran en el humo del tabaco, herbicidas, agua clorada, presencia de metales pesados y la exposición a asbestos, entre otros), radiaciones ionizantes (utilizados en radioterapia, los rayos X y la luz UV) y la exposición prolongada a temperaturas elevadas (Nguyen y Donaldson, 2005).

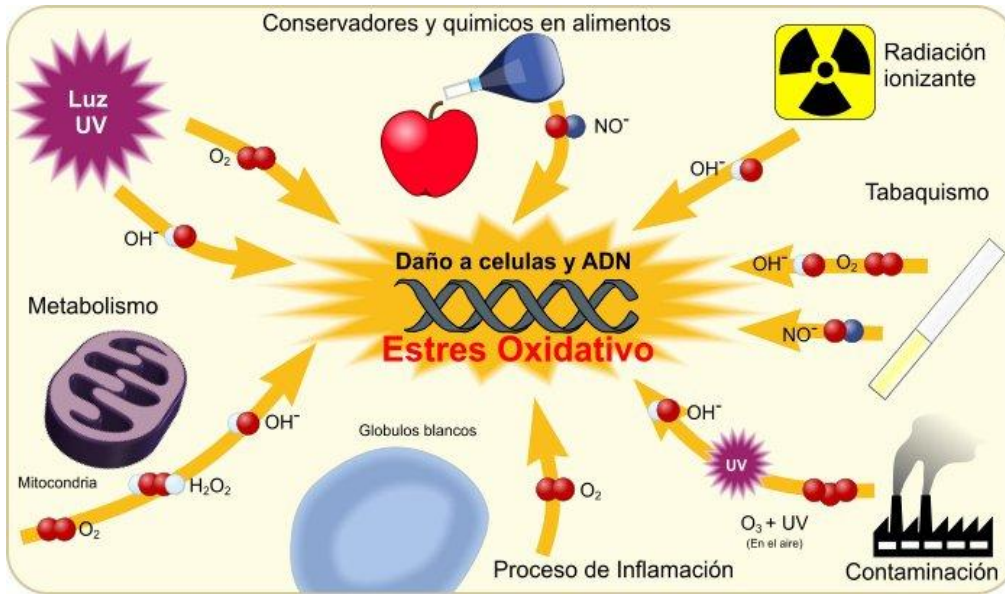


Figura 1: Factores que favorecen la producción de radicales libres.

Fuente: <http://traumaozono.com/estres-oxidativo/>

En la Tabla 1 se presentan a los radicales libres celulares más comunes de acuerdo a Uttara y colaboradores (2009).

Tabla 1: Los radicales libres celulares más reportados.

Oxidante	Descripción
O_2^- Anión superóxido	Estado de reducción de un electrón de O_2 , formado en muchas reacciones de autooxidación y por la cadena de transporte de electrones. Es poco reactivo, pero puede liberar Fe^{2+} de proteínas ferrosulfuradas y de la ferritina. Sufre dismutación para formar H_2O_2 espontáneamente o por catálisis enzimática y es un precursor para la formación del radical hidroxilo catalizado por metales.
H_2O_2 Peróxido de hidrógeno	Estado de reducción de dos electrones, formado por la dismutación de $\bullet O_2^-$ o por reducción directa de O_2 . Soluble en lípidos y por ende capaz de difundir por membranas.
OH^- Radical hidroxilo	Estado de reducción de tres electrones, formado por la reacción de Fenton y la descomposición de peroxinitrito. Extremadamente reactivo, ataca la

	mayoría de los componentes celulares.
$OOONO^-$ Peroxinitrito	Formado en una rápida reacción entre $\bullet O_2^-$ y $NO \bullet$. Liposoluble y similar en reactividad al ácido hipocloroso. Su protonación forma ácido peroxinitroso, que puede someterse a escisión homolítica para formar radicales de hidroxilo y de dióxido de nitrógeno.

(Uttara, *et al.*, 2009)

La ingesta suficiente de una dieta balanceada suplirá al organismo de las cantidades adecuadas de antioxidantes, con lo que, se pueden disminuir los efectos negativos del estrés oxidativo sobre el cuerpo. Por esta razón, los antioxidantes han ganado mayor importancia debido a su potencial como agentes profilácticos y terapéuticos en muchas enfermedades (Souto, *et al.*, 2013; Roberts y Sindhu, 2009).

2.2 Antioxidantes

Benzie y Strain (1996) definieron un antioxidante como: “cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas en comparación con las de un sustrato oxidable, previene significativamente o retrasa la oxidación de dicho sustrato”. Es decir, los antioxidantes son sustancias que contrarrestan los radicales libres y previenen el daño causado por ellos (Figura 2).

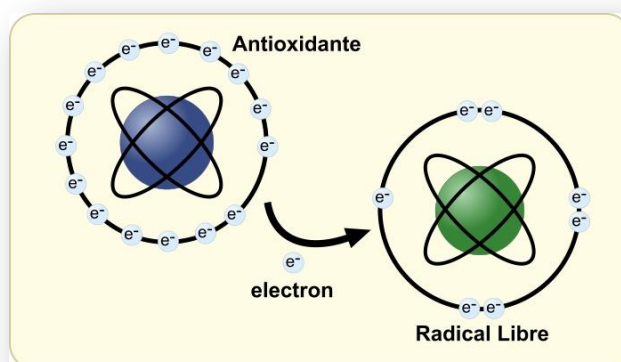


Figura 2: Donación de un electrón del antioxidante al radical libre.

Oroian y Escriche, (2015) definen a los antioxidantes como compuestos o sistemas que pueden interactuar de forma segura con los radicales libres y poner fin a la reacción en cadena antes de que sean dañadas algunas moléculas vitales.

Los mecanismos de acción de los antioxidantes son:

- Secuestrar especies que inicien la peroxidación.
- Quelar iones metálicos de manera que sean incapaces de generar especies reactivas o descomponer los peróxidos.
- Eliminar O_2^- para la prevención en la formación de peróxidos.
- Romper la reacción en cadena autooxidativa.
- Reducir las concentraciones de O_2^- .

2.2.1 Clasificación

Si bien existen diversas formas para clasificar a los antioxidantes, desde una perspectiva de su origen y presencia en el organismo, es posible distinguir entre aquellos antioxidantes que son normalmente bio-sintetizados por el organismo, y aquellos que ingresan a través de la dieta.

Con respecto a su actividad, los antioxidantes se pueden clasificar como enzimáticos o no enzimáticos, de acuerdo a la figura 3.

- El tipo enzimático comprende una clase de antioxidantes que tiene biocatalizadores eficientes y específicos en la naturaleza, desempeñando un papel importante en los seres humanos, porque participan en los procesos celulares metabólicos aumentando la mejora de las tasas de reacciones entre biomoléculas. Ejemplo: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa entre otros (Yin, *et al.*, 2010).
- El tipo no enzimático, como glutatión, ácido úrico, metalotioeína, Co-enzima Q, la dieta también puede contener dichos antioxidantes.

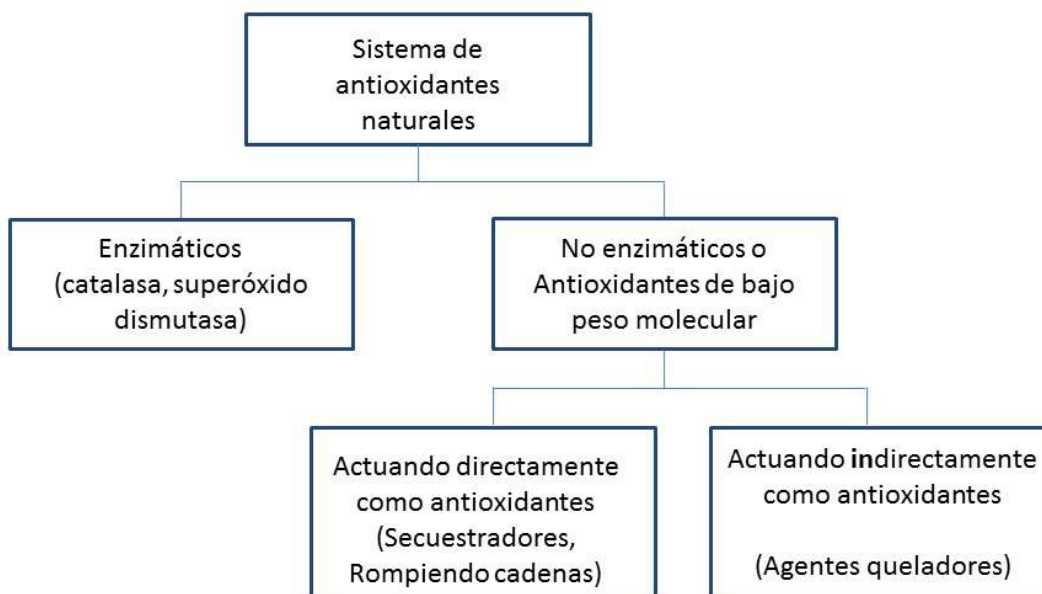


Figura 3: Clasificación de antioxidantes naturales

Los antioxidantes cubren diferentes clases de compuestos que pueden interferir con los ciclos oxidativos para inhibir o retardar el daño oxidativo de las biomoléculas. Las principales clases de compuestos con actividad antioxidante son: vitaminas (vitamina C y vitamina E), carotenoides (carotenos y xantofilas) y polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos y estilbenos) (Oroian y Escriche, 2015).

2.3 Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos son muy abundantes en todos los órganos de la planta y son, por lo tanto, una parte integral de la dieta humana. Se han reportado más de 8.000 estructuras fenólicas y se han encontrado muy dispersos por todo el reino plantae. Los fenólicos van desde compuestos simples, de bajo peso molecular, de compuestos anillos aromáticos individuales a los grandes complejos taninos y polifenoles derivados (Oroian y Escriche, 2015).

Para comprender la estructura química de los compuestos fenólicos es importante comenzar con el fenol, que es la molécula básica (figura 4). El fenol se compone de un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo (OH^-). Los fenoles son en muchos aspectos similares a los alcoholes alifáticos de estructuras donde el grupo hidroxilo está unido a una cadena de carbonos. La presencia del anillo aromático hace que los fenoles tengan un comportamiento como los ácidos débiles, generando un efecto inductivo en el hidrógeno del grupo hidroxilo. El anillo aromático (benceno) juega un papel importante en las propiedades antioxidantes. (Vermerris y Nicholson, 2008)

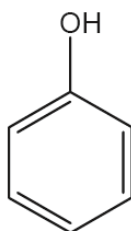


Figura 4: Estructura química del fenol

Los polifenoles son compuestos que tienen más de un grupo hidroxilo unido a uno o más anillos de benceno. Los compuestos fenólicos son característicos de las plantas y se encuentran generalmente como un grupo de ésteres o glucósidos en lugar de como compuestos libres. Es importante considerarlo si se quiere hacer la extracción de estos compuestos de los tejidos vegetales (Vermerris y Nicholson, 2008).

2.3.1 Clasificación

Los compuestos fenólicos abarcan un grupo muy grande y diverso de compuestos químicos. Estos compuestos pueden clasificarse en diferentes maneras. Harborne y Simmonds (1964) clasificaron estos compuestos basados en el número de carbonos que posee cada molécula (Tabla 2).

Tabla 2: Clasificación de los compuestos fenólicos.

ESTRUCTURA	NOMBRE
C_6	Fenoles simples
$C_6 - C_1$	Fenoles ácidos
$C_6 - C_2$	Acetofenonas y Ácidos fenilacéticos
$C_6 - C_3$	Ácidos cinámicos
$C_6 - C_3$	Cumarinas, isocumarinas y cromonas
C_{15}	Chalconas, auronas, dihidrochalconas
C_{15}	Flavanos
C_{15}	Flavonas
C_{15}	Flavanonas
C_{15}	Flavonoles
C_{15}	Antocianidinas
C_{15}	Antocianinas
C_{30}	Biflavoniles
$C_6 - C_1 - C_6$	Benzofenonas, Xantonas, Estilbenos
$C_6 - C_{10} - C_{14}$	Quinonas
C_{18}	Betacianinas
Lignan	Dímeros o Oligómeros
Lignina	Polímeros
Taninos	Oligómeros o Polímeros
Flobafenos	Polímeros

(Vermerris y Nicholson, 2008).

2.3.2 Origen de los compuestos fenólicos

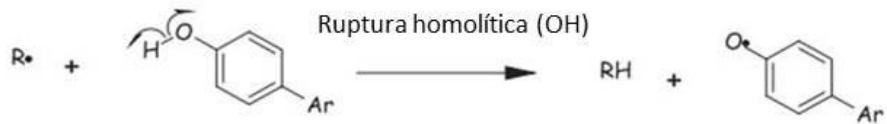
Todos los carbohidratos de la planta se derivan de la fotosíntesis, el proceso durante el cual el CO₂ de la atmósfera se fija y se convierte en carbohidratos con ayuda de la energía de la luz. Los hidratos de carbono que se generan durante la fotosíntesis forman los bloques de construcción para todos los demás compuestos a base de carbono en la célula, incluyendo los compuestos fenólicos. Los precursores para los compuestos fenólicos vegetales se derivan a partir de dos procesos catabólicos en la célula de la planta: la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato. Para información detallada y antecedentes sobre el metabolismo de los hidratos de carbono, por favor refiérase a Vermerris y Nicholson, 2008.

Los compuestos fenólicos y polifenólicos son metabolitos secundarios que se producen en las plantas y son sintetizados por las vías del ácido shikímico, policétidos y mevalonato o vías mixtas, que producen la gran variedad de los fenoles vegetales. (Oroian y Escriche, 2015).

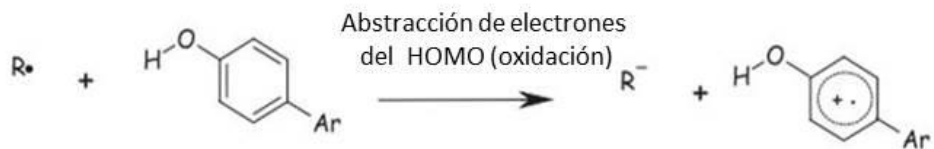
2.3.3 Mecanismo de acción de los compuestos fenólicos como antioxidantes.

El mecanismo para la actividad antioxidante de los polifenoles ha sido propuesto por Leopoldini *et al.*, (2011). En primer lugar, la molécula de polifenol inactiva los radicales libres de acuerdo a la transferencia de átomo de hidrógeno y a los mecanismos de transferencia de electrones individuales (figura 5).

1.- Transferencia de un átomo de hidrógeno



2.- Transferencia de un solo electrón



3.- Quelación de metales en transición

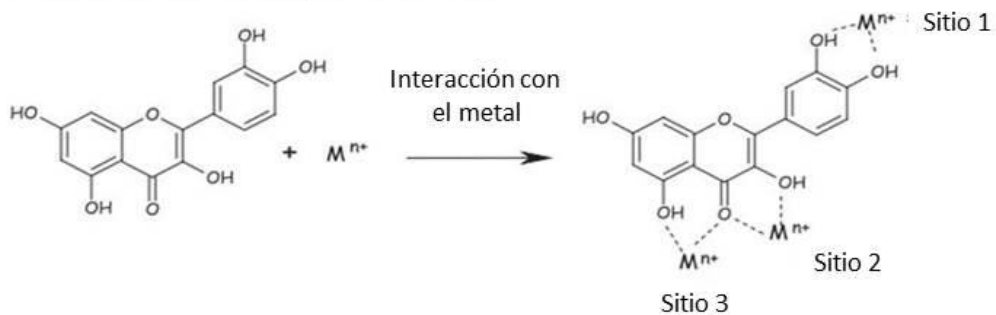


Figura 5: Mecanismos de acción para la actividad antioxidante. (Leopoldini, 2011)

Los compuestos fenólicos con actividad antioxidante interfieren con la oxidación de los lípidos por la rápida donación de un átomo de hidrógeno a los radicales de los lípidos (Shahidi y Wanasundara, 1992).

Las plantas (frutas, verduras, hierbas o plantas) pueden contener una amplia variedad de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides, quinonas, cumarinas, lignanos, estilbenos, taninos, etc.). Por lo que es importante encontrar nuevas fuentes naturales de compuestos bioactivos con actividad antioxidante.

2.4 *Justicia spicigera* Schltl. (Muicle).

El muicle (figura 6) es una planta endémica de Mesoamérica. (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). El nombre náhuatl es “mohuitli” y se tienen de él datos que señalan su uso por los pobladores prehispánicos en las siguientes formas:

- Como planta medicinal.
- Empleado en la gastronomía de algunas regiones.
- Como colorante, en el teñido de sus telas.



**Figura 6: Ejemplar adulto de *Justicia spicigera* Schltl. (muicle).
(Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009)**

2.4.1 Morfología

Planta que se encuentra como arbusto de 1 a 5 m de altura, ramificado, sus hojas son largas y vellosas. Las flores de 3 a 3.5 cm se encuentran en la parte apical de la planta, comúnmente de color anaranjado, pero algunas veces rojo pálido en forma de tubos que terminan rasgándose, formándose un labio. Los frutos son capsulares ovoides con 2 a 4 semillas (figura 7) (Martínez, 1992; Cevallos y Sergio, 1998).



Figura 7: Partes que conforman a *Justicia spicigera* Schlttdl.

- a) Floración de vástago,
- b) base de la flor, con brácteas y cáliz,
- c) Punta de hoja del labio inferior,
- d) Estambres,
- e) Pistilos.

2.4.2 Clasificación Taxonómica

El muicle (*Justicia spicigera* Schlttdl.) (Instituto de biología, 2010) es una planta medicinal integrante de la familia de las acantáceas. La clasificación actual (Acanthaceae), familia que reúne 256 géneros y 2770 especies de zonas tropicales y subtropicales; comprende 36 géneros y 28 especies (Tabla 3) (USDA, 2013)

Tabla 3: Clasificación taxonómica de *Justicia spicigera* Schltld.

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Scrophulariales
Familia	Acanthaceae
Género	<i>Justicia</i>
Especie	<i>spicigera</i>
Nombre Científico	<i>Justicia spicigera</i> Schltld.

Fuente: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PV525864>

2.4.3 Distribución geográfica

El muicle (*Justicia spicigera* Schltld.) (figura 8) es una planta originaria de México, que crece en los estados de Chiapas, Nayarit, San Luís Potosí, Valle de México, Veracruz, Guerrero, Puebla, Morelos, Tlaxcala, Yucatán e Hidalgo (Hersch M., 1997; Martínez, 1996), aunque actualmente también se le puede encontrar en otras partes de Centro y Norteamérica (Discover Life, 2013).

Se encuentra presente en diferentes tipos de climas (cálido, seco y templado), desde el nivel del mar hasta los 3000 m. Cultivada en huertos familiares, crece a orillas de caminos, y de igual forma crece en matorrales y bosques (Monroy y Castillo, 2007).



Figura 8: Muicle en la República Mexicana e Islas adyacentes, Centroamérica y Estados Unidos

Fuente: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Justicia+spicigera&flags=col2>:

2.4.4 Composición química

Se conoce muy poco acerca del contenido metabólico de *Justicia spicigera* Schltld. Euler y Alam (1982) aislaron el flavonoide kaempferitrina (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**); por otro lado Domínguez *et al.* (1990) aislaron el glucósido de 3- β -o-sitosterol, alantoína y criptoxantina. Hasta la fecha, a ninguno de los metabolitos aislados de esta especie se le puede adjudicar alguna de las múltiples propiedades terapéuticas, sin embargo, se infiere la presencia de grandes concentraciones de polifenoles como flavonoides o antocianinas que pueden ser responsables de las propiedades antioxidantes atribuidas a esta especie.

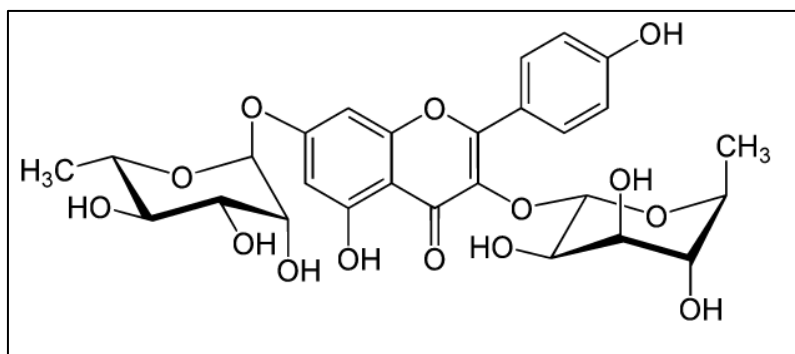


Figura 9: Estructura química de la kaempferitrina (de Souza *et al.* 2009)

2.4.5 Información etnobotánica

El muicle provee algunos de los colorantes naturales usados extensamente en la tradición popular. De él se logra obtener el rosa mexicano, el violeta y el azul, los cuales se emplean en diferentes regiones de México. Además, es una planta utilizada por algunas etnias de México para atender problemas de la sangre como es la anemia, mala circulación, presión arterial, problemas de la piel como pueden ser erupciones, varices, granos, llagas, manchas, mezquinos, verrugas, en el sistema urinario: infecciones y dolor renal, así como aclarar orina, también se ha utilizado para tratar la erisipela, sífilis, epilepsia, apoplejía; como tónico sanguíneo, estimulante, antidisentérico, antipirético, antiespasmódico, antiinflamatorio, para aliviar trastornos menstruales, nervios, insomnio, bronquitis, desordenes intestinales incluyendo náuseas, diarrea y vómito, para tratar el cáncer. Cabe mencionar que para cualquiera de los padecimientos mencionados anteriormente se utiliza a menudo las hojas y las ramas (Azpeitia, 1996; Domínguez *et al.* 1990; Alonso *et al.* 2011).

Dada la importancia etnobotánica del muicle, se buscan métodos eficientes, económicos y favorables al ambiente, para la extracción de sus metabolitos secundarios, sin que estos métodos afecten en la disponibilidad y eficiencia de dichas sustancias. La extracción es el paso inicial en el aislamiento de componentes bioactivos a partir de materiales vegetales, el objetivo es obtener la

máxima concentración de compuestos y la mayor actividad antioxidante de los extractos (Spigno *et al.*, 2007). Las plantas aromáticas y medicinales poseen muchos compuestos bioactivos, que pueden ser de estructura polifenólica, y que presentan actividad antioxidante. Existe un gran número de grupos de investigación que estudian la identificación de los compuestos activos de este grupo de materiales por su interés para aplicaciones alimentarias, cosméticas y farmacéuticas. (Dimitrios, 2006; Embuscado, 2015; Oroian y Escriche, 2015)

2.5 Extracción

La extracción de compuestos fenólicos es una tarea difícil principalmente debido a dos razones; la primera es que pueden estar dentro del tejido vegetal unido con azúcares, proteínas o pueden crear derivados polimerizados que poseen distinta solubilidad, sus estructuras químicas y las interacciones con otros componentes de la matriz alimentaria es difícil de entender. En segundo lugar, son altamente susceptibles a la oxidación, la luz, la temperatura alta y ambiente alcalino y por lo tanto el desarrollo de un proceso de extracción adecuado es una tarea difícil. Durante la extracción, los disolventes se difunden en el material vegetal sólido y solubilizan los compuestos con polaridad similar. (Ncube *et al.*, 2008). Existen dos tipos de extracción la extracción líquido-líquido y sólido-líquido. Sin embargo las extracciones sólido-liquido son los procesos más utilizados para extraer los polifenoles y compuestos fenólicos simples en plantas naturales (Gadkari y Balaraman, 2015).

Los métodos generales de extracción (figura 10) incluyen maceración, maceración dinámica, en frío o en calor, método Soxhlet, la extracción con fluidos supercríticos, extracción de fluido a presión, extracción asistida por microondas, y, la extracción asistida por ultrasonido (Stalikas, 2007).

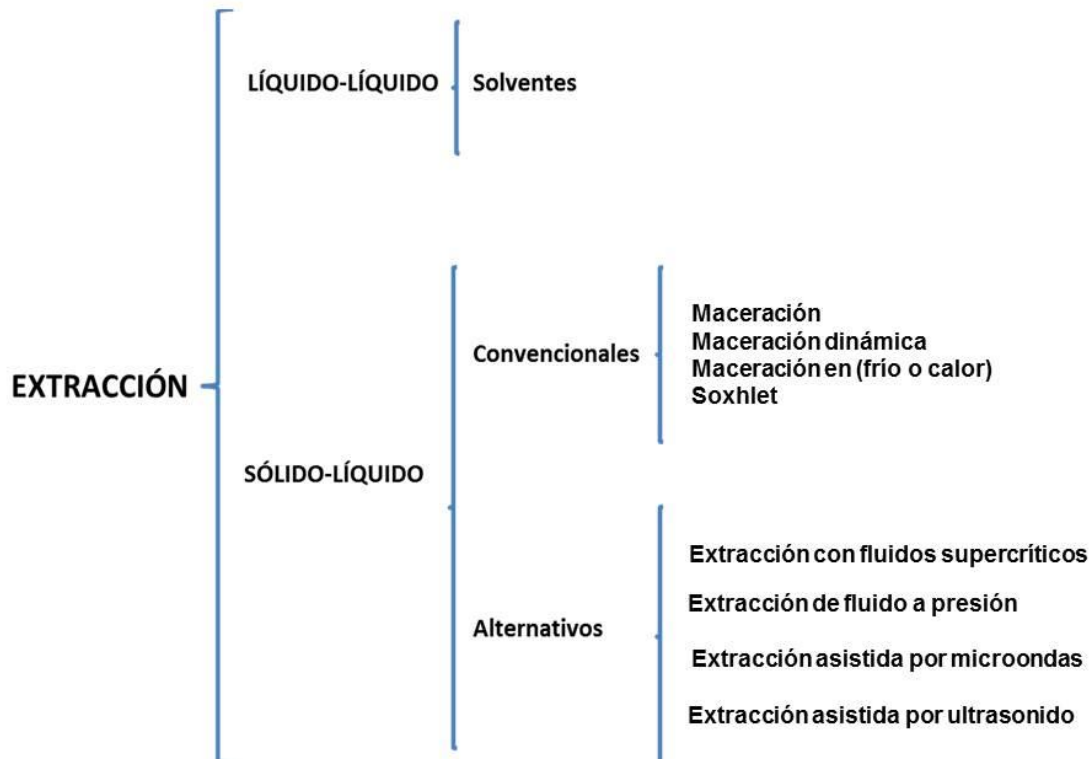


Figura 10: Tipos y métodos de extracción

2.5.1 Maceración

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción, que son los que se pretende extraer. El proceso de maceración genera dos productos (residuo y sobrenadante) que pueden ser empleados dependiendo de las necesidades de uso. Existen dos métodos de maceración de acuerdo a la temperatura, caliente y en frío. La maceración, consiste en poner en contacto la muestra y el disolvente durante un tiempo determinado dando como resultado un equilibrio de concentración entre la muestra y el disolvente. Este proceso depende de la naturaleza del extracto, tamaño de partícula, contenido de humedad, y/o selectividad o cantidad de disolvente; una variación de esta, es la maceración

dinámica que consiste en dejar la muestra en contacto con el disolvente durante un determinado tiempo, con ayuda de algunas fuerzas externas tales como la agitación, la cual mejora la tasa de extracción de compuestos fenólicos de las matrices vegetales (Stalikas, 2007) utilizando agitación constante (Sharapin, 2000). Sin embargo, la maceración posee algunas desventajas como el consumo excesivo de tiempo, por ende de energía, empleo de grandes volúmenes de disolventes peligrosos, jornadas de trabajo intensas y etapas de concentración prolongadas (Siqueira *et al.* 2011).

2.5.2 Soxhlet

La extracción con Soxhlet, usada durante décadas, es una técnica estándar y utilizada como referencia para evaluar los resultados de otros métodos de extracción sólido-líquido. Es una técnica general y bien establecida que supera los resultados de otras técnicas convencionales, aunque tiene un campo limitado en la extracción de compuestos termolábiles (Luque de Castro y García-Ayuso, 1998).

La extracción convencional puede llevarse a cabo en un aparato Soxhlet. La extracción con el disolvente orgánico implica menor selectividad, el tratamiento implica temperaturas altas, el uso de una gran cantidad de disolventes que puedan conducir a la pérdida o disminución de la actividad de los compuestos fenólicos.

2.5.3 Extracción con fluidos supercríticos (EFS)

En la extracción con fluidos supercríticos (EFS), el agente de extracción está en su estado supercrítico, lo que significa que tanto la presión y la temperatura están por encima de sus valores críticos. Los fluidos supercríticos tienen propiedades únicas, intermedias entre las de un gas y un líquido, que dependen de la presión, temperatura y composición del fluido. En particular, su viscosidad es inferior a la de los líquidos, y los coeficientes de difusión son más altos, permitiendo

extracciones más eficientes. Además, la densidad (y por lo tanto el poder disolvente del fluido) se pueden ajustar variando tanto la presión como la temperatura, proporcionando la oportunidad de realizar teóricamente extracciones altamente selectivas (Camel, 2001).

Los fluidos supercríticos exhiben propiedades de transporte deseables que mejoran su adaptabilidad como disolventes para procesos de extracción. La eficacia de la extracción de compuestos polares con CO₂ se puede mejorar mediante la adición de pequeñas cantidades de disolventes orgánicos polares utilizados como modificadores. El fluido supercrítico más empleado es el CO₂ el cual no es tóxico, no es inflamable, y requiere una cantidad mínima de disolvente. La extracción es rápida (10-60 min), selectiva, no requiere de limpieza adicional y puede llevarse a cabo con pequeñas cantidades de muestra (Oroian y Escriche, 2011).

Un sistema típico EFS consiste en una bomba de alta presión que suministra el fluido y una celda de extracción que contiene la muestra y que se mantiene a la presión y la temperatura correcta.

2.5.4 Extracción de fluido a presión (EFP)

La extracción de fluido a presión (EFP), también es conocida como la extracción de líquido a presión (ELP) o extracción con disolvente a presión (EDP) es un proceso de extracción sólido-líquido que emplea disolventes orgánicos a una temperatura elevada (por lo general entre 50 y 200 °C) y una presión alta (entre 10 y 15 MPa) (Piñeiro *et al.*, 2004). Estas extracciones se llevan a cabo bajo presión para mantener el disolvente en su estado líquido incluso a temperaturas por encima del punto de ebullición. Así, se mejora la eficiencia del proceso de extracción. Es bien conocido que las temperaturas elevadas aumentan la solubilidad, la velocidad de difusión, la transferencia de masa y la capacidad del disolvente para interrumpir la interacción analito-matriz. La EFP permite

extracciones rápidas debido a la mayor solubilidad, mejora las tasas de transferencia de masa, incrementa la permeabilidad celular, mejora la desorción y provee mayores tasas de difusión; la extracción se lleva a cabo en pocos minutos, y permite el aumento de la difusión de metabolitos secundarios, de acuerdo a los cambios en las transiciones de fase (Brachet *et al*, 2001; Camel, 2001).

2.5.5 Extracción asistida por microondas (EAM)

La energía de microondas es una radiación no ionizante (frecuencia, 300-300 000 MHz) que causa el movimiento molecular por la migración de los iones y la rotación de los dipolos. La rotación dipolo se refiere a la alineación, debido al campo eléctrico, de moléculas que tienen cualquiera de los momentos dipolares permanentes o inducidos en tanto el disolvente y muestras. Como la intensidad del campo disminuye, el trastorno térmico se restaura lo que resulta en la liberación de energía térmica (Camel, 2001; Barriada-Pereira, *et al.*, 2003)

La extracción asistida por microondas (EAM) utiliza la radiación de microondas como fuente de calentamiento de la muestra y del disolvente. Debido a los efectos particulares de microondas en la materia (es decir, la rotación dipolo y la conductancia iónica), el calentamiento con microondas es instantáneo y se produce en el corazón de la muestra, dando lugar a extracciones muy rápidas. Las microondas calientan directamente el disolvente o mezcla de disolventes, acelerando así la velocidad de calentamiento. Además de la ventaja de una alta velocidad de extracción, la EAM también permite una reducción significativa en el consumo de disolvente orgánico para la extracción (Eskilsson y Björklund, 2000).

Los resultados obtenidos hasta la fecha han concluido que la radiación de microondas no causa la degradación de los compuestos extraídos, a menos que sea generada una temperatura demasiado elevada en la muestra (Barriada-Pereira, *et al.*, 2003).

2.5.6 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

El fundamento de la extracción asistida por ultrasonido (EAU) es el fenómeno de cavitación (figura 11), en el que las ondas de ultrasonido atraviesan el medio líquido que genera pequeñas burbujas de cavitación llenas de vacío en su interior, las cuales son responsables del efecto ultrasónico. De hecho estas burbujas de cavitación son capaces de crecer durante las fases de expansión y disminuir de tamaño durante los ciclos de compresión. Cuando el tamaño de estas burbujas alcanza un punto crítico se colapsan durante un ciclo de compresión y liberan grandes cantidades de energía. Existe un aumento de la temperatura local y la presión que facilitan una mayor circulación del disolvente, una penetración más profunda del disolvente dentro del material celular y la transferencia de masa mejorada, aumentando así la tasa de extracción (Rao y Rathod, 2015; Chemat *et al.*, 2011).

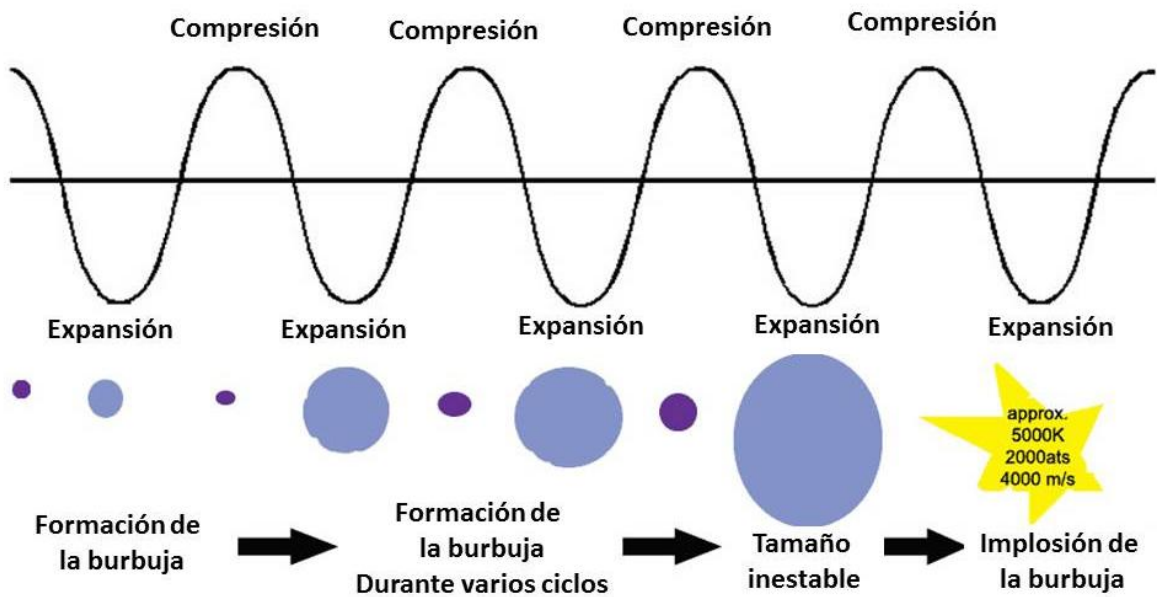


Figura 11: Cavitación ultrasónica.

Cuando estas burbujas se colapsan sobre la superficie de un material sólido, la presión alta y la temperatura liberados generan microjets dirigidos hacia la superficie sólida. Como se muestra en la figura 12, una burbuja de cavitación puede ser generada cerca de la superficie del material de la planta (a), a continuación, durante un ciclo de compresión, se crea este colapso de la burbuja (b) y un microjet dirigido hacia la matriz de la planta (b y c). La alta presión y temperatura que participan en este proceso destruyen las paredes de las células de la matriz de la planta y su contenido puede ser liberado en el medio (d) (figura 13).

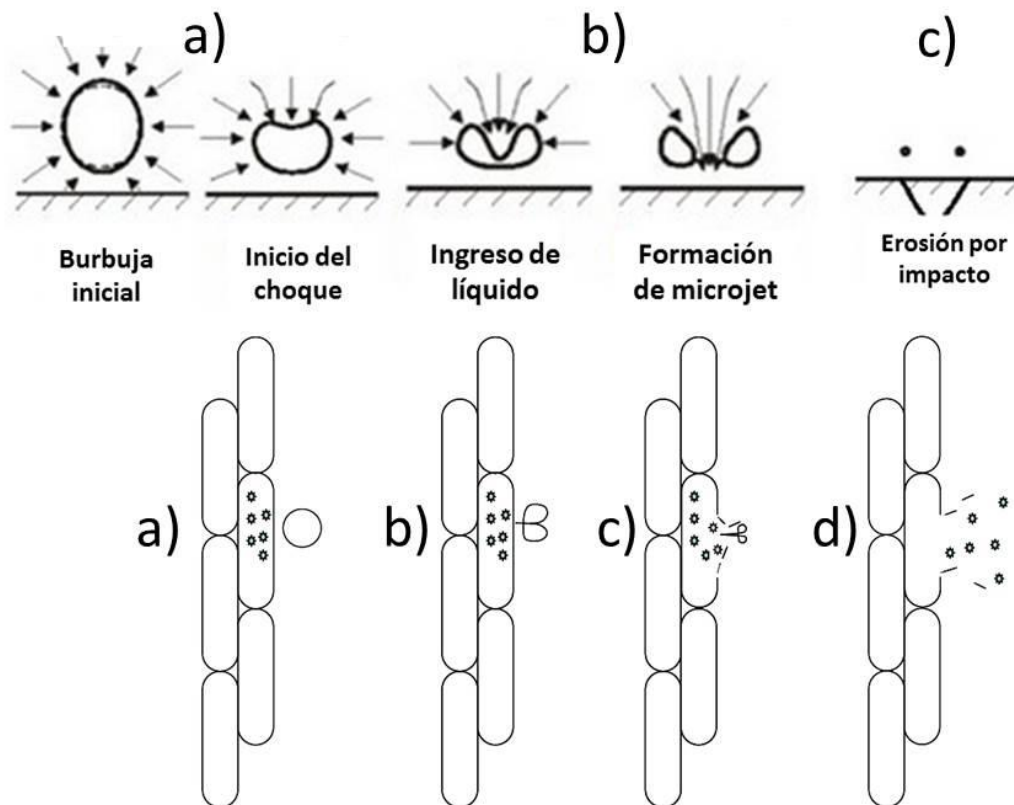


Figura 12: Colapso de las burbujas de cavitación y liberación de los compuestos bioactivos. Chemat y Khan, 2011.

Los principales beneficios de EAU son que aumenta el rendimiento, el aparato es fácil y simple de operar y ayuda en la fácil extracción de compuestos termolábiles,

sin ninguna degradación, también hay una considerable reducción en el tiempo de extracción (Wang *et al.*, 2013).

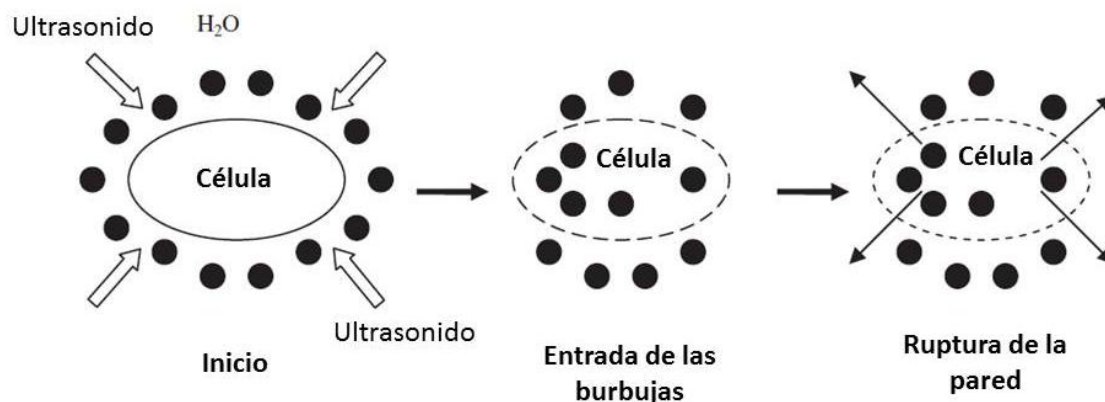


Figura 13: Esquema del fundamento de la EAU

En la extracción asistida por ultrasonido se puede utilizar cualquier disolvente para la extracción de una amplia variedad de compuestos naturales (Wang y Weller, 2006). En esta técnica, la muestra se mezcla con un disolvente y se coloca en el baño ultrasónico a una temperatura y tiempo específicos (Klejdus *et al.*, 2009). La EAU puede llevarse a cabo a temperaturas más bajas, evitando el daño térmico a los extractos y la pérdida de componentes volátiles en ebullición, además de ser amigable con el medio ambiente (Oroian y Escriche, 2011).

Existen dos diseños generales de extractores asistidos por ultrasonidos los baños ultrasónicos o los extractores cerrados provistos de un transductor de ultrasonido. (Mason *et al.*, 1996).

2.6 Condiciones de extracción

Factores tales como el pH, la temperatura, la relación sólido/líquido, los disolventes, el número y los intervalos de tiempo de las etapas de extracción individuales desempeñan un papel importante en el proceso de extracción.

2.6.1 Disolventes

Los disolventes de extracción más utilizados comúnmente para la obtención de compuestos fenólicos son alcoholes (metanol y etanol), acetona, éter dietílico, y acetato de etilo. Sin embargo, los ácidos fenólicos muy polares (ácidos benzoico y cinámico) no pueden extraerse completamente con disolventes orgánicos puros, y se recomiendan mezclas de alcohol-agua o agua-acetona. Los disolventes apolares como (diclorometano, cloroformo, hexano y benceno) son adecuados para la extracción de compuestos no polares (ceras, aceites, esteroides y clorofila) de la matriz de la planta (Stalikas, 2007). Los flavonoides son compuestos polares, y solubilizan en disolventes orgánicos polares tales como etanol, metanol, agua y acetona.

2.6.2 Frecuencia

Altemimi *et al.*, 2015 indican que el funcionamiento de los equipos ultrasónicos con frecuencia (37kHz) son más eficaces que los que poseen una frecuencia de (80kHz) en cuanto a rendimiento de la extracción. Es decir que el aumento de frecuencia ultrasónica tuvo un efecto importante en el rendimiento de la extracción por la disminución de la intensidad de cavitación en los líquidos.

2.6.3 Temperatura

Chan *et al.* (2011) informó de que el rendimiento de compuestos fenólicos aumenta cuando la temperatura aumentó de 40 a 70 °C. Teh y Birch (2014) también encontraron que el rendimiento se incrementó cuando la temperatura se elevó de 40 a 50 °C. Sin embargo, a los 60 °C, el rendimiento de extracción en los extractos de la torta de lino y de las semillas de canola se redujo, mientras que los flavonoides totales disminuyeron a 70 °C en torta de semillas de cáñamo. Por lo que en este estudio se sugiere emplear la temperatura ambiente.

2.6.4 Tiempo

Chen *et al.*, (2015) reportó un aumento en el contenido fenólico total al incrementar el tiempo de extracción hasta un límite (70 min) después hubo una disminución significativa en el contenido de fenoles totales.

2.7 Encapsulación

2.7.1 Generalidades

La encapsulación es un proceso o técnica en la cual un compuesto bioactivo es encapsulado por un biopolímero (Nedovic *et al.*, 2011). Sirve para atrapar agentes activos dentro de un material de soporte y es una herramienta útil para mejorar la entrega de moléculas bioactivas y células vivas en los alimentos. Los materiales utilizados para el diseño de la capa protectora de encapsulados deben ser de grado alimenticio, biodegradable y capaz de formar una barrera entre la fase interna y su entorno. Entre todos los materiales, el más ampliamente utilizado para la encapsulación en aplicaciones alimentarias son los polisacáridos. Las proteínas y los lípidos también son apropiadas para la encapsulación (Nedovic *et al.*, 2011).

Una de las razones más importantes para la encapsulación de ingredientes activos es el de proporcionar una mejor estabilidad en los productos finales y durante el procesamiento. Además, la encapsulación se utiliza para enmascarar los sabores desagradables durante la comida, tales como sabor amargo y la astringencia de los polifenoles (Nedovic *et al.*, 2011).

La encapsulación tiene como objetivo proteger al agente encapsulado del medio al cual se expone, como el pH, temperatura, sales, oxidación, entre otros. También la cubierta que cubre al agente encapsulado sirve de protección durante el proceso de almacenamiento, consumo y digestión. Asimismo, se puede controlar el tiempo de dosificación y liberación del activo en una localización específica.

2.7.2 Encapsulación en la industria alimenticia

La industria alimenticia aplica la encapsulación por numerosas razones.

1. Protección del producto del medio ambiente que lo rodea (temperatura, humedad,

2. Para disminuir la tasa de evaporación de encapsulado al ambiente externo.
3. Para promover fácilmente el manejo del material encapsulado para:
 - ✓ radiación UV, la interacción con otros materiales).
 - ✓ Prevenir grumos
4. Colocar el material encapsulado más uniformemente a través de una mezcla obteniendo un tamaño y superficie externa como el residuo de los materiales en la mezcla
5. Convertir un líquido en sólido
6. Promover fácilmente la mezcla del material encapsulado propio hasta los estímulos correctos
7. Para controlar la liberación del material encapsulado en orden de alcanzar el retraso
8. Para envolver o cubrir el sabor y olor de los materiales encapsulados

La utilización de polifenoles encapsulados en lugar de compuestos libres puede superar los inconvenientes de su inestabilidad, aliviar los gustos o sabores desagradables, así como mejorar la biodisponibilidad y la vida media del compuesto *in vivo* e *in vitro* (López-Rubio *et al.*, 2006).

2.8 Nanoencapsulación

La nanotecnología es considerada por muchos como el siguiente paso en la ciencia, la integración de la ingeniería con la biología, la química y la física. La escala nano consiste en la materia a escala atómica y molecular en dimensiones entre 1 y 1000 nm. Las nanopartículas son químicamente muy activas, en parte, debido a su gran área de superficie proporcional a su volumen. (Kovacic y Somanathan, 2013). Muchas innovaciones médicas, administración y liberación controlada de fármacos, nanoterapéuticos y formulaciones nanofase están en ensayos clínicos. (Kovacic y Somanathan, 2013).

2.8.1 Nanopartículas biodegradables

Una nanocápsula se entenderá como una estructura morfológica compuesta por dos elementos claramente diferenciados, el núcleo y un armazón polimérico que envuelve al primero está cubierta proporciona estabilidad del material encapsulado así como de protección al medio al cual es expuesto, mientras que en la nanoesfera se carece de un núcleo (figura 14) (Kumari *et al.*, 2010).

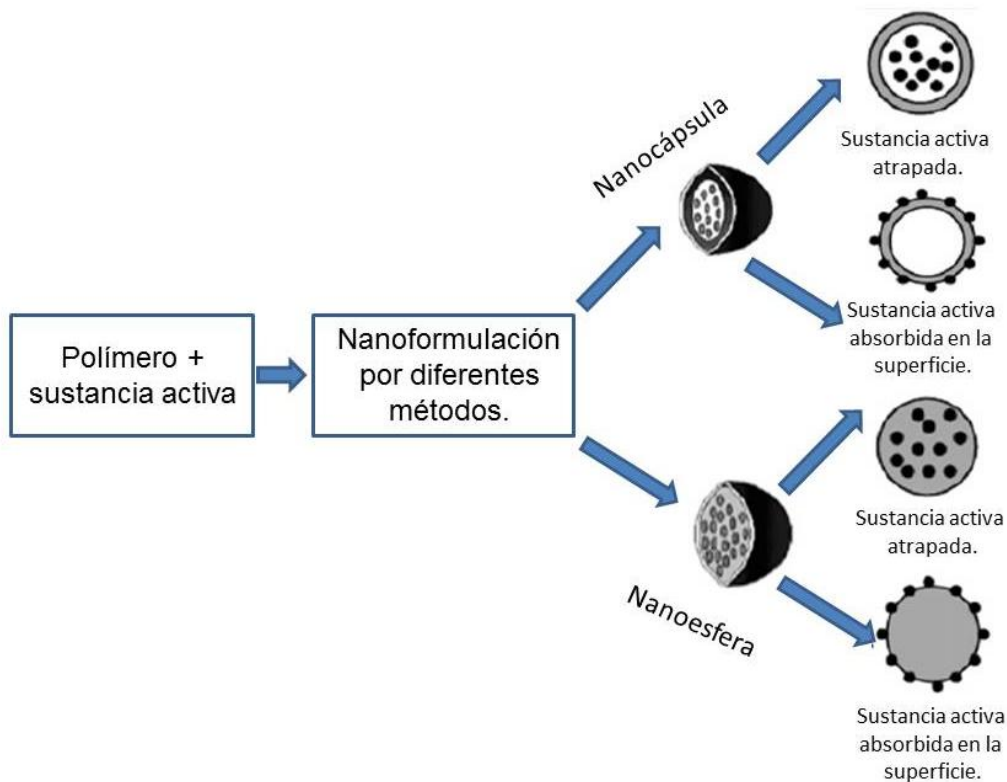


Figura 14: Nanopartículas biodegradables: nanocápsulas y nanoesferas. Kumari *et al.*, 2010

En alimentos, la nanoencapsulación se utiliza en compuestos sensibles como vitaminas, proteínas, probióticos, ingredientes bioactivos, sales, sabores u olores; esto con el fin de garantizar su protección del medio al cual son expuestos, como el pH, concentración de iones, oxígeno, agua, temperatura o ácidos.

2.8.2 Métodos de nanoencapsulación de fenoles.

Existen diversas maneras de preparar encapsulados (figura 15) entre ellas están el secado por aspersión, la coacervación, cocrystalización, nanopartículas, secado en frío, encapsulación con levadura y emulsiones. La inclusión molecular y el empleo de liposomas son tecnologías más caras y por lo tanto menos empleadas. (Nedovic *et al.*, 2011; Fang y Bhandari, 2010).

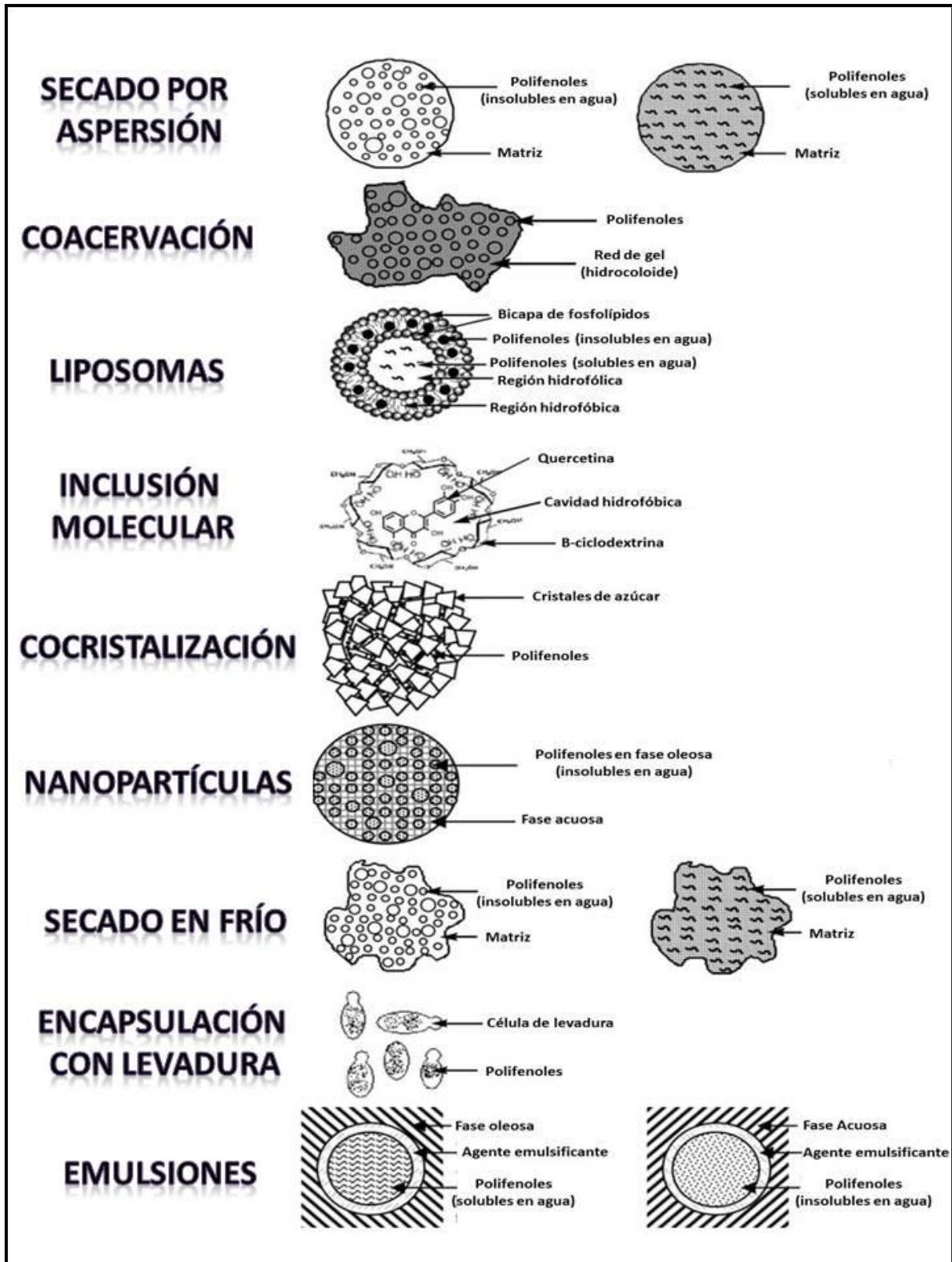


Figura 15: Características de compuestos polifenólicos encapsulados por diversos métodos de encapsulación. Fang y Bhandari, 2010.

2.8.3 Nanoencapsulación mediante secado por aspersión.

El secado por aspersión a nivel nano o nanospraydrying es la técnica de encapsulación más ampliamente aplicado en la industria alimentaria porque es flexible, continua, pero lo más importante, es una operación económica y produce polvos con buena calidad (Janiszewska *et al.*, 2014; Nedovic *et al.*, 2011).

Este proceso es en sí de deshidratación, pero se considera también de encapsulación, ya que puede producir partículas que atrapan el material a cubrir. Por definición, corresponde a la transformación de un fluido en un material sólido, atomizándolo en forma de gotas minúsculas en un medio seco y caliente. La distribución del tamaño de las partículas obtenidas por este método es en general menor a 1 μm , aunque hay que destacar que ello depende de las condiciones del proceso. Este consiste en la preparación de la emulsión o suspensión del material a encapsular en una solución de encapsulante, la atomización y la deshidratación de las partículas atomizadas. La adecuada selección del atomizador y el agente encapsulante, son factores críticos. Una de las grandes ventajas de este proceso, además de su simplicidad, es que es apropiado para materiales sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 s)

(Lee *et al.* 2011a)

Los encapsulantes más utilizados en este método son:

- carbohidratos (almidón y derivados, maltodextrinas, jarabes de maíz, ciclodextrinas, carboximetilcelulosa y derivados); gomas (arábica, mezquite, alginato de sodio);
- lípidos (ceras, parafinas, grasas)
- proteínas (gelatina, proteína de soya, caseinatos, suero de leche, zeína)

El tipo de material encapsulante tiene influencia en la estabilidad de la emulsión antes de secar, en el tamaño de partícula, en las propiedades de flujo, en las propiedades mecánicas y en la vida útil del material deshidratado (Pedroza *et al.*, 2002, Janiszewska *et al.*, 2014).

2.8.4 Factores que influyen en la nanoencapsulación por aspersión.

Los ingredientes encapsulados juegan un papel importante en la formación de un sistema estable para elaborar las nanocápsulas. Las gomas contribuyen con sus propiedades funcionales a la estabilización y formación del sistema bioactivo a ser encapsulado. Es decir, poseen propiedades de hidratación, de retención de agua, pueden gelificar, presentan fuerzas de cohesión y adhesión, propiedades emulsificantes, espumantes y de retención de grasas y aromas. Estas matrices hidrofílicas son ampliamente usadas debido a que son de fácil formulación, no son caras y son fáciles de producir (Gallo *et al.*, 2013). Todo ello dependiendo del origen del sistema bioactivo (Cruz-Terán, 2000). Conceptos de liberación modificada aplicados a extractos de plantas medicinales están todavía en una fase exploratoria. Sin embargo, algunos medicamentos de plantas han sido formulado como Sistemas de liberación modificada, proporcionando mejoras significativas en el rendimiento en comparación con fitomedicinas convencionales (Gallo *et al.*, 2013).

Independientemente del método para preparar las nanocápsulas, el primer paso para encapsular un ingrediente es la selección de una matriz de encapsulación adecuada. Los factores más importantes son: tipo de agente, concentración, pH del medio, temperatura de reacción, tamaño de partícula de la matriz, tiempo de interacción de la matriz con la solución, concentración de la solución y tipo reticulante. El pH es un factor que puede afectar a los polisacáridos que se comportan como electrolitos (goma arábica, goma de mezquite, alginato, carragenina), alterando su conformación debido a las cargas intramoleculares, lo que da como resultado diferentes tamaños de las nanopartículas. La naturaleza del polímero también tiene efecto sobre estas propiedades (Pedroza *et al.*, 2002).

2.8.5 Liberación controlada

La liberación del principio activo se propicia con algún evento que sirve de iniciación de la ruptura o disociación del material que sirve como protección (figura 16), lo anterior se puede lograr por medio de diversos mecanismos; los más comunes son:

- Ruptura de la pared de la nanopartícula por acción mecánica
- Derretimiento de la pared por la acción de la temperatura.
- Difusión del principio activo a través de la nanopartícula.
- Ruptura de la pared por medio de concentración de iones, enzimas, pH, agua, ácidos, entre otros (Lollo, 2012)

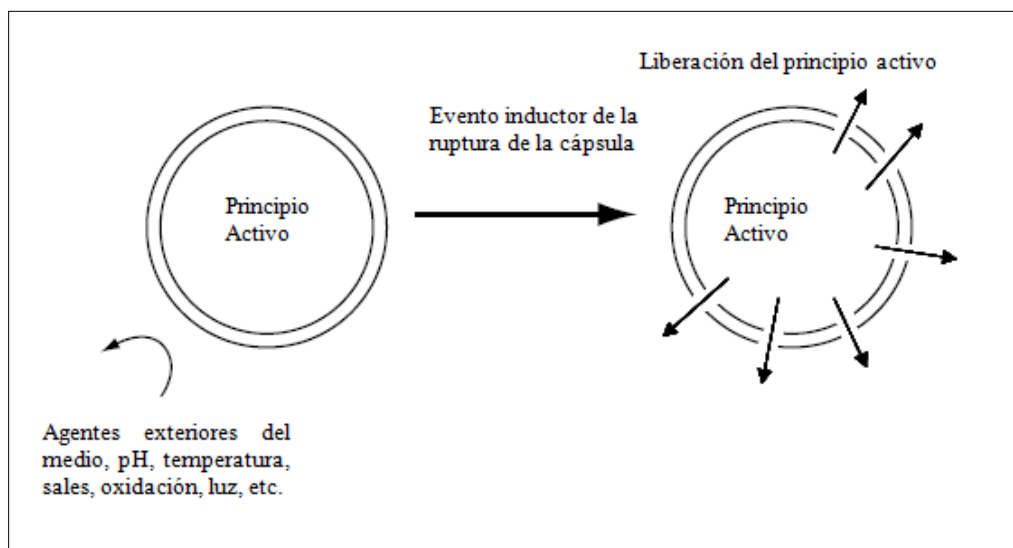


Figura 16: Protección y liberación del principio activo.

Algunos de los mecanismos de liberación más comunes son la fracturación, difusión y la biodegradación.

2.8.5.1 Mecanismos de liberación

2.8.5.1.1 Fracturación

La capa puede fracturarse y romperse por fuerzas externas, tales como la presión, cizallas, por un método electromagnético, o por fuerzas internas, que deberían ocurrir en una nanocápsula que tiene una capa permeable selectiva. Las cápsulas hechas de grasas densas o ceras insolubles en agua pueden liberar sus contenidos por rompimiento mecánico, por ejemplo, cizallar, o incrementando la temperatura hasta el punto de fusión de la grasa. (Rodríguez, 2012).

2.8.5.1.2 Difusión

La mayoría de las nanocápsulas tienen paredes delgadas que pueden funcionar como una membrana semipermeable. Además, como las nanocápsulas son muy pequeñas, tienen grandes áreas superficiales por unidad de peso. Por lo tanto, la liberación controlada está acompañada frecuentemente de un proceso de difusión controlado. La difusión es un proceso de penetración conducido por un gradiente de concentración o por fuerzas de atracción intercadena. En ausencia de rompimientos, agujeros, u otros defectos, el mecanismo primario para los materiales encapsulados que fluyen a través de una pared o capa es la difusión activada, por ejemplo, los disolventes penetran dentro de la pared de la matriz a altas concentraciones, se difunden a través de la película conducidos por un gradiente de concentración, y se evaporan a partir de otra superficie (Rodríguez, 2012).

2.8.5.1.3 Biodegradación

La liberación de las nanocápsulas puede estar acompañada por procesos de biodegradación si las capas generan entre ellas un mecanismo de degradación. Las capas lípidas se pueden degradar por la acción de lipasas. La exploración de este mecanismo para la liberación controlada es de gran importancia. (Rodríguez, 2012).

3 Justificación

En México existe una problemática tangible, los malos hábitos de alimentación y el consumo de alcohol y tabaco han generado que hoy siete de cada diez mexicanos padezcan de sobrepeso u obesidad, que se explica por un estilo de vida sedentario; como consecuencia de lo anterior tenemos a las enfermedades cardiovasculares y la diabetes mellitus como las dos principales causas de mortalidad en México según el INEGI (2013). Estas enfermedades están directamente relacionadas con el estrés oxidativo, el cual ha sido implicado en el desarrollo de varias enfermedades crónicas no transmisibles y el envejecimiento (Halliwell y Whiteman, 2004).

Ante este esquema nacional se buscan alternativas viables que reduzcan el índice de mortandad y aumente la calidad de vida con el fin de contrarrestar efectos negativos aprovechando los avances tecnológicos del siglo XXI. En base a lo anterior, el interés sobre los antioxidantes naturales, se ha incrementado, con el propósito de prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Justicia spicigera Schltdl. es una planta medicinal y endémica de Mesoamérica que ha sido empleada desde tiempos prehispánicos para el tratamiento de la inflamación, como depurativo en la sangre, cáncer, entre otros síntomas (Alonso *et al.*, 2011) y ha sido seleccionada como una fuente potencial de antioxidantes (Hernández, 2014).

La eficacia de los productos nutracéuticos en la prevención de enfermedades depende de la preservación de la biodisponibilidad de los ingredientes activos. Este es un gran reto, ya que sólo una pequeña proporción de las moléculas permanecen disponibles después de la administración oral, debido al tiempo de residencia gástrica insuficiente, de baja permeabilidad y / o la solubilidad en el intestino, así como su inestabilidad bajo condiciones encontradas en el procesamiento y almacenamiento de alimentos (temperatura, oxígeno, luz), o en el tracto gastrointestinal (pH, enzimas, presencia de otros nutrientes), factores que limitan la actividad y los posibles beneficios para la salud de los componentes nutracéuticos, incluyendo los compuestos fenólicos.

Por lo que se busca el empleo de una tecnología innovadora: la nanoencapsulación, que tiene la finalidad de proporcionar barreras entre los compuestos bioactivos con actividad antioxidante y el medio ambiente para estabilizarlos, enmascarar el sabor astringente, aumentar su biodisponibilidad y su tiempo de almacenamiento en polvo.

4 Objetivos

4.1 Objetivo General

Optimizar la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de *Justicia spicigera* Schltl. (Muicle) para su nanoencapsulación mediante secado por aspersión.

4.2 Objetivos Particulares

- a) Evaluar el efecto del tiempo de extracción y la concentración de disolventes en el rendimiento, contenido fenólico total y el contenido de flavonoides totales mediante la metodología de superficie de respuesta.
- b) Determinar la relación entre el contenido fenólico total y las capacidades antioxidante y antiradical.
- c) Nanoencapsular los compuestos bioactivos con actividad antioxidante de *Justicia spicigera* Schltl empleando biopolímeros.
- d) Caracterizar las nanopartículas en cuanto a su tamaño, morfología y rendimiento.
- e) Evaluar *in vitro* la liberación controlada de las nanopartículas cargadas con el extracto de muicle.

5 Materiales y Métodos

5.1 Materiales

5.1.1 Material biológico

El material vegetal fue adquirido fresco en un mercado local de la Ciudad de México.

5.1.2 Reactivos

Los reactivos 2, 2-diphenil-1-picrylhydrazil (DPPH), Folin-Ciocalteu (FC), cloruro férrico hexahidratado, catequina, 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), ácido gálico, trolox (ácido 6 hidroxil 2,5,7,8 tetrametil carboxílico), reactivo de Dragendorff y la gelatina tipo B se adquirieron en Sigma-Aldrich (USA). El ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido acético glacial y acetato de sodio fueron comprados en JT Baker (México). El carbonato de sodio y la viruta de magnesio fueron obtenidos en Golden Bell (México). El reactivo cloruro de aluminio hexahidratado fue adquirido en los laboratorios Reasol. La gelatina se obtuvo de los laboratorios Gelita de México. El nitrito de sodio y el alcohol amílico de laboratorio Mallinckrodt. El cloruro de hierro anhidro y reactivo de Mayer's del laboratorio Fluka. El acetato de sodio del laboratorio Analytyka. El hidróxido de sodio y el cloroformo se obtuvo del laboratorio Fermont. El reactivo de Molish se adquirió del laboratorio Hycel. Y por último el bicarbonato de sodio del laboratorio Merck. Los disolventes empleados fueron grado técnico.

5.2 Métodos

5.2.1 Preparación de extractos

5.2.1.1 Acondicionamiento del material vegetal

El material vegetal fue llevado al Laboratorio de Biomateriales de CICATA IPN- Unidad Legaria, donde fue lavado con agua corriente, sanitizado en una solución de hipoclorito de sodio al 1% y secado bajo condiciones de sombra y temperatura ambiente. Finalmente las hojas fueron separadas de los tallos y pulverizadas en un molino de discos (Modelo 148-2, The Bauer Bros Co., EUA). El polvo seco fue tamizado (100 mesh) y almacenado en bolsas de plástico previo a su análisis.

5.2.2 Extracción asistida por ultrasonido

La extracción se realizó en una relación sólido/líquido (1:20) acidificándose con ácido fórmico al 1%. La mezcla resultante fue sometida a un periodo de ultrasonido (25kHz) en un baño ultrasónico (Elma TI-H-5), por el tiempo establecido en el diseño de experimentos. Posteriormente, los extractos se centrifugaron (15min, 1750 rpm) y el sobrenadante fue filtrado y envasado. Los residuos se sometieron a una segunda extracción bajo las mismas condiciones. Los sobrenadantes fueron mezclados y concentrados en un rotavapor (Yamato RE500) para su posterior liofilización en un equipo Labconco (FreeZone 4.5 Liter). Los extractos fueron almacenados en frascos ámbar a temperatura ambiente.

5.2.3 Perfil fitoquímico

Se realizó un perfil fitoquímico de *Justicia Spicigera Schltl.* para la determinación inicial de los siguientes compuestos secundarios presentes en los extractos (acuoso y etanólico): alcaloides, flavonoides, taninos, carbohidratos, saponinas, esteroides y triterpenos, cumarinas e insaturaciones. Las soluciones se prepararon a una concentración de 1000 ppm. Se trabajó con la metodología propuesta por Domínguez (1973) con algunas modificaciones.

ALCALOIDES

Se prepararon 8 tubos de ensayo y se les colocaron 500 μ L de muestra acidificándose con HCl al 1%, el tubo testigo se preparó de igual forma, sólo que en vez de extracto se colocaron 500 μ L de agua o etanol según el caso. A cada tubo de ensayo se le adicionaron 2-3 gotas del reactivo correspondiente.

- Prueba de Dragendorff: La prueba fue positiva cuando apareció una coloración rojo, marrón o naranja.
- Prueba de Wagner: La prueba fue positiva cuando hubo presencia de precipitados floculentos color marrón.
- Prueba de Hager: La prueba fue positiva cuando apareció un precipitado.
- Prueba de Mayer's: La prueba fue positiva cuando apareció un precipitado blanco, amarillo claro o marrón.

FLAVONOIDES

- Prueba de Shinoda: A 1 mL de muestra se le adicionó un trocito de viruta de magnesio, posteriormente se le agregaron 5 gotas de HCl concentrado. El testigo se preparó de la misma forma, sólo que en lugar de la muestra se colocó 1mL de agua o etanol según el caso. La aparición de los colores: naranja a violeta indica que la prueba es positiva para la presencia flavonoides.

- Prueba de Rosenheim: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de muestra, se añadieron 500 μL de HCl concentrado, fue mezclado y calentado durante 10 minutos a 93 °C, después enfriado y fue trasvasado a otro tubo de ensayo en el cual se le agregaron 400 μL de alcohol amílico, se mezcló y se dejó reposar hasta la aparición de dos fases. El tubo testigo se preparó de la misma forma, sólo que en lugar de la muestra se colocó 1mL de agua o etanol según el caso. La prueba se consideró positiva si aparecía la coloración en la fase amílica que va desde el carmesí oscuro al rosado débil.
- Prueba del H_2SO_4 : Una pequeña cantidad de muestra (1-2mg) se disolvió en H_2SO_4 y se observó una coloración amarilla para flavonoles, naranja-guinda para flavonas, rojo-azuloso para chalconas y rojo-púrpura para quinonas.

TANINOS

- Prueba de FeCl_3 : A 500 μL de muestra se añadieron unas gotas de cloruro de hierro al 12.5 % en agua. El tubo testigo se preparó de la misma forma, sólo que en lugar de la muestra se colocaron 500 μL de agua o etanol según el caso. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde es considerado positivo.
- Prueba de Gelatina: A 500 μL de muestra se añadieron unas gotas de gelatina al 1%. El tubo testigo se preparó de la misma forma, sólo que en lugar de la muestra se colocaron 500 μL de agua o etanol según el caso. La aparición de un precipitado se consideró positiva.

CARBOHIDRATOS

- Prueba de Fehling: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de muestra se agregaron 500 μL del reactivo de Fehling A y 500 μL de reactivo de Felling B. Posteriormente, se colocó la muestra en un baño de agua hirviendo. El

tubo testigo se preparó de la misma forma, sólo que en lugar de la muestra se colocó 1 mL de agua o etanol según el caso. La aparición de un precipitado color rojo ladrillo se consideró positivo.

- Prueba de Molish: En un tubo de ensayo se agregaron 500 µL de muestra se les agregaron 2-3 gotas del reactivo de Molish. Posteriormente se le adicionaron 500 µL de ácido sulfúrico. El tubo testigo se preparó de la misma forma, sólo que en lugar de la muestra se colocaron 500 µL de agua o etanol según el caso. La prueba es positiva cuando se forma un anillo coloreado en la interfase de color púrpura.

SAPONINAS

- Prueba de agitación: A 1-2 mg de la muestra se disolvió con agua en un tubo de ensayo, se agitó vigorosamente durante 3-5 min. La formación de espuma con apariencia de panal de abeja, estable por 30 min, se consideró la prueba positiva.
- Prueba de NaHCO₃: En un tubo de ensayo se colocaron 500 µL de muestra se le agregan de 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se agita ligeramente. Luego se agregaron 2-3 gotas de la solución de bicarbonato de sodio. La aparición de burbujas y su permanencia por más de 1 minuto indicó que la prueba fue positiva.
- Prueba de Salkowski: Se disuelven de 1-2 mg de la muestra en 1 mL de cloroformo y se le añadió 1 mL de ácido sulfúrico. La prueba fue positiva si hay aparición de color rojo.

ESTEROLES Y TRITERPENOS

- Prueba de Liebermann-Burchard: Se mezcló 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo, se enfrió a 0 °C y se añadieron una gota de ácido sulfúrico. Gota a gota se añadió este reactivo a 500 µL de muestra. El tubo testigo se preparó de la misma forma, sólo que en lugar de la muestra se

colocaron 500 μL de agua o etanol según el caso. Si hay formación de colores azul, verde, rojo, anaranjado, etc., los que cambian con el tiempo, la prueba fue positiva.

- Prueba de Salkowski: En un tubo de ensayo se colocaron de 1-2 mg de muestra se le adicionó 1 mL de ácido sulfúrico. La prueba se consideró positiva si se desarrollan colores amarillo o rojo para esteroides y metilesteroides.

CUMARINAS

- Prueba de NaOH 10%: Se disolvieron 1-2 mg de muestra en NaOH al 10%, si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular es positiva.

INSATURACIONES

- Prueba de KMnO_4 : A 500 μL de muestra se añadió gota a gota una solución de KMnO_4 al 2% en agua. El tubo testigo se preparó de la misma forma, sólo que en lugar de la muestra se colocó 500 μL de agua o etanol según el caso. La prueba es positiva si se observa decoloración o formación de precipitado café.

5.2.4 Contenido de fenoles totales. Método de Folin-Ciocalteu.

Siguiendo la metodología de Singleton y Rossi, (1965) el contenido fenólico total fue calculado a partir de la capacidad de reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu, con algunas modificaciones (Waterhouse, 2002) y utilizando ácido gálico como patrón (anexo 1). Un volumen de muestra de 20 μL fue adicionado a 1.4mL de agua destilada, seguido de 100 μL del reactivo de Folin–Ciocalteu (2N). La solución se dejó reposar por 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 300 μL de una solución de carbonato de sodio al 20% (m/v) y 180 μL de agua destilada. Después de 100 minutos de reposo en la oscuridad, la absorbancia fue

determinada a una longitud de onda de 760 nm utilizando un Multiskan Go, Thermo Fisher, (Finland). Los resultados se expresaron como el peso equivalente de ácido gálico en mg/g de extracto liofilizado (mg EAG/g EL) (Cicco, *et al.*, 2009).

5.2.5 Contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales de los extractos fue estimado por un procedimiento colorimétrico usando cloruro de aluminio (AlCl_3) e hidróxido de sodio (NaOH) (Miliauskas *et al.*, 2004). Se tomó una alícuota (200 μL) con 1.0 mg/mL de cada extracto fue mezclado con 800 μL de agua destilada y con 60 μL de solución 150g/L de nitrito de sodio (NaNO_2), posteriormente se agregaron 60 μL de solución 100g/L de cloruro de aluminio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Después de 6 minutos de reposo a temperatura ambiente se le adicionaron 800 μL de NaOH (1mol/L) y 80 μL de agua destilada. Al concluir el periodo de incubación (15 minutos), la absorbancia fue leída a 510nm. El contenido de flavonoides totales fue expresado como mg equivalentes de catequina / g de extracto liofilizado (Anexo 2) (Benariba *et al.*, 2013).

5.2.6 Capacidad reductora de hierro. Método FRAP.

La capacidad antioxidante se determinó utilizando la prueba de FRAP (Ferric Reduction Antioxidant Power). La determinación de FRAP está basada en la reducción del complejo Fe^{3+} -TPTZ al complejo azulado Fe^{2+} -TPTZ (Benzie y Strain, 1966). La solución FRAP se preparó mezclando 25 mL de Buffer de acetato 300 mM (pH 3.6), 2.5mL de solución TPTZ (0.01M) y 2.5mL de una solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.02M). La solución FRAP se llevó a una temperatura de 37°C (4 min) previo a su uso. Una alícuota de extracto de 100 μL (1.0 mg/mL) fue mezclada con 1900 μL de solución FRAP. Se dejó reposar por 30 min en la

oscuridad y la absorbancia fue leída a 593 nm. Los resultados fueron reportados en μM equivalentes de trolox / 1000 ppm ($\mu\text{M ET} / 1000 \text{ ppm}$) (Anexo 3).

5.2.7 Capacidad secuestradora de radicales libres. (DPPH)

La capacidad antiradical fue determinada con el ensayo DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) siguiendo la metodología de Molyneux (2004), con algunas modificaciones según Quiroz-Reyes *et al.* (2013). Una alícuota de 500 μL del extracto fue mezclada con 125 μL Tris-HCl (pH 7.4, 0.1M). A esta solución, se le agregaron 500 μL de DPPH (0.17 mg/mL). Después de 30 minutos de reposo en la oscuridad, la absorbancia fue leída a 517 nm. El porcentaje de reducción de DPPH fue calculado usando la Ec. 1.

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \left[1 - \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \right] * 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

El EC_{50} se define como la cantidad necesaria de extracto para reducir la concentración del DPPH en un 50%. El valor del EC_{50} fue calculado a partir de una gráfica del efecto de reducción de DPPH contra la concentración del extracto estudiado, usando ácido ascórbico como control (anexo 4).

5.2.8 Diseño Experimental

El diseño experimental consistió de 13 experimentos que fueron utilizados para la optimización de las variables de extracción. Las variables independientes y sus niveles fueron la concentración del agua en la mezcla de disolventes (agua-etanol) y el tiempo de extracción. El contenido total de fenoles totales, capacidad reductora de hierro (FRAP) y actividad antiradical (DPPH) fueron seleccionadas como variables respuesta. La Tabla 4 muestra los valores reales del DCC y sus

variables independientes. Se calculó la respuesta predicha por medio de un modelo polinomial de segundo orden (Ec. 2).

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^2 b_i X_i + \sum_{i=1}^2 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^2 b_{ij} X_i X_j \quad \text{Ec. (2)}$$

En donde Y es la variable respuesta, b_0 es el término independiente, b_i es el efecto lineal, b_{ii} es el efecto cuadrático, b_{ij} es el efecto de interacción y X_i y X_j son las variables independientes. Los resultados fueron analizados usando el programa Design Expert (versión 7.0). A fin de optimizar las condiciones de extracción del contenido fenólico total, contenido de flavonoides totales, capacidad reductora de hierro (FRAP) y actividad antirradical (DPPH) se realizó el análisis de la varianza (ANOVA), análisis de regresión y se elaboraron las gráficas de superficie de respuesta.

Tabla 4: Niveles de los factores en el análisis de la superficie de respuesta.

Variables Independientes	Unidades Codificadas	Niveles codificados				
		-1	0	+1	Axial - α	Axial + α
Concentración de Agua (% v/v)	X_1	15	50	85	0	100
Tiempo de extracción (min)	X_2	28	58	88	16	100

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Se calcularon los promedios y las desviaciones estándar de los datos para cada tratamiento. El análisis de la varianza (ANOVA) se llevó a cabo para determinar las diferencias significativas ($p < 0.05$), considerando un modelo de una vía de acuerdo a los métodos de Montgomery (2004).

5.2.9 Validación del modelo

Para la validación del modelo estadístico a través de las gráficas de superficie de respuesta se seleccionaron los parámetros de extracción óptimos para las cuatro variables de respuesta, contenido fenólico total, capacidad reductora de hierro, actividad antirradical y rendimiento en masa. Se realizó la extracción con las condiciones óptimas por triplicado y su caracterización.

5.2.10 Síntesis de Nanopartículas

Para la síntesis de las nanopartículas se diluyeron por separado 0.2 g de extracto en 20 mL de la mezcla acuosa-etanólica y 0.4 g de gelatina en 80 mL de agua desionizada a 120 °C. La solución del extracto se dejó en agitación por 20 horas, mientras que la solución de gelatina fue filtrada (0.45 µm, Millipore); fue mantenida en agitación y calentamiento (80 °C) durante 3 horas, posteriormente se dejó solo en agitación por 20 horas. Una vez terminado el tiempo, se mezclaron ambas soluciones y se agregaron 4 µL de glutaraldehído y la solución fue mantenida en agitación durante 60 min a temperatura ambiente, para posteriormente ser sometida a sonicación durante 30 min en un baño ultrasónico (TI-H-5, Elma, Germany). Finalmente, la solución fue filtrada empleando una membrana con diámetro de poro de 0.22 µm (Millipore). Para la formación de las nanopartículas se empleó un Nano Spray Dryer B- 90 (Büchi, Suiza), utilizando una membrana de 0.40 µm. La temperatura de secado dentro del equipo fue de 95 °C a una presión de 31 Mbar. El polvo resultante fue recogido de la base del equipo y almacenado hasta su caracterización. Todo el procedimiento se repitió para preparar nanopartículas sin carga (sin extracto) para ser empleadas como control.

5.2.11 Rendimiento de las nanopartículas

El polvo seco obtenido en el Nano Spray Dryer B- 90 (Büchi, Suiza), fue pesado y el rendimiento fue obtenido empleando las siguientes ecuaciones:

En caso de las nanopartículas sin carga (control):

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{polvo seco obtenido (g)}}{\text{gelatina empleada (g)} + \text{tween (g)}} \times 100 \quad \text{Ec. (3)}$$

En caso de las nanopartículas cargadas:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{polvo seco obtenido (g)}}{(\text{gelatina} + \text{extracto}) \text{ empleados (g)} + \text{tween (g)}} \times 100 \quad \text{Ec. (4)}$$

5.2.12 Caracterización de nanopartículas por microscopía electrónica de barrido (SEM)

El tamaño y morfología de las nanopartículas fueron evaluados utilizando un microscopio electrónico de barrido (JSM-6390LV JEOL, Japón). Previamente, las muestras fueron recubiertas con oro mediante sputtering (Desk IV, Denton Vacuum). Las micrografías fueron tomadas a una magnificación de 7,000 empleando un voltaje acelerador de 20 kV.

5.2.13 Evaluación de su liberación controlada.

De acuerdo con el método descrito por Lee *et al.* (2011b), con algunas modificaciones, se disolvieron 2 mL de tripsina acetilada a 20 mL de buffer de fosfato (PBS) a pH 7.4. Se pesaron 20 mg de nanopartículas secadas por aspersión y fueron redispersadas en 3 mL de agua de destilada, la mezcla

resultante se añadió al medio de liberación (PBS) para degradar la pared del material. La mezcla se agitó constantemente a 37°C durante un periodo de 0 - 6 horas. Se tomó una alícuota de 2 mL, cada (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 horas) posteriormente se centrifugo y del sobrenadante se tomó una alícuota de 200µL por triplicado y se midió a una longitud de onda de 665 nm. Se elaboró una curva de calibración del extracto de muicle a diferentes concentraciones de 0 a 1000 ppm para poder conocer la concentración (Anexo 5) (Naidu *et al.*, 2010; Quiroz *et al.*, 2014).

6 Resultados y discusión

6.1 Perfil fitoquímico

Los resultados del análisis fitoquímico cualitativo de extractos de *Justicia Spicigera* Schltl. se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5: Análisis fitoquímico cualitativo de extractos de *Justicia spicigera* Schltl.

Metabolito	Extracto Acuoso	Extracto Etanólico
ALCALOIDES		
Prueba de Dragendorff	(-)	(-)
Prueba de Wagner	(-)	(-)
Prueba de Hager	(-)	(-)
Prueba de Mayer´s	(-)	(-)
FLAVONOIDES		
Prueba de Shinoda	(++)	(++)
Prueba de Rosenheim	(++)	(++)
Prueba del H ₂ SO ₄	(+)	(++)
TANINOS		
Prueba de FeCl ₃	(+)	(-)
Prueba de Gelatina	(+)	(-)
CARBOHIDRATOS		
Prueba de Fehling	(-)	(-)
Prueba de Molish	(-)	(-)
SAPONINAS		
Prueba de la agitación	(-)	(-)
Prueba de NaHCO ₃	(-)	(+)
Prueba de Salkowski	(-)	(-)
ESTEROLES Y TRITERPENOS		
Prueba de Liebermann-Burchard	(+++)	(-)
Prueba de Salkowski	(+++)	(-)
CUMARINAS		
Prueba de NaOH 10%	(-)	(-)
INSATURACIONES		
Prueba de KMnO ₄	(-)	(++)

La presencia de metabolitos fue determinado como (+++) Presencia Intensa, (++) Moderada, (+) Leve, (-) Negativo.

En ambos extractos (acuoso y etanólico) no se encontraron alcaloides, esto se debe directamente al tipo de disolvente empleado, como sugieren Benmehdi et al., (2013) que los disolventes polares no favorecen la extracción de esos compuestos. El extracto acuoso, tuvo una presencia moderada de flavonoides y presencia leve de taninos. Por otro lado, en el extracto etanólico se observó una leve presencia de compuestos de grupo saponinas y moderada en grupos con insaturaciones y flavonoides. Ningún extracto presentó carbohidratos ni cumarinas. Por consiguiente en el extracto acuoso se identificaron la mayor cantidad de metabolitos secundarios, por lo que se infiere que hubo mayor transferencia de masa, constituida mayormente por compuestos de naturaleza polar.

6.2 Respuesta de las variables a las condiciones de extracción

Las respuestas de cada variable independiente se enumeran en la Tabla 6. Entre los experimentos llevados a cabo en el presente estudio, el tratamiento B, (15% agua, 85% etanol y tiempo de 28 min.) proporcionó el contenido de fenoles totales más altos (162.49 mg EAG/g EL), y el tratamiento L, (85% agua, 15% etanol y tiempo de 88 min) produjo el contenido fenólico total menor (84.89 mg EAG/g EL). El extracto del tratamiento D, (100% etanol y tiempo de 58 min) mostró el contenido total de flavonoides mayor, mientras que el tratamiento K, (15% agua, 85% etanol y tiempo de 88 min) fue el menor. La capacidad reductora de hierro mayor la presento el tratamiento K, mientras que el tratamiento J, (100% agua y tiempo de 58 min) tuvo la menor capacidad. El valor del EC_{50} menor fue con el tratamiento B y el mayor fue con el tratamiento J. El análisis de varianza (ANOVA) mostró que el modelo del polinomio cuadrático fue significativo ($p < 0.01$) para el contenido de fenoles totales, capacidad antiradical (DPPH), capacidad reductora de hierro (FRAP) y el rendimiento. De los que se hará una discusión detallada en las siguientes páginas.

Tabla 6: Variables de respuesta y condiciones de extracción de *Justicia spicigera* Schlttdl. en la EAU basados en un diseño central compuesto (DCC).

Muestras	Condiciones de Extracción		Variables de respuesta			
	X ₁ Concen- tración de agua (%)	X ₂ Tiempo de extracción (min)	Contenido de fenoles totales (mg EAG/g EL)	Capacidad reductora de hierro (µM ET/ 1000ppm)	Capacidad antiradical EC ₅₀ (ppm)	Rendimiento (%)
A	50	16	140.11	670.30	203.0	30.37
B	15	28	162.49	639.53	167.45	21.46
C	85	28	109.67	546.19	423.46	35.03
D	0	58	135.40	647.23	197.11	11.27
E	50	58	128.87	616.16	255.21	30.84
F	50	58	125.62	627.56	279.89	31.88
G	50	58	136.13	679.22	290.00	30.00
H	50	58	127.44	656.27	282.90	29.86
I	50	58	130.53	595.01	273.87	31.38
J	100	58	100.93	424.90	860.46	32.51
K	15	88	139.02	718.60	224.59	24.57
L	85	88	84.89	472.98	585.65	34.07
M	50	100	133.22	605.18	266.92	31.69

6.2.1 Análisis del contenido total de flavonoides.

El contenido total de flavonoides no fue significativo ya que se obtuvo del modelo una $p > 0.05$ por lo que no se presenta una superficie de respuesta. Sin embargo, en la figura 18 se puede apreciar que el tratamiento D (100% etanol y un tiempo de 58 min) fue significativamente mayor a todos los demás tratamientos. Sheng *et al.*, 2013 reportan que los parámetros significativos en la extracción de flavonoides es la relación sólido/líquido, la proporción del disolvente y el tiempo de extracción. La estabilidad de los flavonoides depende directamente de su estructura química, Biesaga, (2011) sugirió que los azúcares y los grupo metoxilo protegen a los flavonoides de la degradación durante la extracción asistida por ultrasonido.

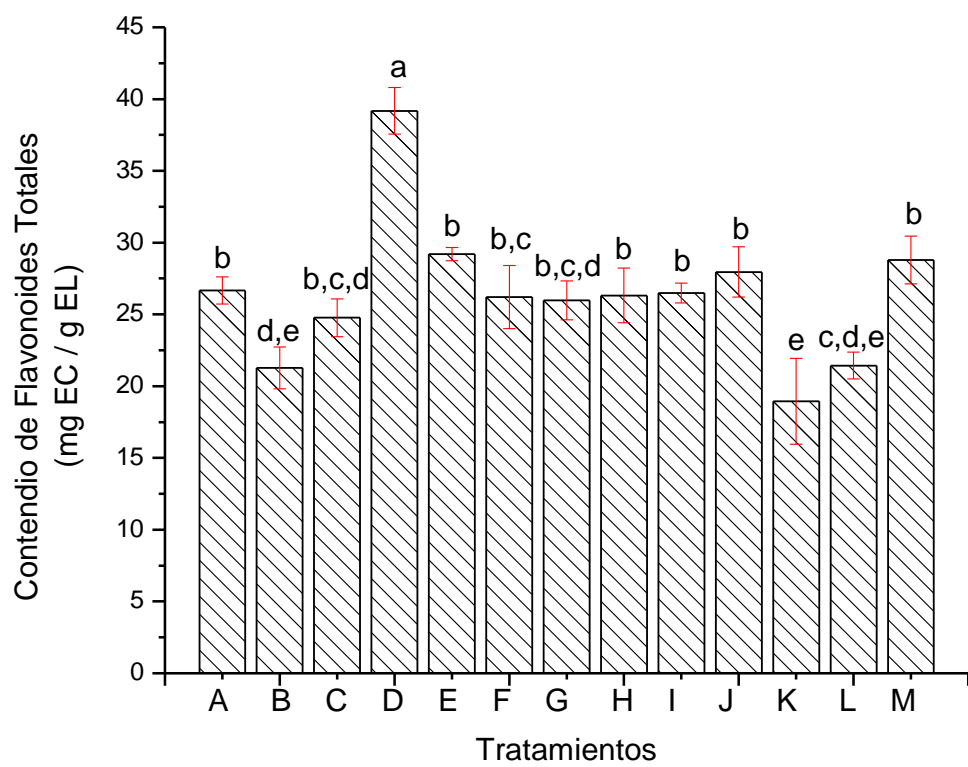


Figura 17: Contenido de flavonoides totales en los tratamientos de la EAU de la Justicia spicigera Schldl.

6.2.2 Análisis de la superficie de respuesta del contenido total de fenoles.

Los datos obtenidos de los diferentes tratamientos, generaron la siguiente ecuación:

$$CTF = 159.2872 + 6.9536E^{-3}CA - 0.2440TE - 5.5735E^{-3}CA^2 \quad \text{Ec. (5)}$$

Los resultados indicaron que la relación cuadrática entre el contenido de fenoles totales y los factores de extracción tuvieron un coeficiente de determinación significativo ($R^2 = 0.8359$). Sin embargo solamente la variable CA fue altamente significativa ($p < 0.001$).

El mayor contenido fenólico se observó cuando hubo una mayor concentración de etanol (figura 18). Lo anterior se debe a que la mayoría de los compuestos fenólicos son principalmente solubles en solventes polares (García-Viguera, 1998). Jin-Ming *et al.*, (2003) reportó que los compuestos fenólicos normalmente son extraídos de materiales vegetales usando metanol con pequeñas cantidades de HCl o ácido fórmico, obteniendo un mayor rendimiento en el contenido de fenoles. Sin embargo, la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos recomiendan el agua y etanol como disolventes en la industria de alimentos para fines de extracción (Tabaraki *et al.*, 2012). De igual forma se aprecia que existe un sinergismo entre los disolventes empleados, lo anterior está relacionado con la estructura química de los compuestos fenólicos, en donde la abundancia de sus grupos hidroxilo permite una alta interacción con la polaridad de la mezcla obtenida (Koffi *et al.*, 2010).

El fenólico contenido total máximo se obtuvo en un intervalo de tiempo de 16-30 minutos. Rao y Rathod (2015) emplearon un tiempo máximo de 20 minutos en la extracción asistida por ultrasonido de *Andrographis paniculata* debido a que después de ese tiempo no hubo aumento significativo en el contenido de fenoles totales, además de que se trata de evitar un consumo excesivo de energía resultado de mayores tiempos de extracción.

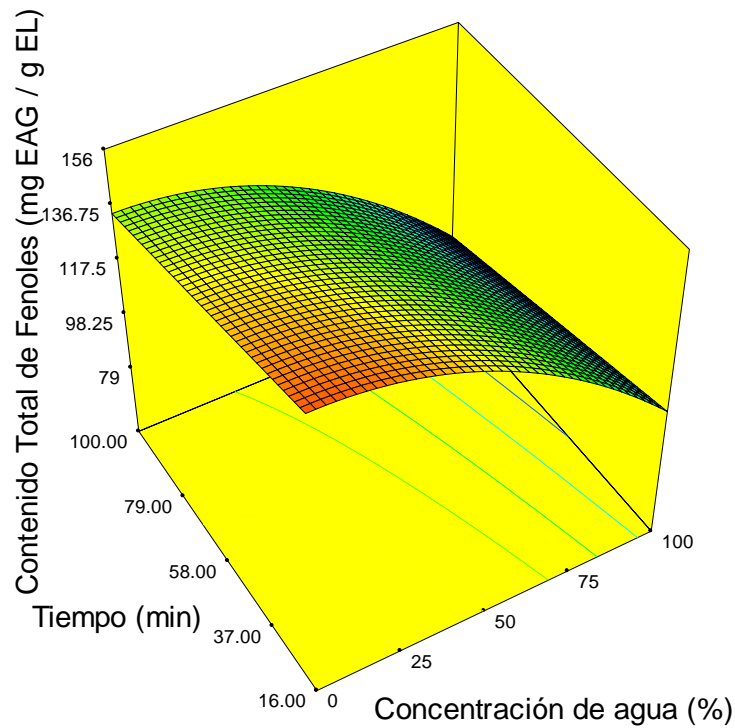


Figura 18: Efecto de los parámetros de EAU de *Justicia spicigera* Schltld. en el contenido fenólico total.

Ortiz-Andrade *et al.*, (2012) utilizaron un equipo Soxtherm y un tiempo de 3 horas para la extracción etanólica de *Justicia spicigera* Schltld. donde mostró que la kaempferitrina (compuesto fenólico), que es el mayor componente en el extracto de muicle con 69.65 mg / g extracto seco. Hernández (2014), reportó 98 y 108 mg EAG / g ES en la extracción asistida por ultrasonido con agua y una mezcla acuosa-etanolica (50/50%) respectivamente, con un tiempo de 30 minutos.

6.2.3 Análisis de la superficie de respuesta de la capacidad reductora de hierro (FRAP)

La relación entre la capacidad reductora de hierro y las condiciones de extracción concentración de agua y tiempo de extracción mostró un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9285$. La ecuación polinomial de segundo orden con los términos significativos de la capacidad reductora de hierro de las hojas de *Justicia spicigera* Schltdl. se muestra a continuación:

$$CRH = 572.6519 + 3.6288CA + 1.4496TE - 0.0362CA * TE - 0.0383CA^2 \quad \text{Ec. (6)}$$

Se encontró que CA , $CA * TE$, y CA^2 fueron los parámetros significativos ($p < 0.01$) mientras que TE y TE^2 no tuvieron un efecto significativo en la capacidad reductora de hierro del muicle. El comportamiento según esta ecuación se ve en la figura 19 donde se muestra la relación entre la capacidad reductora de hierro y las condiciones de extracción. La capacidad reductora de hierro se incrementa cuando hay menor concentración de agua y se observa una ligera alza al aumentar el tiempo de extracción, sin embargo, al realizar el ANOVA no fue una variable significativa. De acuerdo al anexo 6 se puede apreciar que existe una correlación lineal entre el contenido de fenoles totales y la capacidad reductora de hierro ($R^2=0.78$) (Wootton-Beard *et al.*, 2011). Maizura *et al.*, (2010) encontró un coeficiente de correlación positivo ($R^2=0.91$) entre el contenido fenólico total y el ensayo FRAP, así como, varios estudios (Shan *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2006) informaron que los compuestos fenólicos en especias y plantas contribuyeron significativamente a sus propiedades antioxidantes.

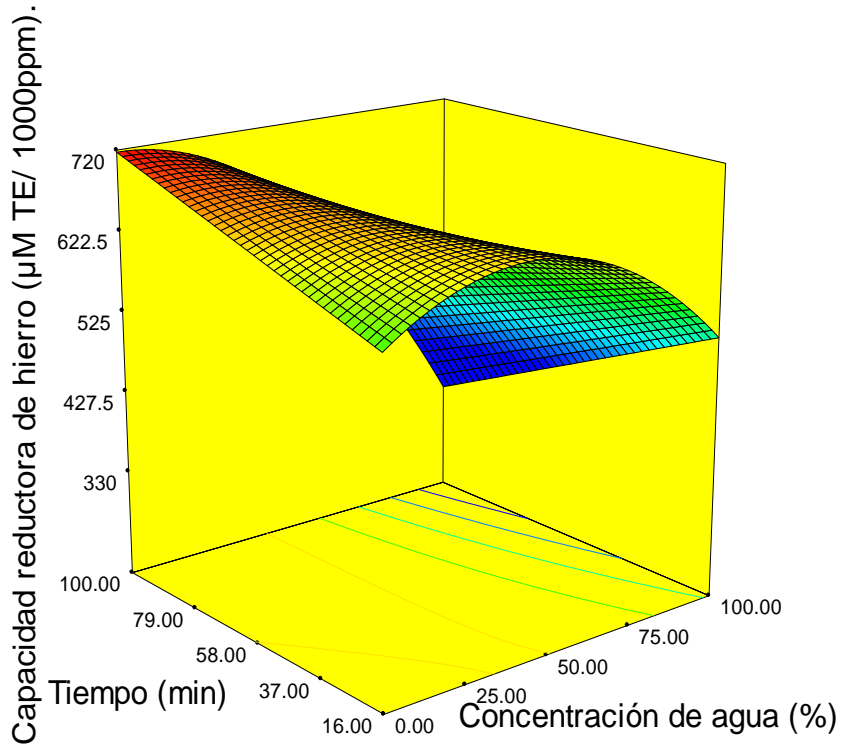


Figura 19: Efecto de los parámetros de EAU *Justicia spicigera* Schltdl. en la capacidad reductora de hierro.

6.2.4 Análisis de la superficie de respuesta de la capacidad antiradical (DPPH)

El modelo estudiado para el DPPH resultó con un valor de coeficiente de determinación mayor que para las otras variables anteriores ($R^2 = 0.9415$) y la ecuación polinomial cuadrática con los términos significativos de la capacidad antiradical fue:

$$EC_{50} \text{ DPPH} = 149.9976 - 4.26280CA + 1.3035TE + 0.0976CA^2 \text{ Ec. (7)}$$

El ANOVA indicó que solamente CA y CA^2 fueron los parámetros significativos en la extracción asistida por ultrasonido. El valor de EC_{50} se determinó representando

gráficamente el porcentaje de inhibición del radical DPPH vs la concentración del extracto. Cuanto menor sea el valor de EC_{50} , mayor es la actividad de los extractos como eliminadores de radicales DPPH (Wootton-Beard y Ryan, 2011).

En la figura 20 muestra la relación entre la capacidad antiradical y las dos condiciones de extracción. Se puede apreciar que el EC_{50} fue menor cuando se disminuyó la concentración del agua y al no ser significativo el tiempo se puede emplear el menor tiempo de extracción. Los resultados también mostraron que la actividad antioxidante del extracto de muicle mediante el ensayo FRAP tuvo una tendencia similar con el ensayo DPPH. En el anexo 7 se aprecia una correlación lineal positiva ($R^2=0.79$) entre la actividad antiradical y el contenido fenólico total de la EAU de las hojas de muicle, indicando que los compuestos fenólicos son los que contribuyen en mayor cantidad a su actividad antioxidante.

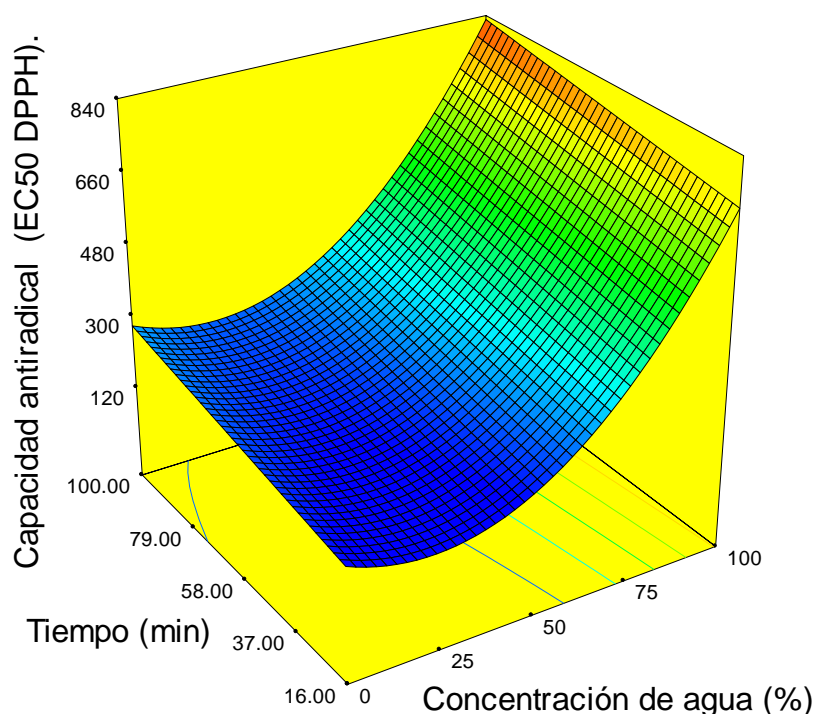


Figura 20: Efecto de los parámetros de EAU *Justicia spicigera* Schlttdl. en la capacidad antiradical (EC_{50} DPPH).

Sepúlveda-Jiménez et al., (2009) realizaron la extracción acuosa del muicle en un tiempo de extracción de 30 minutos reportando para el valor del EC₅₀ de la hoja del muicle de 175 ppm.

6.2.5 Análisis de la superficie de respuesta del rendimiento en masa.

La relación entre el rendimiento en masa y las condiciones de extracción concentración de agua y tiempo de extracción mostró un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9529$. La ecuación polinomial de segundo orden con los términos significativos del rendimiento de las hojas de *Justicia spicigera* Schtdl. se muestra a continuación:

$$\text{Rendimiento} = 10.1764 + 0.5608CA + 0.0653TE - 9.6939E^{-4}CA * TE - 3.1686 CA^2$$

Ec. (8)

Por otro lado, la figura 21 muestra que el rendimiento en masa no presentó una relación directa con el contenido fenólico y capacidad reductora de hierro, ya que cuando se empleó una mayor proporción de agua en la extracción, hubo una mayor transferencia de masa, sin embargo, se infiere que muchos de los compuestos extraídos, no presentaron propiedades antioxidantes.

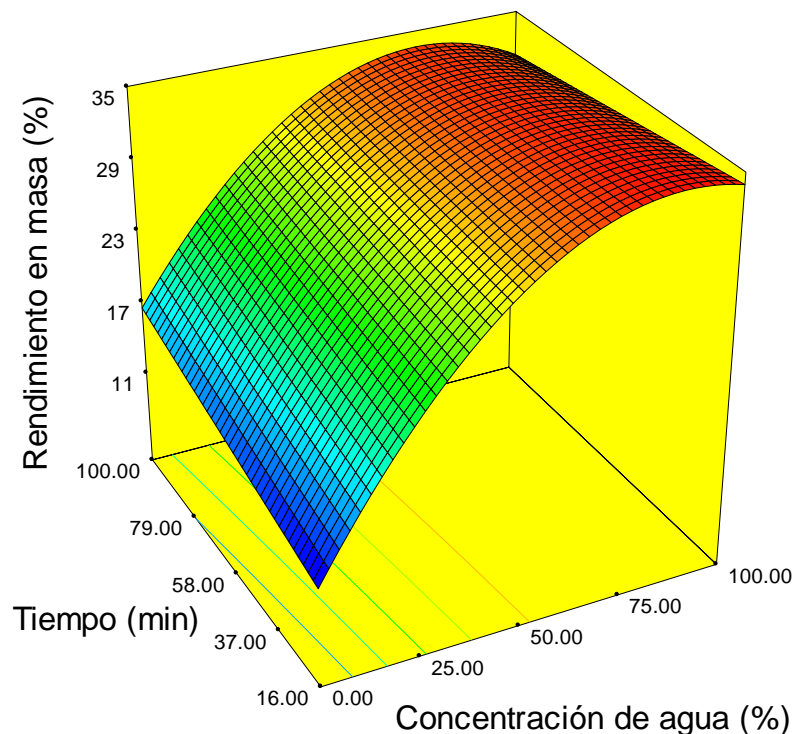


Figura 21: Efecto de los parámetros de EAU *Justicia spicigera* Schltld. en el rendimiento en masa.

6.2.6 Optimización de los parámetros de extracción y validación del modelo.

Las condiciones de EAU óptimas pronosticadas para el contenido de fenoles totales, capacidad reductora de hierro, actividad antirradical y rendimiento en masa del extracto de *Justicia spicigera* Schltld. fue a una proporción de 75% Etanol, 25% Agua y un tiempo de extracción de 18 minutos, en donde se obtuvieron los siguientes resultados, para el contenido de fenoles totales fue de 151.53 mg EAG/ g EL, 649.464 μM ET / 1000ppm para la capacidad reductora de hierro, el valor del EC_{50} para el DPPH de 128 ppm y el rendimiento en masa fue de 23%; Mientras que los valores reales fueron los siguientes resultados, para el contenido de fenoles totales fue de 172 ± 7 mg EAG/ g EL, 780 ± 21 μM ET / 1000ppm para

la capacidad reductora de hierro, y el valor del EC₅₀ para el DPPH de 177 ± 8 ppm y el rendimiento en masa fue de 28%. De acuerdo a lo anterior se puede decir que la metodología superficie de respuesta fue implementada exitosamente para la optimización de las condiciones de extracción obteniendo resultados mayores a los reportados por la literatura. Por esta razón la EAU con ayuda de las superficies de respuesta disminuye en gran medida el tiempo, para la extracción de fenoles totales y antioxidantes, por lo que es un método de extracción más eficaz y el ahorro de energía mayor que con cualquier otro proceso de extracción con mucho tiempo y altas temperaturas (Ghafoor *et al.*, 2009). Se puede hacer mención que los disolventes empleados y el método de extracción son más amigables con el medio ambiente.

6.3 Nanoencapsulación del extracto óptimo

Posteriormente de la validación del modelo se nanoencapsuló el extracto en las condiciones óptimas.

6.3.1 Rendimiento de las nanopartículas

De acuerdo a las ecuaciones empleadas se obtuvo lo siguiente:

En caso de las nanopartículas sin carga (control):

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{0.505 \text{ g}}{0.604 \text{ g}} \times 100$$

Obteniéndose un rendimiento de 83.60 %

En caso de las nanopartículas cargadas:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{0.9971 \text{ g}}{1.208 \text{ g}} \times 100$$

Obteniéndose un rendimiento de 82.54%

En ambos casos se obtuvo un rendimiento en masa mayor del 80 % por lo que se comprueba que el Nano Spray Dryer B-90 ofrece un nuevo, simple y enfoque alternativo para la producción de nanopartículas adecuados para una variedad de aplicaciones. (Lee *et al.*, 2011a)

6.3.2 Morfología y tamaño de partículas

De acuerdo con la microscopía electrónica de barrido, las nanopartículas de gelatina con y sin carga del extracto de muicle presentaron una morfología esférica y una distribución de tamaño uniforme (Figuras 22 y 23). De acuerdo con Lee *et al.*, (2011b) estas características pueden ser atribuidas principalmente al efecto del agente de reticulación (glutaraldehído).

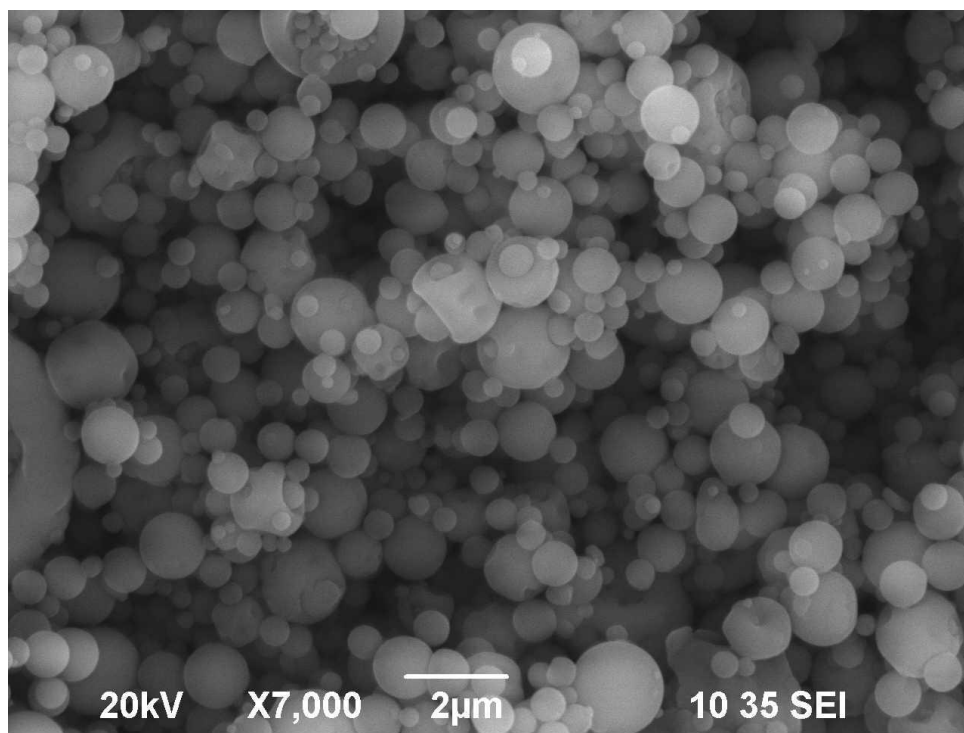


Figura 22: Micrografía de SEM de nanopartículas de gelatina (sin carga)

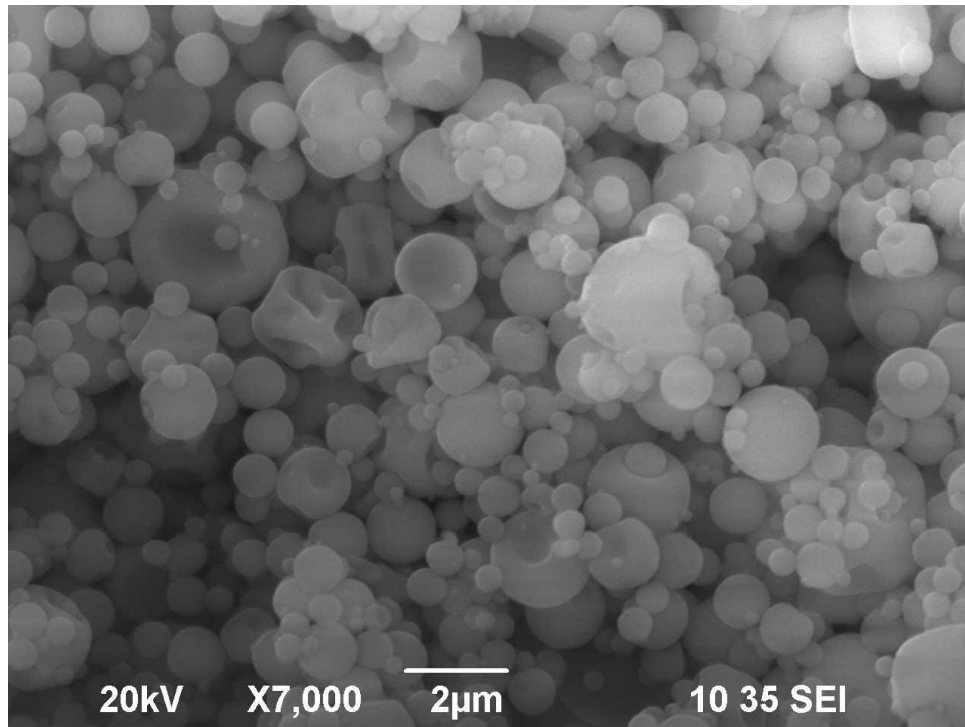


Figura 23: Micrografía de SEM de nanopartículas de gelatina con extracto de muicle.

Por otro lado, las figuras 24 y 25 muestran que los valores del tamaño de las nanopartículas siguieron una distribución normal, ajustándose al modelo de Gauss. El histograma de las nanopartículas con y sin carga brindó un coeficiente de determinación de 0.8120 y 0.7547 respectivamente. Este valor de R^2 indica que el modelo de distribución aplicado describe adecuadamente la distribución del tamaño de las nanopartículas. El tamaño de las nanopartículas con y sin carga osciló entre 200 y 1,200 nm, con un valor promedio de 526 nm para las nanopartículas sin carga mientras que el valor promedio de las nanopartículas con carga fue de 560 nm. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lee *et al.* (2011a), quienes sintetizaron nanopartículas de proteína de albumina de suero bovino mediante secado por aspersion, obteniendo tamaños de partícula promedio de 460 nm.

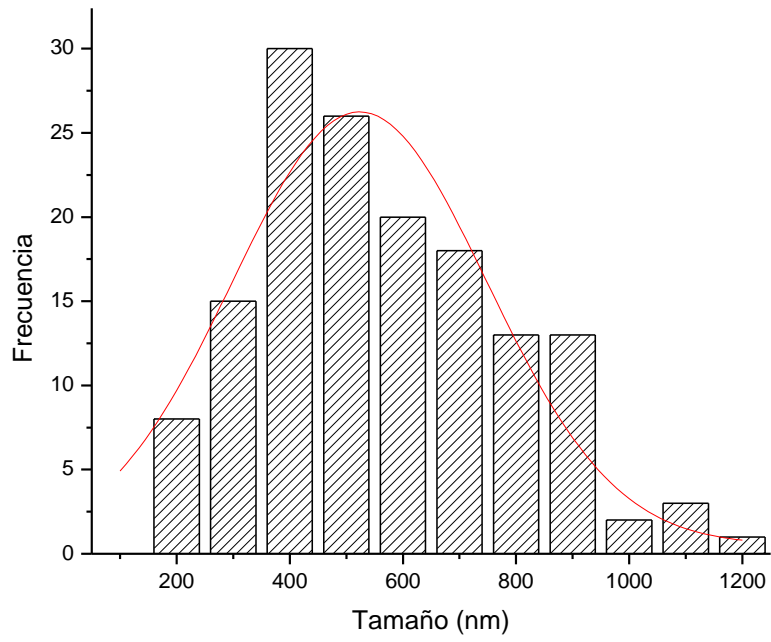


Figura 24: Histograma de las nanopartículas sin carga

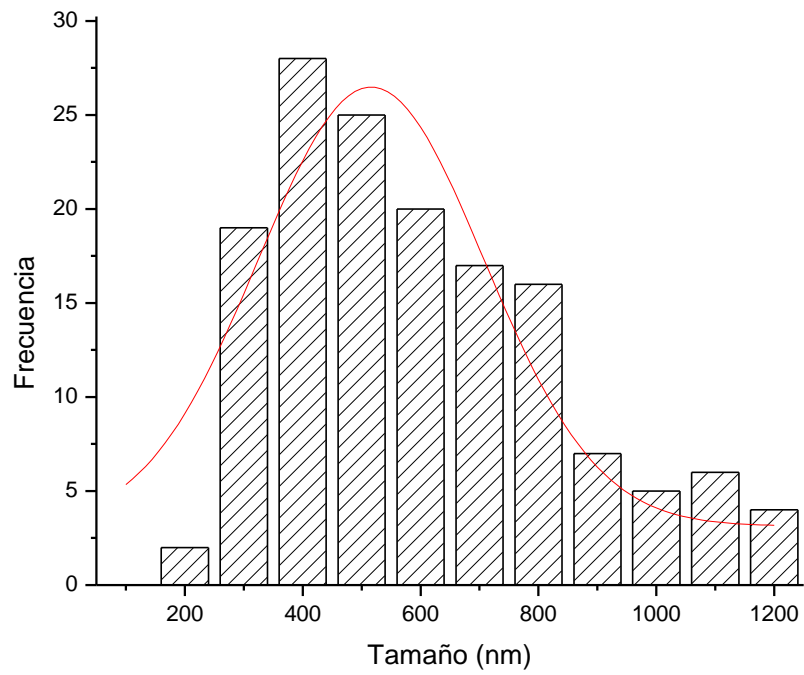


Figura 25: Histograma de las nanopartículas con carga

6.3.3 Liberación controlada del extracto de muicle.

En la figura 26 se puede observar que hubo una liberación inicial en contacto con el PBS y la enzima al tiempo cero se encontró una concentración inicial de 48 ppm mientras que en los tiempos siguientes fue aumentando, obteniendo así una liberación controlada de los compuestos fenólicos llegando a una concentración de 83 ppm en un tiempo de 6 horas. Liao *et al.* (2005), reportaron que la dexametasona empleando una proteína de suero bovino fue completamente liberada en dos horas.

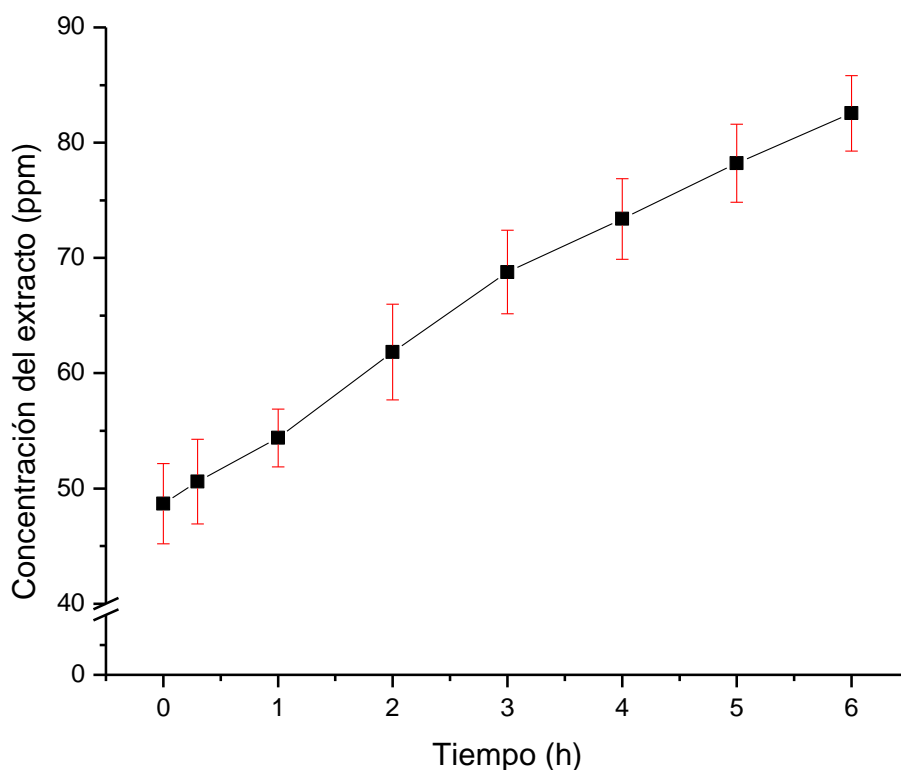


Figura 26: Liberación controlada del extracto de *Justicia spicigera* Schltldl. (nanopartículas).

Schafroth, *et al.*, (2012) indicó que el objetivo principal de la liberación controlada es simple: conseguir la cantidad correcta del agente activo, en el

momento adecuado y en el lugar preciso. Este método de liberación se usa habitualmente para prolongar el tiempo que la dosis terapéutica está presente de forma efectiva utilizando una única dosis, y para eliminar o minimizar las concentraciones que exceden los requerimientos terapéuticos. (Beck-Broichsitter, et al., 2012).

7 Conclusiones

- La metodología de superficie de respuesta fue implementada exitosamente para optimizar las condiciones de EAU de las hojas de *Justicia spicigera* Schltl.
- Las condiciones óptimas de la concentración del disolvente y el tiempo de extracción se determinaron para el máximo rendimiento de extracción de compuestos fenólicos, capacidad reductora de hierro, actividad antiradical y rendimiento en masa.
- El estudio indicó que la EAU de los compuestos bioactivos con actividad antioxidante a partir de las hojas de *Justicia spicigera* Schltl. es una alternativa eficiente en la obtención de compuestos fenólicos sin afectar sus propiedades antioxidantes. Además es un proceso verde para la preparación de extractos ricos en antioxidantes naturales destinados a la sustitución de los antioxidantes sintéticos.
- La superficie de respuesta a través del diseño de experimentos central compuesto destacó, que el contenido de fenoles, capacidad reductora de hierro, capacidad antiradical y el rendimiento fueron influenciados principalmente por la concentración del disolvente (agua-etanol).
- Las nanopartículas de gelatina cargadas con el extracto de muicle funcionaron como sistemas de liberación controlada de compuestos bioactivos en sistemas *in vitro*.
- Existe el potencial para la utilización de la planta *Justicia spicigera* Schltl. como fuente de compuestos bioactivos con actividad antioxidante en la industria alimentaria.

8 Recomendaciones

- Establecer e implementar la metodología adecuada para efectuar el aislamiento y caracterización de los compuestos bioactivos que se encuentren en *Justicia spicigera* Schldl.
- Realizar la identificación estructural de los metabolitos presentes en el muicle.
- Efectuar evaluaciones de toxicidad y las pruebas antimicrobianas, del extracto crudo y de las fracciones puras durante el proceso de aislamiento.
- Implementar un diseño de experimentos para la optimización de las variables experimentales que afectan el tamaño de partícula producidas por nano spray-drying (la concentración, naturaleza del polímero y el diámetro de malla de pulverización).
- Buscar polímeros naturales y diseño de nuevos procesos de nanoencapsulación.
- Realizar estudios *in vivo* para la valoración de tiempos de liberación de las nanopartículas.

9 Bibliografía

1. Adam-Vizi, V. (2005). Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxidants & redox signaling*, 7(9-10), 1140-1149.
2. Alonso, A. J., Villareal, M. L., Salazar, L. A., Gómez, M., Domínguez, F., & García, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 945-972.
3. Altemimi, A., Choudhary, R., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2015). Effects of ultrasonic treatments on the polyphenol and antioxidant content of spinach extracts. *Ultrasonics sonochemistry*, 24, 247-255.
4. Aybastier, Ö y Demir, C. (2010). Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on styrene–divinylbenzene copolymer using response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 63: 170–178.
5. Aybastier, Ö., Sahin, S., Isik, E., and Demir, C. (2011). Determination of total phenolic content in *Prunella L.* by horseradish peroxidase immobilized onto chitosan beads. *Analytical Methods*, 3: 2289-2297.
6. Azpeitia, M. (1996). Estudio químico de *Justicia spicigera* Schlectht. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 53.
7. Barriada-Pereira, M., Concha-Grana, E., Gonzalez-Castro, M. J., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., y Fernandez-Fernandez, E. (2003). Microwave-assisted extraction versus Soxhlet extraction in the analysis of 21 organochlorine pesticides in plants. *Journal of chromatography A*, 1008(1), 115-122.
8. Benariba, N., Djaziri, R., Bellakhdar, W., Belkacem, N., Kadiata, M., Malaisse, W. J., y Sener, A. (2013). Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. *Asian Pacific Journal of tropical Biomedicine*, 3(1), 35-40.

9. Benezzer-Benezzer, M., Castro-Mercado, E., y García-Pineda, E. (2008). La Producción de Especies Reactivas de Oxígeno Durante la Expresión de la Resistencia a Enfermedades en Plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(1), 56-61.
10. Benmehdi, H., Behilil, A., Memmou, F., y Amrouche, A. (2013). Free radical scavenging activity, kinetic behaviour and phytochemical constituents of *Aristolochia clematitis* L. roots. *Arabian Journal of Chemistry*.
11. Beck-Broichsitter, M., Schweiger, C., Schmehl, T., Gessler, T., Seeger, W., and Kissel, T. (2012). Characterization of novel spray-dried polymeric particles for controlled pulmonary drug delivery. *Journal of Controlled Release* 158, 329-35.
12. Benzie, I., and Strain, J. (1966). The Ferric reducing ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
13. Bezerra, M., Santelli, R., Oliveira, E. , Villar, L., and Escaleira, L. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76: 965–977.
14. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009).
Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Recuperado el 28 de Mayo de 2015, de UNAM:
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=M uicle&id=7981>
15. Biesaga, M. (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1218(18): 2505-2512.
16. Brachet, A., Rudaz, S., Mateus, L., Christen, P., y Veuthey, J. L. (2001). Optimisation of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Journal of Separation Science*, 24(10-11), 865-873.
17. Camel V. (2001). Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*, 126(7), 1182-1193.

18. Cevallos, F., y Sergio, R. (1998). Las plantas con flores. México D.F.: Ciencias.
19. Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M., y Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical journal*, 91(1), 107-110.
20. Chan, C. H., Yusoff, R., Ngho, G. C., & Kung, F. W. L. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6213-6225.
21. Chemat, F., y Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(4), 813-835.
22. Chen, M., Zhao, Y., y Yu, S. (2015). Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food chemistry*, 172, 543-550.
23. Cruz-Terán, E. M., (2000) Efecto de la Fuente de Lípidos Dietarios en la Sobrevivencia, Crecimiento y Metamorfosis de Larvas de Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis. Universidad del Mar. Oaxaca, México.
24. de Souza, A., Vendramini, R., Brunetti, I., Regasini, L., Bolzani, V., Silva, D., y otros. (2009). Continuous treatment with alcohol extract from *Pterogyne nitens* leaves does not alter typical variables of experimental diabetes. *Revista brasileira de farmacognosia*, 19:2-19.
25. Dimitrios, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(9), 505-512.
26. Discover Life. (2013). Natural Resources Conservation Service. Recuperado el 26 de Noviembre de 2015, de USDA: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Justicia+spicigera&flags=col2>
27. Domínguez XA. (1973). Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa. México. pp. 39-44, 141-143, 211-228, 246.

28. Domínguez, X., Achenbach, H., González, C., y Ferré-D' Amore, A. (1990). Estudio químico del "muitle" (*Justicia spicigera*). *Revista Química Latinoamericana.*, 21: 142-143.
29. Embuscado M., (2015) Herbs and spices as antioxidants for food preservation en Handbook of Antioxidants for Food Preservation.
30. Eskilsson, C. S., y Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.
31. Euler, K., y Alam, M. (1982). Isolation of Kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *Journal of Natural Products*, 45: 220-221.
32. Fabricant DS, F. N. (2001) "The value of plants used in traditional medicine for drug discovery." *Environmental Health Perspectives*, 109: 69-75.
33. Fang, Z., y Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523.
34. Gadkari, P. V., y Balaraman, M. (2015). Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. *Food and Bioproducts Processing*, 93, 122-138.
35. Gallo, L., Piña, J., Bucalá, V., Allemandi, D., Ramírez-Rigo, M. V., (2013) Development of a modified-release hydrophilic matrix system of a plant extract based on co-spray-dried powders, *Powder Technology* 241, 252–262
36. Gan, C., y Latiff, A. A. (2011). "Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology." *Food Chemistry*, 124:1277–1283,
37. García, E. (2008). Protección y estabilización de compuestos fenólicos obtenidos a partir de muitle (*Justicia spicigera*), por medio de su interacción intermolecular con proteína de soya. Universidad Autónoma Metropolitana, México. p 7.
38. García-Viguera, C., Zafrilla P., Tomás-Barberán F. A. (1998). The use of acetona as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit. *Phytochemical Analysis*. 9: 274-277.
39. Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., y Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and

- anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4988-4994.
40. Halliwell, B. (2008) "Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health?" *Cardiovascular Research* 73:341–347.
41. Halliwell, B., y Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal Pharmacology*, 142: 231-155.
42. Harborne, J. B. and Simmonds, N. W., (1964), Biochemistry of Phenolic Compounds, *Academic Press*, London, pp 101.
43. Hernández, O. S. (2014). Extracción y caracterización de compuestos fenólicos. obtenidos del muicle (*Justicia spicigera* schl.) Universidad Nacional Autónoma de México, México. 37-38.
44. Herrera-Arellano, A., Jaime-Delgado, M., Herrera-Alvarez, S., Oaxaca-Navarro, J., Salazar-Martinez, E. (2009). Uso de terapia alternativa/complementaria en pacientes seropositivos a VIH. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 47: 651–658.
45. Hersch M., P. (1997). Medicinal plants and regional traders in Mexico: Physiographic differences and conservational challenge. *Economy Botany*, 51(2): 107-120.
46. Iacopini P., Baldi, M., Storchi, P., y Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 589-598.
47. INEGI (2013). Mortalidad, Causas de defunción. Principales causas. Total 2013. Recuperado el 18 de Mayo de 2015, de <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>
48. Instituto de Biología. "***Justicia spicigera* Schtdl.** - *IBUNAM:MEXU:PV525864*". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2010-05-27. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2015-5-28.

Disponible en:

<<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PV525864>>

49. Ishige K., Schubert D., Sagara Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms, *Free Radical Biology & Medicine*, 30: 433–446.
50. Janiszewska, E., Jedlińska, A., Witrowa-Rajchert, D., (2014) Effect of homogenization parameters on selected physical properties of lemon aroma powder, *Food and Bioproducts Processing*
51. Jin-Ming K., Lian-Sai C., Ngoh-Khang G., Tet-Fatt C. Brouillard R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry*, 64:923-933
52. Katsube N., Keiko I., Tsushida T., Yamaki K., Kobori M. (2003). Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins, *Journal Agricultural Food Chemistry*, 51: 68–75.
53. Kiassos, E., Mylonaki, S., Makris, D. P., y Kefalas, P. (2009). Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa*) solid waste phenolics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 246–252,
54. Klejdus, B., Kopecký, J., Benešová, L., y Vacek, J. (2009). Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *Journal of Chromatography A*, 1216(5), 763-771.
55. Koffi E., Sea T., Dodehe Y., Soro S. (2010). Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants, *Journal of Animal & Plant Sciences*, 5(3): 550- 558.
56. Kovacic, P. y Somanathan, R. (2013). Nanoparticles: Toxicity, Radicals, Electron Transfer, and Antioxidants. En *Oxidative Stress and Nanotechnology Methods and Protocols* (15-36). USA: *Humana Press*.

57. Kumari, A., Yadav, S. K., y Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 1-18.
58. Lee, S. H., Heng, D., Ng, W. K., Chan, H. K., y Tan, R. B. (2011a). Nano spray drying: a novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 403(1), 192-200.
59. Lee, E. J., Khan, S. A., Park, J. K., y Lim, K. H. (2011b). Studies on the characteristics of drug-loaded gelatin nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(1-2), 297-307.
60. Lee, J., Ye, L., William, O., Eitenmiller Jr., Ronaldo, R. (2000). Optimization of an extraction procedure for the quantification of vitamin E in tomato and broccoli using response surface methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13:45–57.
61. Leopoldini, M., Russo, N., y Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288-306.
62. Li, H., Chen, B., y Yao, S. (2005). Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 12:295–300.
63. Liao I-C, Wan ACA, Yim EK, Leong KW (2005) Controlled release from fibers of polyelectrolyte complexes. *Journal of Control Release* 104:347–358
64. Lollo, G. (2012). Nanocápsulas de poliaminoácidos para la liberación selectiva de fármacos antitumorales.
65. López-Angulo, G., Montes-Avila, J., Díaz-Camacho, S. P., Vega-Aviña, R., Ahumada-Santos, Y. P., y Delgado-Vargas, F. (2014). Chemical composition and antioxidant, α -glucosidase inhibitory and antibacterial activities of three *Echeveria* DC. species from Mexico. *Arabian Journal of Chemistry*.

66. Lopez-Rubio, A., Gavara, R., y Lagaron, J. M. (2006). Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science & Technology*, 17(10), 567-575.
67. Luque de Castro, M., y García-Ayuso, L. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 356: 1-10.
68. Ma, Y., Chen, J., Liu, D., and Ye, X. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts, effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16: 57–62.
69. Maizura, M. Aminah, A. and Wan Aida, W. M. (2010). Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*polygonum minus*), ginger (*zingiber officinale*) and turmeric (*curcuma longa*) extract. *Journal International Food Research* 17: 45-53.
70. Márquez, A., Lara-Ochoa, F., Esquivel-Rodriguez, B., Mata, R. (1999). Plantas Medicinales de México II Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México, p. 178.
71. Martínez, M. (1992). Las plantas medicinales de México (Sexta ed.). México D.F.: Botas.
72. Martínez, M. (1996). Plantas medicinales mexicanas. México D.F.: Botas.
73. Mason, T. J., Paniwnyk, L., y Lorimer, J. P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics sonochemistry*, 3(3), S253-S260.
74. Mayne ST. (2003). "Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research". *Journal of Nutrition*. 133: 933-940,
75. Miliauskas, G., Venskutonis, P., y Van Beek, T. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85(2), 231-237.
76. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin *Journal of Science Technology*, 26(2), 211-219.

77. Monroy, C., y Castillo, P. (2007). Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. (Segunda ed.). México.: CONABIO.
78. Montgomery D. C. (2004), Diseño y Análisis de Experimentos, Editorial Limusa Wiley, Yucatán, Mexico, 2° Edición.
79. Naidu, P. S., Kinsey, S. G., Guo, T. L., Cravatt, B. F., & Lichtman, A. H. (2010). Regulation of inflammatory pain by inhibition of fatty acid amide hydrolase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 334(1), 182-190.
80. Ncube, N. S., Afolayan, A. J., y Okoh, A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African journal of biotechnology*, 7(12).
81. Nguyen, A.T., and Donaldson, R.P. (2005). Metal-catalyzed oxidation induces carbonylation of peroxisomal proteins and loss of enzymatic activities. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 439: 25–31.
82. Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., y Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815.
83. OMS, 2010. World Health Statistics 2010. World Health Organization, Geneva. <<http://www.who.int/whosis/whostat/2010/en/>>. (Recuperado el 02.06.15).
84. Oroian, M., y Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.
85. Ortiz R., Cabañas A., Arana V., Alonso A., Zapata R., Salazar L., Domínguez F., Chávez M., Carranza C., García A. (2012). Antidiabetic effects of Justicia Spicigera Schltidl (Acanthaceae), *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 455–462.
86. Ortiz-Andrade, R., Cabañas-Wuan, A., Arana-Argáez, V. E., Alonso-Castro, A. J., Zapata-Bustos, R., Salazar-Olivo, L. A., y García-Carrancá, A. (2012). Antidiabetic effects of Justicia spicigera Schltidl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 455-462.

87. Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G. y McHugh, T. (2011). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18: 1249–1257.
88. Pedroza-Islas, R., Macías-Bravo, S., y Vernon-Carter, E. J. (2002). Oil thermo-oxidative stability and surface oil determination of biopolymer microcapsules. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 1(1).
89. Perl-Treves y R, Perl A (2002) Oxidative stress: An introduction. In: Inzé D, Van Montagu M (eds), *Oxidative Stress in Plants*, pp.1-32. *Taylor & Francis*, London.
90. Piñeiro, Z., Palma, M., y Barroso, C. G. (2004). Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids. *Journal of chromatography A*, 1026(1), 19-23.
91. Quiroz-Reyes, C., Aguilar-Méndez, M., Ramírez-Ortiz, M., y Ronquillo-De Jesús, E. (2013). Comparative study of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(1), 11-18.
92. Quiroz-Reyes C.N., Ronquillo-De Jesús E., Duran-Caballero N.E., Aguilar-Méndez M.A. (2014). Development and characterization of gelatin nanoparticles loaded with a cocoa-derived polyphenolic extract, *Fruits*, 69, 481–489.
93. Rao, P. R., y Rathod, V. K. (2015). Mapping study of an ultrasonic bath for the extraction of andrographolide from *Andrographis paniculata* using ultrasound. *Industrial Crops and Products*, 66, 312-318.
94. Roberts, C. K., y Sindhu, K. K. (2009). Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life sciences*, 84(21), 705-712.
95. Roche Collado, E., y Romero Alvira, D. (1994). Estrés oxidativo y degradación de proteínas. *Medicina clínica*, 103(5), 189-196.
96. Rodrigues S., Pinto G., Fernandes F. (2008). Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology, *Ultrasonics Sonochemistry* 15 (1): 95–100.

97. Rostagno M., Palma M., Barroso C. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones, *Journal of Chromatography A*, 1012:119–128.
98. Salar Bashi, D., Mortazavi, S. A., Rezaei, K., Rajaei, A., y Karimkhani, M. M. (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Yarrow (*Achillea beibrestinii*) by response surface methodology. *Food Science and Biotechnology*, 21(4):1005–1011.
99. Schafroth, N., Arpagaus, C., Jadhav, U.Y., Makne, S., and Douroumis, D. (2012). Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 90, 8-15.
100. Scherer, R., y Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112(3), 654-658.
101. Sepúlveda-Jiménez G., Reyna-Aquino C., Chaires-Martínez L., Bermúdez-Torres K., Rodríguez-Monroy M. (2009). Antioxidant Activity and Content phenolic compounds and flavonoids from *Justicia Sipicigera*. *Journal of Biological Sciences* 9(6):629-632
102. Shahidi, F., y Wanasundara, P. K. P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 67–103.
103. Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., y Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(20), 7749-7759.
104. Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. (Primera ed.). Colombia.
105. Sheng, Z. L., Wan, P. F., Dong, C. L., y Li, Y. H. (2013). Optimization of total flavonoids content extracted from *Flos Populi* using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 43, 778-786.
106. Singleton V. and Rossi J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

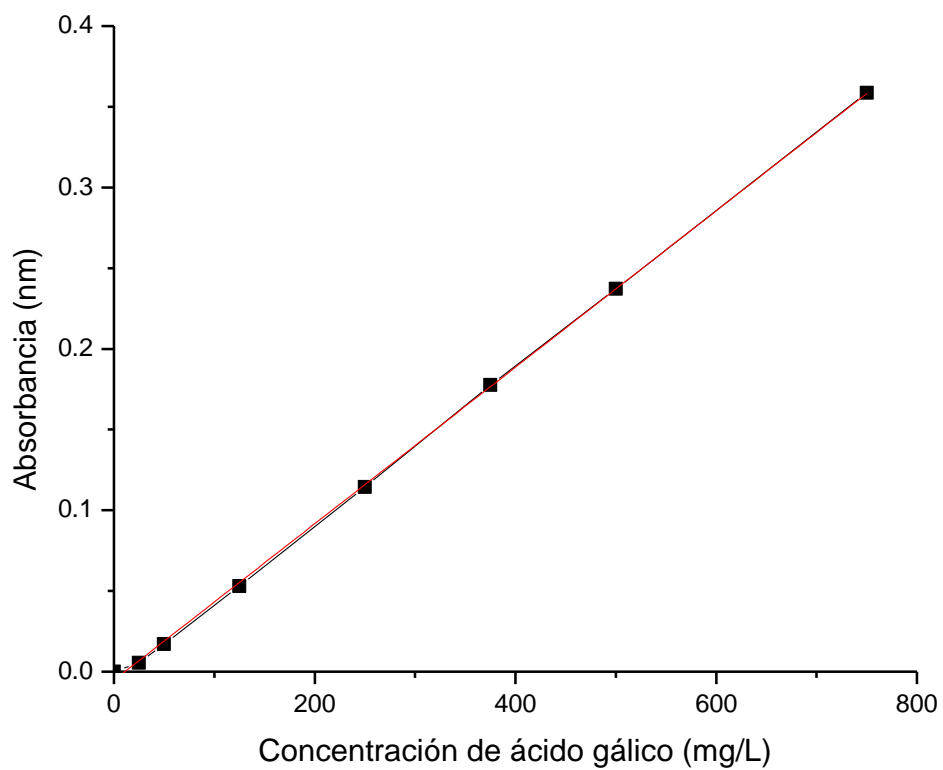
107. Siqueira, S., dos Santos Falcão-Silva, V., de Fátima Agra, M., Dariva, C., de Siqueira-Júnior, J. P., y Vieira Fonseca, M. J. (2011). Biological activities of *Solanum paludosum* Moric. extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 58: 391-397.
108. Souto, E. B., Severino, P., Basso, R., y Santana M. H. (2013). Encapsulation of Antioxidants in Gastrointestinal-Resistant Nanoparticulate Carriers. En *Oxidative Stress and Nanotechnology Methods and Protocols* (37-46). USA: *Humana Press*.
109. Spigno, G., Tramelli, L., y De Faveri, D. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81: 200-208.
110. Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18), 3268-3295.
111. Tabaraki, R., Heidarizadi, E., y Benvidi, A. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 98, 16-23.
112. Teh, S. S., y Birch, E. J. (2014). Effect of ultrasonic treatment on the polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola seed cakes. *Ultrasonics sonochemistry*, 21(1), 346-353.
113. Temple, N. J. (2000). Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition Research*, 20(3), 449-459.
114. Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, 552(2), 335-344.
115. Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., y Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*, 7(1), 65.

116. USDA. (2013). Natural Resources Conservation Service. Plant database. Recuperado el 08 de Septiembre de 2013, de United States Department of Agriculture: <http://plants.usda.gov/java/nameSearch?keywordquery=justicia+spicigera&mode=sciname&submit.x=0&submit.y=0>
117. Vermerris W. y Nicholson, R. (2008) Phenolic compound biochemistry, Springer Science+Business Media B.V., Berlin.
118. Virost M., Tomao V., Le Bourvellec C., Renard C., Chemat F. (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound assisted extraction, *Ultrasonics Sonochemistry*, 17:1066–1074.
119. Wang J., y Mazza G. (2002). Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages, *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 50:4183–4189.
120. Wang J., Sun B., Cao Y., Tian Y., Li X. (2008). Optimization of ultrasounded-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran, *Food Chemistry*, 106: 804–810.
121. Wang L., y Weller C. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends Food Science and Technology*, 17:300–312.
122. Wang, J., Zhao, Y. M., Tian, Y. T., Yan, C. L., y Guo, C. Y. (2013). Ultrasound-assisted extraction of total phenolic compounds from *Inula helenium*. *The Scientific World Journal*, 2013.
123. Waterhouse, A.L. (2002). Determination of total phenolics. In: R.E. Wrolstad (Ed) Current Protocols in Food Analytical Chemistry (Units I.1.1.1-I.1.1.8). New York, *John Wiley and Sons*.
124. Wong, C. C., Li, H. B., Cheng, K. W., y Chen, F. (2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97(4), 705-711.

125. Wootton-Beard, P. C., y Ryan, L. (2011). Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International*, 44(10), 3135-3148.
126. Wootton-Beard, P. C., Moran A., Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods *Food Research International*, 44, 217-224.
127. Yin Y, Huang X, Lv C, Wang L, Yu S, Luo Q, Xu J, Liu J. (2010). Construction of an artificial glutathione peroxidase active site on copolymer vesicles. *Macromolecular Bioscience* 10(12), 1505–1516.

Anexos

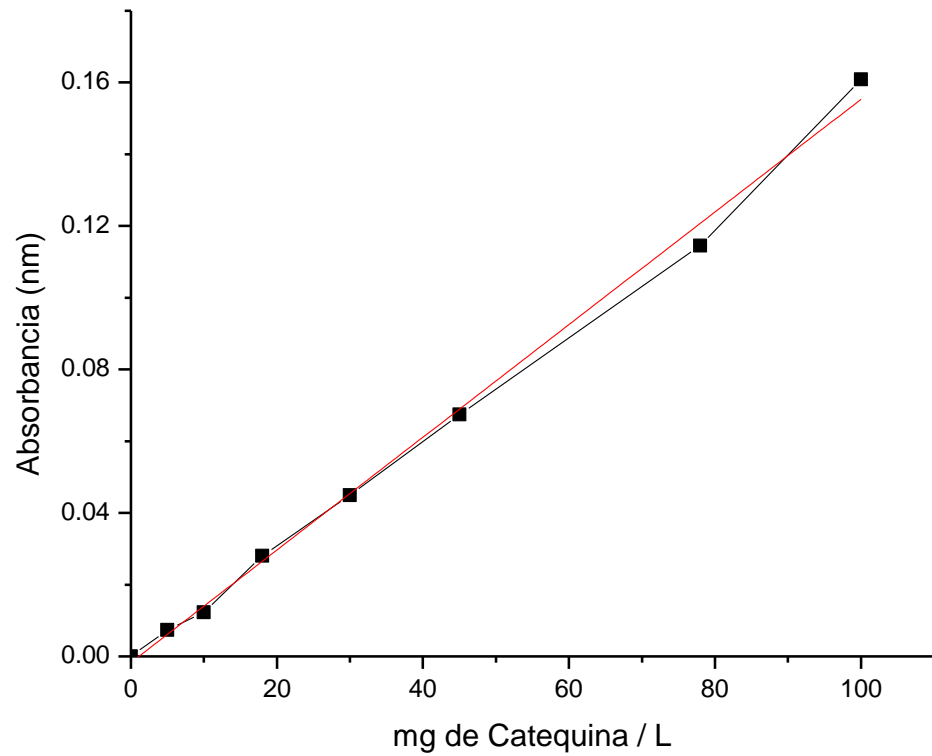
1.- Curva de calibración de ácido gálico



$$R^2 = 0.9996$$

$$y = 0.0005x - 0.0053$$

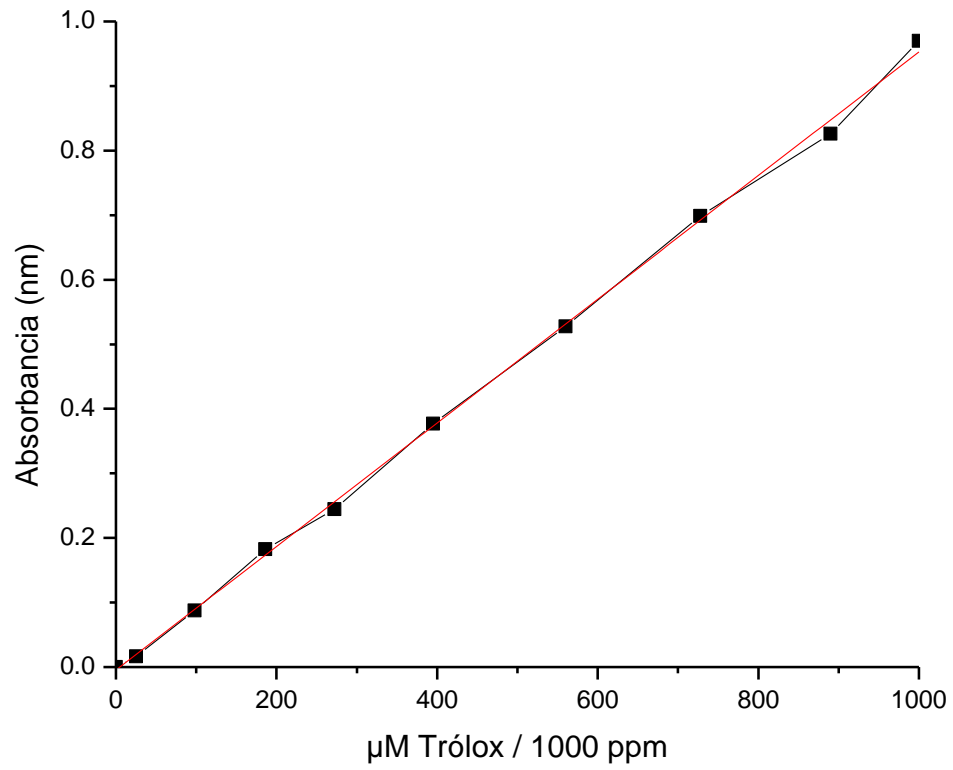
2.- Curva de calibración de catequina



$$R^2 = 0.99821$$

$$y = 0.0015x - 0.0001$$

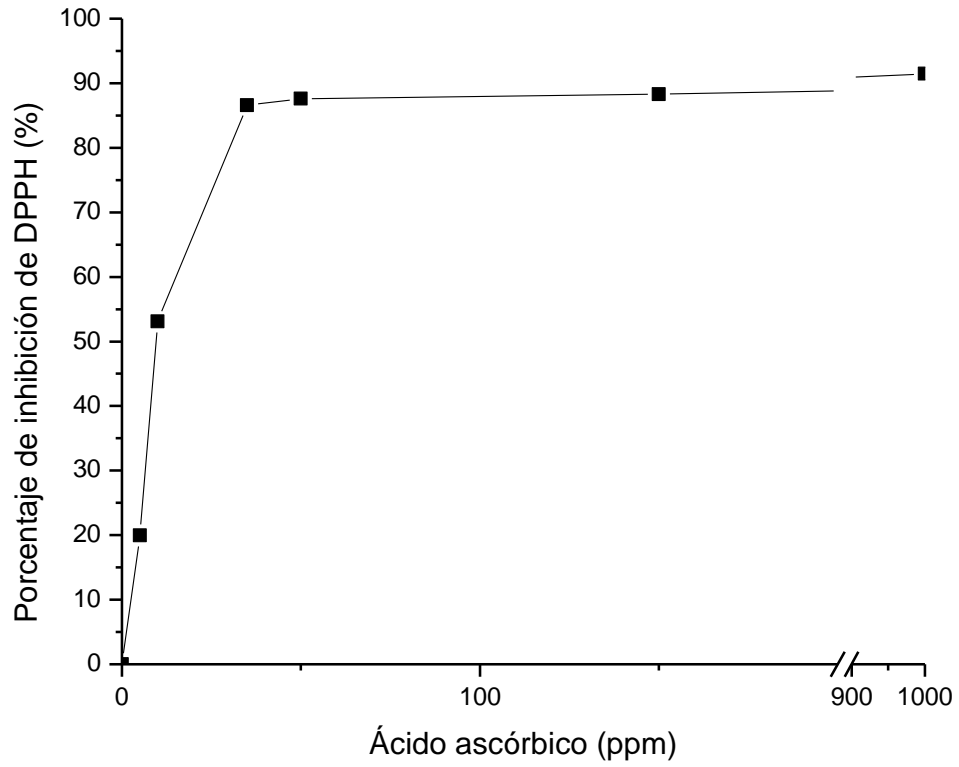
3.- Curva de calibración de trolox



$$R^2 = 0.999$$

$$y = 0.001x - 0.0048$$

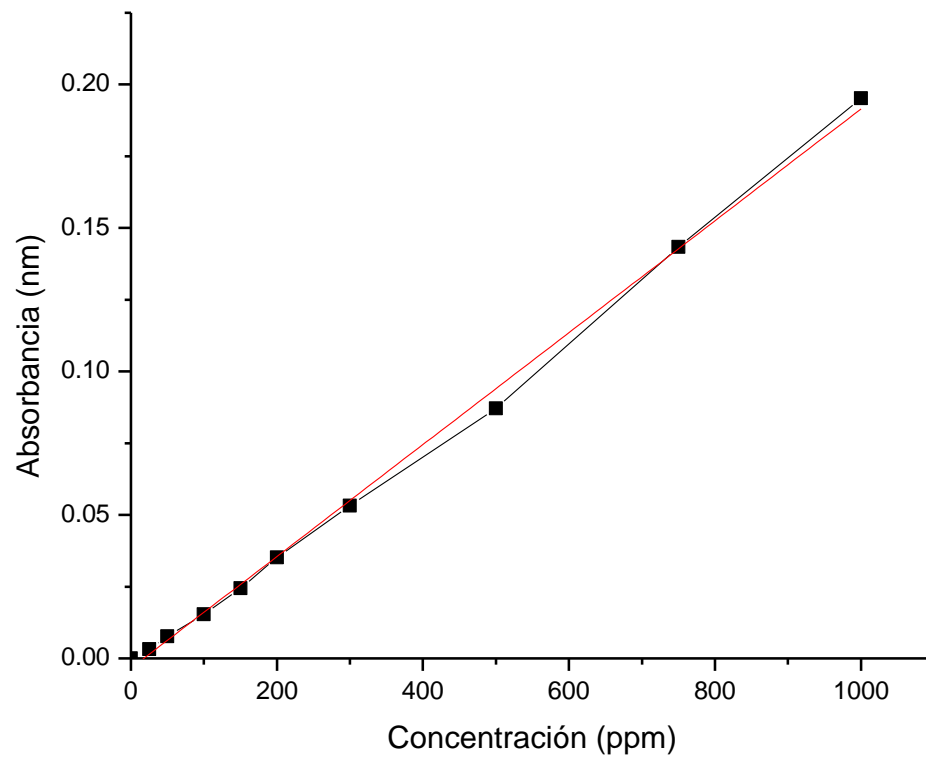
4.- Control ácido ascórbico (DPPH)



$$EC_{50} = 9.53 \text{ ppm}$$

5.- Curva de calibración concentración del extracto del muicle

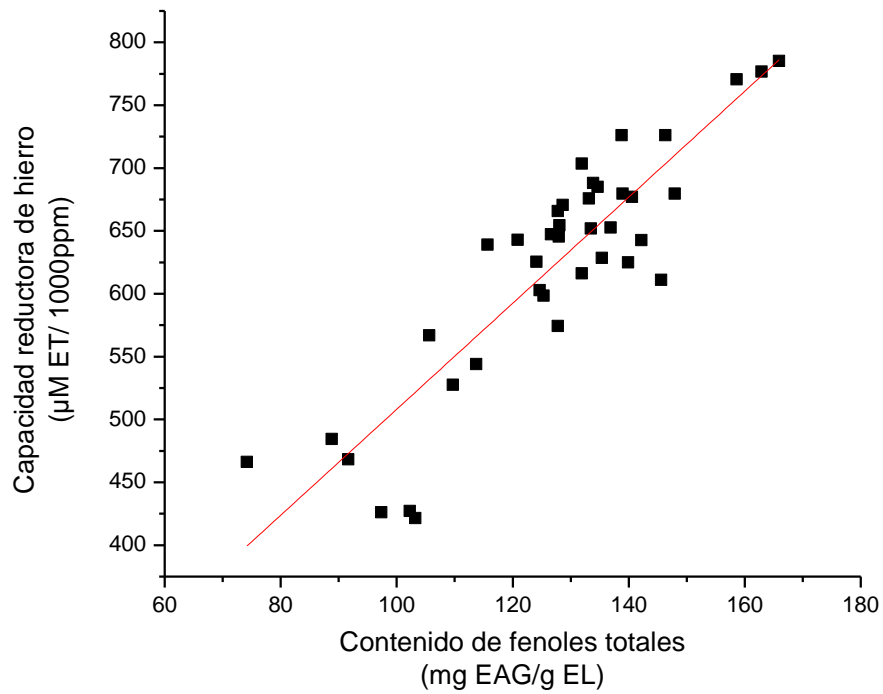
$\lambda = 665 \text{ nm}$



$$R^2 = 0.9978$$

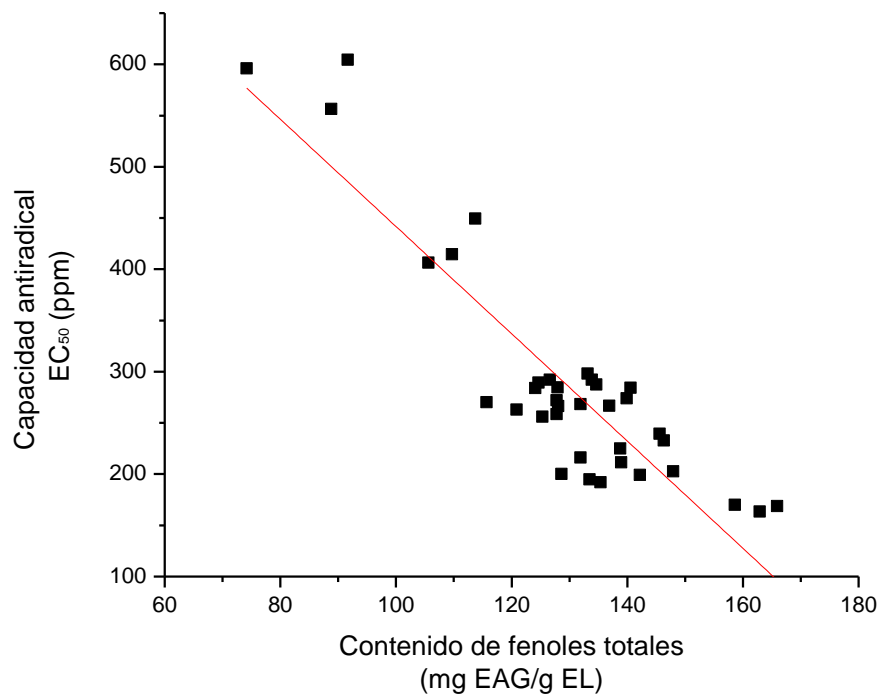
$$y = 0.0002x - 0.0035$$

6.- Correlación entre el contenido de fenoles y capacidad reductora de hierro



$$R^2 = 0.78$$

7.- Correlación entre el contenido de fenoles y la capacidad antiradical (EC₅₀)



$$R^2 = 0.79$$