

Artículo original

# Composición química y actividad biológica de los extractos de las partes aéreas de *Leonurus japonicus* (Houtt.).

Chemical composition and biological activity of extracts of aerial parts of *Leonurus japonicus* (Houtt.).

Malave María José<sup>1</sup>, Mendoza Zulimar<sup>1</sup>, Morillo Marielba<sup>1\*</sup>, Visbal Tomas<sup>2</sup>, Rondón María Eugenia<sup>3</sup>, Carmona Juan<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, <sup>2</sup>Departamento de Ciencias de Los Alimentos. <sup>3</sup>Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos. Universidad de Los Andes. Mérida CP 5101, República Bolivariana de Venezuela.

Recibido: julio de 2019 – Aceptado: septiembre de 2019

## RESUMEN

*Leonurus japonicus* Houtt. (Lamiaceae), es una especie que ha sido estudiada en las últimas tres décadas, muchos investigadores se han centrado en la determinación de su composición química, las actividades farmacológicas y sus aplicaciones, logrando aislar más de 280 compuestos químicos de esta especie. El objetivo de esta investigación fue estudiar la composición química y actividad biológica de los extractos obtenidos de las partes aéreas, de *L. japonicus*, recolectada en el estado Mérida, Venezuela. El análisis fitoquímico preliminar mostró la presencia de esteroides en los extractos hexanoico y diclorometanoico; y alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides y esteroides en el extracto etanólico. El extracto etanólico presentó un contenido fenólico total de 0,89 µg AG/mg. La actividad antioxidante fue determinada empleando el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), siendo el extracto etanólico el más activo ya que mostró un IC<sub>50</sub> de 0,457 mg/mL; a la concentración de 0,5 mg/mL, el porcentaje de inhibición del radical DPPH fue 57,7 % en comparación a un 96,1 % del ácido ascórbico utilizado como control positivo, a la concentración de 0,176 mg/mL. Además, dicho extracto resultó

ser relativamente inocuo sobre nauplios de *Artemia salina*, con un porcentaje de letalidad de 8,3 a 2500 ppm, y la DL<sub>50</sub> de 2913,55 ppm. Cabe destacar que este es el primer reporte de actividad antioxidante, cuantificación de fenoles totales y toxicidad sobre *A. salina* de los extractos de *L. japonicus*, recolectada en Mérida, Venezuela.

## PALABRAS CLAVE

*Leonurus japonicus* Houtt, Lamiaceae, actividad antioxidante, letalidad, *Artemia salina*.

## ABSTRACT

*Leonurus japonicus* Houtt. (Lamiaceae), is a specie that has been studied in the last three decades, many researchers have focused on determining their chemical composition, pharmacological activities and their applications, managing to isolate more than 280 chemical compounds of this. The objective of this research was to study the chemical composition and biological activity of the extracts obtained from the aerial parts of *L. japonicus*, collected in Mérida, Venezuela. Preliminary phytochemical studies showed the presence of sterols in hexanoic and dichloromethane extracts, and alkaloids, phenols

compounds, flavonoids and sterols in the ethanolic extract. In present investigation, the ethanolic extract had a total phenolic content of 0.89  $\mu\text{g}$  AG/mg extract. The antioxidant activity was determined using the DPPH method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) using spectrophotometry UV-visible at a wavelength of 517 nm. The ethanolic extract showed an  $\text{IC}_{50}$  of 0.457 mg/mL, at the concentration of 0.5 mg/mL, inhibition percentages of these radicals was 57.7% compared to 96.1% of the ascorbic acid, used as a positive control, at the concentration of 0.176 mg /mL. In addition, this extract proved to be relatively harmless on *Artemia salina* nauplii, with a lethality percentage of 8.3 to 2500 ppm, and the  $\text{LD}_{50}$  of 2913.55 ppm. It should be noted that this is the first report of antioxidant activity, quantification of total phenols and toxicity on *A. salina* from the extracts of *L. japonicus*, collected in Venezuela.

## KEY WORDS

*Leonurus japonicus* Houtt, Lamiaceae, antioxidant activity, lethality, *Artemia salina*.

## INTRODUCCIÓN

La familia Lamiaceae (Labiatae), es la sexta familia de plantas más grande que existe con más de 200 géneros y más de 7000 especies [1]. La organización mundial de la salud, sugiere que algunas plantas pertenecientes a esta familia con una larga historia de usos y efectos terapéuticos, deben ser estudiadas, con la finalidad de encontrar nuevos principios activos con propiedades para su uso terapéutico en ciertas enfermedades [2]. En América del Sur, la mayor representación de la familia Lamiaceae se encuentra en Brasil y en Venezuela consta de 26 géneros y alrededor de 120 especies [3].

La especie *Leonurus japonicus* Houtt. (Labiatae), comúnmente llamada “agripalma china” o “cola de león”, nativa de varias regiones de Asia, incluidas China, Corea, Japón y Camboya. Además de encontrarse presente en algunas regiones de Europa, África, Norte y Sur América. Se ha usado para tratar menoxenia, dismenorrea, amenorrea, loquios, edema del cuerpo, oliguresis,

llagas, ulceraciones y otras enfermedades en mujeres [4].

Desde 1990, se han desarrollado numerosas investigaciones sobre los componentes químicos y actividades farmacológicas de esta planta, debido a su importante papel en las enfermedades de la mujer; sin embargo, todavía hay falta de información sobre su aplicación clínica. A pesar de esto, se ha reportado la composición química de esta especie detectándose la presencia de alcaloides, diterpenos, flavonas, nor-triterpenoides espirociclicos, glicósidos feniletanoides, glicósidos sesquiterpenos, compuestos volátiles y otros compuestos. Particularmente, el alcaloide stachidrina aislado de *L. japonicus*, que se utiliza como indicador oficial de la calidad de esta hierba y de sus preparaciones [4].

Miao y col (2019) [5], recopilaron los estudios de varios investigadores, y reportaron el aislamiento de más de 280 compuestos en esta especie, distribuidos de la siguiente manera: 90 diterpenoides; 36 triterpenoides incluyendo 11 nor triterpenoides inusuales; 35 flavonoide incluyendo 10 flavonas, 24 flavonoles y una iso flavona; 7 fenilpropanoides simples, 11 cumarinas y 5 lignanos; además de una serie de glicósidos hepatoprotectores leonosido E, cistanosido E y leonosido F.

Además, los alcaloides son los principales componentes químicos activos, que se encuentran presentes en *L. japonicus*, en un alto contenido de los cuales se han aislado muchos subtipos como: guanidinas, espermidinas, piridinas, nucleósidos, alcaloides esteroideos, derivados de aminoácidos y ciclopéptidos, además de tres guanidinas naturales inusuales y se ha aislado ampliamente la stachidrina y leonurina [5].

Los estudios farmacológicos modernos muestran que los componentes activos de plantas del género *Leonurus*, más específicamente de la especie *L. japonicus*, poseen amplias acciones farmacológicas, tales como: acciones cardioprotectoras, analgésicas, antiinflamatorias, neuroprotectoras, antitrombótica, vasodilatador, anti agregación plaquetaria, inhibidor de la  $\alpha$ -glicosidasa, inhibidor de la colinesterasa, regulador de la producción de melanina, regulador de la actividad inmune, antibacterial, citotóxica, protector de miocardio, antisquémico, angiogenica,

anti-arteriosclerótica, protector cerebral, actividad promotora de la contracción uterina, anti-metrorragia, anti-tumoral, antidiabética, antioxidante, hepatoprotectora [4,5].

Esta investigación tiene como objetivo determinar la composición química cualitativa, contenido de polifenoles, actividad antioxidante y toxicidad sobre *Artemia salina* de los extractos de las partes aéreas de *Leonurus japonicus* Houtt, recolectada en Mérida, Venezuela.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Recolección de la muestra

El material vegetal fue recolectado en el sector Portachuelo, vía Jají, Municipio Campo Elías, Parroquia Montalbán, Mérida, Venezuela, a una altitud aproximadamente de 1781 msnm. La planta fue identificada botánicamente por el Ing. Juan Carmona, adscrito al Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA. Se depositó una muestra en el herbario "Dr. Luis Enrique Ruiz Terán" (MERF), de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA, Mérida, identificado como voucher, número 03 de la colección (29/05/2017).

### Obtención de los extractos de las partes aéreas de *L. japonicus* Houtt.

Se utilizaron hojas, tallo y flores de la planta, se cortaron en trozos pequeños, se secaron en una estufa a 40 °C durante 48 horas, se procedió a moler y pesar en una balanza Denver Instrument XL 3100, se pesaron 200 g del material vegetal seco. Se preparó el extracto hexanoico, por maceración a temperatura ambiente, para tal fin, se colocó el material vegetal en 200 mL de hexano y se dejó macerar por 48 horas, se procedió a filtrar y concentrar el extracto hasta sequedad empleando el rotaevaporador IKA RV 10 digital a 45 °C. Este procedimiento se repitió dos veces más. De la misma forma, se obtuvieron los extractos diclorometanoico y etanólico de la planta. Se recuperaron 1,8 g del extracto hexanoico (0,9 %), 2,11 g del extracto diclorometanoico (1,06 %) y 1,23 g del extracto etanólico (0,62 %).

### Estudio fitoquímico preliminar

Para la caracterización química de los metabolitos secundarios presentes en los extractos hexanoico, diclorometanoico y etanólico, de las partes aéreas de *L. japonicus* se efectuó una serie de pruebas químicas cualitativas siguiendo la metodología descrita por Marcano y Hasegawa (2002) [6].

### Actividad antioxidante método DPPH

Todos los reactivos químicos utilizados, incluyendo los disolventes fueron de grado analítico. El reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) es de Sigma-Aldrich, el ácido ascórbico y metanol son de la marca Merck. Se utilizó un Espectrofotómetro UV-Visible Spectronic GENESYS TM 10 Bio, para evaluar el comportamiento de los extractos como agentes antioxidantes.

La evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos hexanoico, diclorometanoico y etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*, se realizaron siguiendo el ensayo del test de actividad secuestrante de radicales libres del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), según la metodología descrita por Goupy [7]; Molyneux 2004 [8]; Díaz y col., 2011 [9]; Plaza y col., 2014 [10] y Contreras-Moreno y col., 2017 [11].

Esta técnica consistió en preparar una solución stock de cada uno de los extractos, tomando 4 mg de cada uno, en tubos eppendorf y se disolvieron en 1mL de metanol, el ensayo se realizó por triplicado para cada uno de los extractos, para tal fin, se prepararon 3 tubos de cada uno, que contenían 700 µL de DPPH ( $6 \times 10^{-2}$  mM) y 300 µL del extracto, se dejó en reposo en la oscuridad por 30 minutos. Pasado los 30 minutos se procedió a medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 517 nm, con el extracto que presentó un porcentaje de inhibición (% I) del radical DPPH igual o superior a 50 %, se preparó una solución stock (1 mg/mL) y a partir de la misma se realizaron varias diluciones (0,75; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 mg/mL) y se procedió a determinar la actividad antioxidante. Se realizó una curva patrón con ácido ascórbico, partiendo de una solución madre con una concentración de 1 mM (17,6 mg en 100 mL de metanol). El porcentaje de inhibición (% I) de radicales libres de DPPH•, se calculó mediante la siguiente ecuación:  $\%I = [(A_{DPPH} - A_{Extracto}) / A_{DPPH}] \times 100$ . En función de la

concentración del analito se calculó por regresión lineal para cada muestra la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) [7, 10,11].

#### **Estudio estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistic editor de datos, versión 21 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Con la finalidad de determinar diferencias estadísticas en cada uno de los analitos, se realizó un análisis varianza (ANOVA) de una sola vía, como valores de media (n=3) y desviación estándar (SD).

#### **Toxicidad sobre *Artemia salina***

La evaluación de toxicidad sobre nauplios (larvas) de *A. salina* del extracto etanólico de las partes aéreas de *Leonurus japonicus* Houtt., se realizó en el Departamento de Ciencias de Los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Este método estándar se basa en la determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), es decir, concentración que causa la muerte al 50 % de una población de nauplios, en 24 horas.

#### **Reactivos.**

Los reactivos utilizados para evaluar la toxicidad de los extractos frente a *Artemia* fueron: cloruro de sodio (NaCl), sulfato de magnesio hexahidratado (MgSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O), cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), cloruro de potasio (KCl), bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) y dodecil sulfato de sodio, levadura comercial y quistes del crustáceo *A. salina*. En el desarrollo del bioensayo, primero se preparó una solución marina de aproximadamente 1000 mL (agua de mar artificial), que proporcionó las condiciones necesarias para el desarrollo de los nauplios de *Artemia*. Esta solución se mantuvo en aireación constante (burbujeo) 72 horas previas al bioensayo, con la finalidad de oxigenar la misma [12].

#### **Eclosión de los quistes.**

Al finalizar el tiempo de aireación de la solución marina (72 horas), se dividió la solución en dos recipientes (Fiolas) con 500 mL aproximadamente en cada uno, en una de las fiolas, se añadió alrededor de 250 mg de quistes, manteniendo una temperatura constante de 28 ± 2 °C por 48 h. La solución marina libre de nauplios, se utilizó como disolvente para preparar las

diferentes diluciones del extracto etanólico y llenado de las placas.

#### **Desarrollo de la prueba**

Se colocaron 130 µL de solución salina (aireada) en cada pozo de una placa de microtitulación, se agregaron a cada pozo 10 µL de solución que contenían entre 10 y 15 nauplios de *A. salina*, se le adicionó 10 µL de una solución de levadura comercial marca Fleischmann (5mg/mL) a cada pozo, se incubaron las placas en un área con iluminación permanente por 24 horas, para excitar su actividad metabólica. Se colocaron 50 µL del extracto etanólico, a distintas concentraciones (5, 25, 250, 750, 1250 y 2500 ppm). El extracto se diluyó en solución salina: DMSO (9:1). Cabe destacar que en esta prueba solo se analizó el extracto etanólico, debido a que los otros extractos mostraron dificultades en la solubilidad. Se incluyó, además, un grupo control negativo (con todos los elementos del ensayo, excepto la muestra a ensayar) y un grupo control positivo (Dodecil sulfato de sodio, DDSS 10 %) con seis réplicas para cada grupo. Se registraron el número de nauplios presentes inicialmente en cada pozo (NV), y al cabo de 24 h de contacto con los extractos se realizó el conteo del número de nauplios muertos (NM). Se calculó el porcentaje de letalidad mediante la ecuación, % de letalidad =  $NM/NV \times 100$  [13]. Se determinó la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) con un intervalo de confianza del 95 %, utilizando para este fin el método de análisis Probit, utilizando el programa estadístico SPSS, 21.0 para Windows. Se clasificaron la DL<sub>50</sub> de los extractos evaluados según la toxicidad, tomando como referencia las recomendaciones el Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) [13].

## **RESULTADOS Y DISCUSIONES**

#### **Tamizaje fitoquímico**

Los extractos hexanoico, diclorometanoico y etanólico de las partes aéreas (hojas, tallos y flores) de *L. japonicus*, fueron sometidos a evaluación química cualitativa [6], para determinar los principales tipos de metabolitos secundarios presentes en cada uno de los extractos (Tabla 1). El análisis fitoquímico preliminar reveló la presencia

de varios metabolitos secundarios de interés, detectándose en los extractos hexanoico y diclorometanoico la presencia de esteroides y en el extracto etanólico, alcaloides, esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides.

**Tabla 1.**

Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos a partir de las partes aéreas de *L. japonicus* Houtt.

| Metabolitos secundarios | Reacción de coloración y/o precipitación | EH | ED  | EE  |
|-------------------------|--|----|-----|-----|
| Alcaloides              | Dragendorf                               |    |     | +++ |
|                         | Wagner                                   |    |     | +++ |
|                         | Mayer                                    |    |     | +++ |
| Esteroides              | Lieberman-Buchard                        | ++ | +++ | +++ |
| Terpenos                |  | -  | -   | -   |
| Compuestos fenólicos    | FeCl <sub>3</sub>                        | -  | -   | +++ |
| Taninos                 | Prueba de la gelatina                    |    |     | -   |
| Flavonoides             | Shinoda                                  | -  | -   | +++ |
| Saponinas               | Prueba de la espuma                      | -  | -   | -   |
| Cumarinas               | Prueba NH <sub>4</sub> OH/LUV            | -  | -   | -   |
| Quinonas                | Prueba NH <sub>4</sub> OH                | -  | -   | -   |

+++ abundante, ++ moderado, + escaso. EH: Extracto hexanoico, ED: Extracto diclorometanoico; EE: Extracto etanólico.

Desde la década de 1990, *L. japonicus* ha sido investigada fitoquímicamente por varios grupos de investigación, lo que resultó en la identificación de más de 280 compuestos. Estos constituyentes químicos son principalmente monoterpenoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, triterpenoides, esteroides, alcaloides, flavonoides y fenilpropanoides [5]. En nuestro estudio, realizado en los extractos de las partes aéreas de *L. japonicus*, solo se reportaron esteroides en el extracto hexanoico y diclorometanoico, y alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides y esteroides en el extracto etanólico.

La presente investigación difiere además de la realizada por Severina de Melo (2006) [14], quien al analizar las hojas y tallos de *L. japonicus*, indicó la presencia de flavonoides, saponinas y taninos en el extracto hidroalcohólico, mientras que, en nuestra investigación, no solo reportamos la presencia de flavonoides, sino también de alcaloides, compuestos fenólicos y esteroides en extracto etanólico (Tabla 1) y no se detectó la presencia de taninos ni saponinas. Por otra parte, Zachow (2016) [15], realizó un análisis fitoquímico de las partes aéreas de *Leonurus sibiricus* e indicó

la presencia de terpenos, esteroides y alcaloides en los extractos metanólicos.

La diferencia en cuanto a los componentes encontrados puede deberse a la parte de la planta que se analizó, factor muy importante en la producción de taninos, ya que el contenido de dichos metabolitos en el peciolo es diferente del que hay en la hoja [16]. Además, existe una alta correlación positiva entre la conductividad eléctrica y los diferentes tipos de metabolitos (fenoles totales, taninos condensados y taninos totales), se ha encontrado que mientras más elevada sea la concentración de sales solubles en el suelo se tiene una mayor conductividad eléctrica, o capacidad del agua para transportar la corriente eléctrica [17]. Hay que tener en cuenta que las concentraciones de metabolitos secundarios en una especie pueden variar en diferentes partes de la planta, con la ontogenia, y también puede depender de diversos factores ecológicos como cambios estacionales de luz, temperatura [18], humedad, nivel de nutrientes y presión osmótica [19,20, 21].

Según Waterman & Mole (1994) [22], el contenido de varios tipos de dichos metabolitos secundarios está influenciado por el genotipo de la planta (la especie y la variedad), las características ambientales (la radiación solar y la disponibilidad de agua), la velocidad de crecimiento, la madurez, la condición nutricional del suelo, la depredación y las enfermedades. Así mismo Harborn (1993) [23], afirmó que la aparición de los compuestos secundarios está relacionada con los mecanismos de defensa de la planta y los efectos del suelo y del clima.

#### Quantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de *Leonurus japonicus* por el método Folin-Ciocalteu

En un estudio realizado por Altamirano y col (2007) [24], los autores indicaron que distintas especies pertenecientes a la familia Lamiaceae, sintetizan una gran cantidad de compuestos polifenólicos, los cuales presentan en su mayoría propiedades antioxidantes, además de actividad microbiciada, anti-inflamatoria y antitumoral, además afirmaron que estas actividades dependen directamente de la concentración de polifenoles y no de la actividad antioxidante total [25]; confiriéndole a las plantas pertenecientes a ésta familia, un gran potencial terapéutico. En este

estudio se determinó el contenido de polifenoles totales, del extracto etanólico de las partes aéreas de esta especie y en la Fig. 1. se muestra la curva de calibración del ácido gálico.

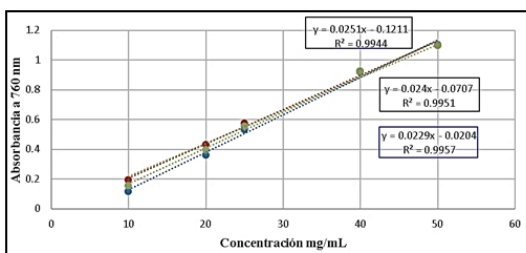


Fig. 1. Curva de calibración del ácido gálico

En la Fig. 1, se muestran las correspondientes ecuaciones de la recta ( $y = 0.0251x - 0.1211$ ,  $R^2 = 0.9944$ ;  $y = 0.024x - 0.0707$ ,  $R^2 = 0.9951$ ;  $y = 0.0229x - 0.0204$ ,  $R^2 = 0.9957$ ), que se emplearon para cuantificar el contenido total de fenoles en la muestra analizada. Los valores de absorbancia del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*, fueron reemplazados en la ecuación, pudiéndose determinar el contenido total de fenoles (Tabla 2).

Tabla 2.

Cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*

| Extracto  | [ ] mg/mL | Absorbancia 760 nm |                |                | [ ] µg AG/mg de extracto seco |                |                | [ ] µg AG/mg de extracto seco ± DE |
|-----------|-----------|--------------------|----------------|----------------|-------------------------------|----------------|----------------|------------------------------------|
|           |           | λ <sub>1</sub>     | λ <sub>2</sub> | λ <sub>3</sub> | C <sub>1</sub>                | C <sub>2</sub> | C <sub>3</sub> |                                    |
| Etanólico | 50        | 1,142              | 1,140          | 1,141          | 0,81                          | 0,89           | 0,98           | 0,89 ± 0,07                        |

AG = ácido gálico

No existen diferencias estadísticamente significativas entre datos ( $p > 0,05$ ), con un nivel de confianza de 95 %.

En nuestro estudio la cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus* por el método Folin-Ciocalteu, mostró un promedio de  $0,89 \pm 0,07$  µg AG/mg peso seco del extracto.

Ravipati y col. (2012) [26], evaluaron las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de 44 extractos de hierbas medicinales tradicionales chinas, con el fin de comprender la variación de las actividades antioxidantes de los extractos, estimaron las cantidades fenólicas totales de cada especie, obteniendo niveles fenólicos de  $0,84$  µg de ácido gálico/mg (mg de ácido gálico/g), en el extracto etanólico de la especie *Leonurus japonicus*, resultando ser muy similar al contenido de polifenoles totales en el extracto etanólico de las

partes aéreas de *L. japonicus*, encontrado en nuestro estudio.

Por otra parte, Kim y col. (2012) [27], al investigar la capacidad de captación de radicales DPPH y el contenido de polifenoles totales en plantas naturales y medicinales coreanas, obtuvieron un contenido fenólico de  $191,62$  mg/g (µg/mg), en el extracto etanólico de *L. japonicus*. Un contenido muy por encima al obtenido en nuestro estudio.

Según Van der Sluis y col (2001) [28], numerosos factores medioambientales como la luz o el grado de conservación, pueden afectar al contenido total de polifenoles, el clima (exposición al sol, precipitaciones) o factores agronómicos (diferentes tipos de cultivos, producción de fruta por el árbol) juegan un papel fundamental. La exposición a la luz, es en particular, uno de los principales condicionantes para determinar el contenido de la mayoría de estos compuestos. El grado de conservación cuando se encuentran presentes en los alimentos, puede también determinar el contenido de compuestos fenólicos, ya que son fácilmente oxidables. La conservación en frío, sin embargo, no afecta al contenido de los mismos.

#### Actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *Leonurus japonicus*, por el método DPPH.

En la Fig. 2, se muestra la curva de calibración del ácido ascórbico, y la ecuación de la recta con un  $R^2$  de 0,9936.

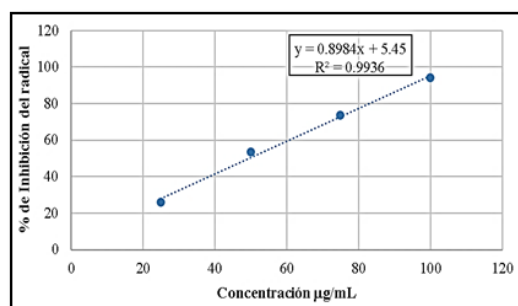


Fig 2. Curva de calibración del ácido ascórbico

La actividad antioxidante fue determinada mediante el método DPPH; previamente se realizó un barrido inicial con los extractos hexanoico, diclorometanoico y etanólico, a una concentración de  $4$  mg/mL. Se observó que el extracto etanólico

de las partes aéreas de *L. japonicus*, mostró un % de inhibición de 92,9, siendo mayor de 50 %, lo cual indicó que tenía actividad antioxidante; mientras que los extractos hexanoico y diclorometanoico mostraron un % inhibición de 45,07 y 15,9 respectivamente, lo que mostró que no poseían actividad antioxidante significativa (Fig. 3).

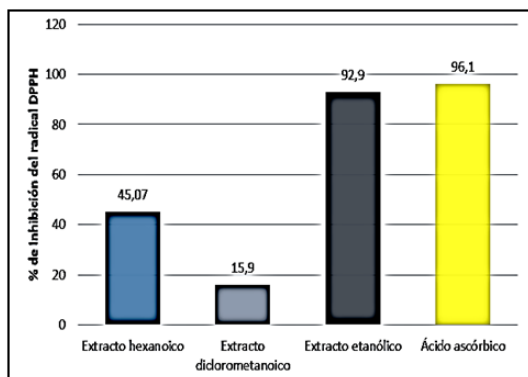


Fig 3. % de inhibición del radical DPPH de los extractos hexanoico, diclorometanoico y etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus* Houtt.a 4 mg/mL.

Posteriormente, se procedió a realizar la determinación de la actividad antioxidante al extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*. Se determinó que dicho extracto presentó un % de inhibición (% I) de  $57,7 \pm 0,6$  a la concentración de 0,5 mg/mL, en comparación de 96,1 % del ácido ascórbico a una concentración de 0,176 mg/mL. En la Fig. 4, se muestran los resultados obtenidos, de las medias de cada una de las concentraciones evaluadas por triplicado.

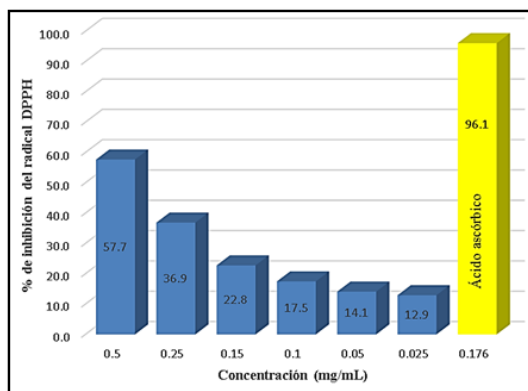


Fig. 4. Curvas de % I vs concentración del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*. Existen diferencias estadísticas significativas entre datos ( $p < 0,05$ ), con un nivel de confianza de 95%, cada determinación se realizó por triplicado ( $n = 3$ ).

### Concentración eficiente 50 (mg/mL) ( $n = 3$ ) del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*.

Brand y col. (1995) [29], indicaron que, a través del método DPPH, es posible evaluar la presencia de compuestos capaces de donar hidrógeno o secuestrar el radical que, después del equilibrio de la reacción, permite calcular la concentración eficiente del extracto y los estándares necesarios para reducir el 50 % del radical DPPH.

En el presente estudio, cabe aclarar, que la determinación de la concentración eficiente 50 (mg/mL) del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*, se calculó a partir de la ecuación de la recta  $y = ax + b$ , donde "a" es la pendiente; "b" la intersección de corte en la recta,  $y = 50$  y  $x = IC_{50}$ . En la Tabla 3, se muestra los valores de  $IC_{50}$  ( $n = 3$ ).

Tabla 3.

Concentración eficiente 50 ( $IC_{50}$ ) del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*.

| Recta | Pendiente | Corte  | R <sup>2</sup> | IC <sub>50</sub> mg/mL | X IC <sub>50</sub> mg/mL | DE   |
|-------|-----------|--------|----------------|------------------------|--------------------------|------|
| 1     | 106,6500  | 0,9735 | 0,9960         | 0,460                  | 0,457                    | 0,01 |
| 2     | 108,0400  | 1,4932 | 0,996          | 0,450                  |                          |      |
| 3     | 108,3200  | 0,170  | 0,992          | 0,460                  |                          |      |

En promedio, la concentración eficiente 50 ( $IC_{50}$ ) en mg/mL de la fracción etanólica de las partes aéreas de *L. japonicus*, para captar radicales libres es de 0,457 mg/mL. Esta investigación difiere a lo reportado por Severina de Melo (2006) [14], quien al realizar la determinación de la actividad antioxidante de *L. japonicus*, encontró que el extracto etanólico presentó un  $IC_{50}$  de 88,08  $\mu$ g/mL (0,088 mg/mL). Los componentes químicos predominantes en su estudio fueron los flavonoides y taninos, al contrario de nuestro estudio, donde reportamos la presencia de compuestos flavonoides y compuestos fenólicos, pero no se detectó la presencia de taninos; lo que podría explicar, la diferencia entre ambos estudios, ya que según Yokozawa y col. (1998) [30], flavonoides como la quercetina, rutina y isoquercetina, que han sido reportados en la especie *L. japonicus*, poseen en su estructura grupos ortohidroxilo en el anillo B, y está demostrado que el grupo ortohidroxilo puede considerarse la estructura más importante en

los flavonoides y los taninos para inhibir la actividad de los radicales libres.

Deng y col. (2013) [31], estudiaron las capacidades antioxidantes y el contenido de fenoles totales de los extractos lipofílicos e hidrofílicos de 56 especies vegetales comúnmente consumidas, entre ellas *Leonurus japonicus*; utilizando los métodos FRAP (poder antioxidante reductor férrico) y TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox). Los resultados mostraron que las capacidades antioxidantes y el contenido fenólico total en la fracción lipofílica fueron mayores que los de la fracción hidrofílica. Nuestro estudio no se puede comparar directamente con los resultados de estos investigadores ya que el método usado fue DPPH, diferente al reportado por Deng y col. (2013) [31], sin embargo, podemos decir que la correlación positiva entre la capacidad antioxidante y el contenido fenólico total indica que los compuestos fenólicos podrían ser uno de los principales contribuyentes a las capacidades antioxidantes de esta especie vegetal.

#### Evaluación de toxicidad del extracto etanólico de las partes aéreas de *Leonurus japonicus* sobre nauplios de *Artemia salina*

En la Tabla 4, se muestran los resultados promisorios del bioensayo de letalidad en *A. salina*, del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus* y los controles.

**Tabla 4.**

Cuantificación de la DL<sub>50</sub> del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus* y los controles sobre *A. salina*.

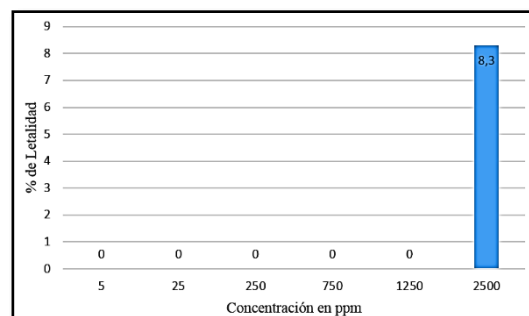
| Extractos     | DL <sub>50</sub><br>(ppm) | Límite de confianza (95%) ppm |                 | Categoría según el<br>CYTED |
|---------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------------------|
|               |                           | Límite inferior               | Límite superior |                             |
| Partes aéreas | 2913,55                   | -                             | -               | Relativamente               |
| DMSO          | -                         | -                             | -               | Inocuo                      |
| DDSS          | 28,026                    | 23,372                        | 33,507          | Altamente tóxico            |

DL<sub>50</sub>: Dosis letal 50; signo (-) valores muy altos; DMSO: Dimetilsulfóxido DDSS: Dodecil sulfato de sodio.

Basándonos en la clasificación de toxicidad según el CYTED y los intervalos de confianza allí establecidos, el extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*, es relativamente inocuo ya que la concentración a la cual murieron el 50 % de nauplios de *A. salina*, fue de 2913,55 ppm.

En la Fig. 5, se muestra el porcentaje (%) de letalidad del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus* sobre *A. salina* a las

concentraciones probadas en unidades de ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ).



**Fig. 5.** Porcentaje (%) de letalidad del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus* sobre *A. salina* a las concentraciones probadas en unidades de ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Con respecto al porcentaje de letalidad, el extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*, ocasionó el 8,3 % de mortalidad a la concentración más alta evaluada de 2500 ppm, lo que refleja los bajos niveles de toxicidad observados. A concentraciones inferiores de 2500 ppm hubo un 0 % de letalidad, como se muestra en la Fig. 5.

Dos Santos y col. (2010) [32], reportaron, utilizando los extractos metanólicos obtenidos a partir de las hojas y raíces de *L. sibiricus*, una DL<sub>50</sub> sobre *Artemia salina* de 657,2  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que, Saha y col (2012) [33], obtuvieron valores de DL<sub>50</sub> de 1,0 ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ) del extracto crudo de las hojas de *L. sibiricus* mientras que en el caso de la raíz fue de 2,0  $\mu\text{g/mL}$ . Es decir, los extractos fueron altamente tóxicos para *A. salina*. Estas investigaciones, difieren de la nuestra y podría deberse principalmente a la concentración en la que se encuentren los metabolitos secundarios presentes en los extractos estudiados, ya que, según Jaramillo y col. (2016) [34], los alcaloides favorecen de manera significativa a la toxicidad aguda contra *A. salina*, mientras que a mayor contenido de polifenoles dicha toxicidad disminuye significativamente el nivel de toxicidad de las plantas. Por otra parte, Zhao y col (1999) [35], indicaron que las saponinas pueden ser letales para la *A. salina* incluso a bajas concentraciones. Cabe mencionar que en el extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*, no se encontró presencia de saponinas, ni de taninos, esta podría ser una razón que nos permita explicar la baja toxicidad mostrada por el extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus* sobre *A. salina*, en nuestra investigación.



Además, la alteración de factores como el nivel de oxígeno, la temperatura y el valor promedio de salinidad, durante la realización del bioensayo, también puede influir en la toxicidad del extracto sobre los nauplios de *A. salina*. [35].

## CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico preliminar, de los extractos de las partes aéreas de *L. japonicus*, reveló la presencia de esteroides en los extractos hexanoico y diclorometanoico; y alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides y esteroides, en el extracto etanólico. El contenido de fenoles totales determinado en el extracto etanólico, fue de 0,89 µg AG/mg de extracto. Además, este extracto resultó ser el de mayor capacidad antioxidante, y a su máxima concentración de dilución, (0,5 mg/mL), mostró un porcentaje de inhibición del radical DPPH de 57,7 en comparación de 96,1 del ácido ascórbico a 0,176 mg/mL, además, la concentración eficiente 50 (mg/mL) para captar radicales libres fue de 0,457 mg/mL, y en la prueba de toxicidad sobre *A. salina*, resultó ser relativamente inocuo sobre los nauplios, según la clasificación del CYTED, con un porcentaje de letalidad de 8,3 a 2500 ppm, y la DL<sub>50</sub> de 2913,55 ppm.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores reconocen y agradecen al Instituto de Investigaciones, Departamento de Ciencias de Los Alimentos y Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA. (Mérida, Venezuela), por el apoyo brindado en la realización de esta investigación, y al señor Emilio Salazar, por la colaboración prestada en la obtención de los extractos utilizados en esta investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Bekut M, Brkić S, Kladar N, Dragović G, Gavarić N, Božin B. Potential of selected Lamiaceae plants in anti (retro) viral therapy.

Pharmacological Research. 2018; 133 (X): 301–314.

[2] World Health Organization. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. [Acceso: 30 de Octubre de 2019]. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090_eng.pdf?ua=1)

[3] Velázquez D. Clave para los géneros de Lamiaceae en Venezuela. *Acta Botánica Venezolánica*. 1997; 20 (1): 1-42.

[4] Shang X, Pan H, Wang X, He H, Li M. *Leonurus japonicus* Houtt: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014; 152(1): 14-32.

[5] Miao L, Zhou Q, Peng C, Liu Z, Xiong L. *Leonurus japonicus* (Chinese motherwort), an excellent traditional medicine for obstetrical and gynecological diseases: A comprehensive overview. *Biomedicine y Pharmacotherapy*. 2019; 117(1): 1-18.

[6] Marcano D, Hasegawa M. Fitoquímica orgánica. 2da Edición. Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico: Caracas, Venezuela, 2002.

[7] Goupy P, Hugues M, Boivin P, Amiot M. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric*. 1999; 79(12):1625-1634.

[8] Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J Sci Technol*. 2004; 26(2): 211-219.

[9] Diaz L, De Monjito S, Medina A, Meléndez P, Laurence V, Marti-Mestres G. Activity of ethanolic extracts leaves of *Machaerium floribundum* against acne-inducing bacteria, and their cytoprotective and antioxidant effects on fibroblast. *Rev. Per. Biol*. 2011; 18(2): 153–158.

[10] Plaza CM, Díaz L, Lücking RK, Viscaya M, Medina GE. Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of lichens from Venezuelan Andes. *JPPRes*. 2014; 2(5):138-147.

[11] Contreras-Moreno B, Díaz L, Celis MT, Rojas J, Méndez L, Rosenzweig LP, Ontiveros J. Actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de *Pimenta racemosa* var. *racemosa* (Mill.)

J.W. Moore (Myrtaceae) de Táchira – Venezuela. *Ciencia e Ingeniería*. 2017; 38(3): 1-14.

[12] Plaza CM. Identificación y estudio de actividades biológicas de nueve especies de líquenes, colectadas en el estado Mérida. [Tesis de Doctoral], Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Postgrado en Química de Medicamentos. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela; 2015.

[13] Sánchez L, Neira A. Bioensayo general de Letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L. y *Psidium guineense*. Sw. Fundación Universitaria Juan de Castellanos. 2005; 3: 40-45.

[14] Severina de Melo E. Estudio farmacognóstico e farmacológico de *Leonurus japonicus* Houtt. [Tesis de pregrado]. Universidad de São Paulo, São Paulo, Brasil; 2006.

[15] Zachow L. Extração, composição química e avaliação das atividades de inibição enzimática e antimicrobiana de *Leonurus sibiricus* L. [Tesis de maestría]. Universidad Federal de Santa María, Santa María, Brasil; 2016.

[16] Oncina RJM, Botía JA, Del Río & Ortuño A. Bioproduction of diosgenin in callus cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. *Food Chemistry*. 2000; 70(4): 489- 492.

[17] Santacoloma L, Granados J. Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* y algunas propiedades físicoquímicas del suelo. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 2012; 3(1): 53-62.

[18] Chaves N, Escudero JC. Variation of flavonoids synthesis induced by ecological factors. In: Inderjit KMN, Dakshini FL, Chester eds. *Principles and Practices in Plant Ecology Allelochemical Interaction* CRC Press. Boca Raton, Florida; 1999.

[19] Waterman PG, Mole S. Extrinsic factors influencing production of secondary metabolites in plants. In E.A: Bernays ed. *Insect y Plant Interactions*. Vol 1. CRC Press, Boca Raton, FL; 1989.

[20] Waterman PG. Roles for secondary metabolites in plants, Chadwick and J. Whelan 8 ed. *Secondary Metabolites: Their Function and Evolution*. Jhon Wiley and Sons. New York; 1992.

[21] Dixon RA, Paiva NL. Stress induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 1995; 7: 1085-1097

[22] Waterman PG, Mole S. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Oxford, Reino Unido: Blackwell Scientific Publications; 1994.

[23] Harborne J. *Introduction to Ecological Biochemistry*. New York, EEUU: Academic Press; 1993.

[24] Altamirano N, Romano C, Repetto M, Abadi K, Moreno S. Bioactividades de compuestos polifenólicos no volátiles aislados de plantas Lamiaceae de Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2007 ; 6(6) : 319-320.

[25] Demmig B, Adams W. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science*. 2002; 298(1): 2149-2153.

[26] Ravipati A, Zhang L, Koyyalamudi S, Jeong S, Reddy N, Bartlett J, Smith P, Shanmugam K, Münch G, Wu M, Satyanarayanan M, Vysetti B. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and their relation with antioxidant content. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012; 12(1):1-14.

[27] Kim E, Choi J, Yu M, Kim M, Lee S, Lee B. Total Polyphenols, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Korean Natural and Medicinal Plants. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 2012; 4(33): 337-342.

[28] Van der Sluis A, Dekker M, De Jager A, Jongen W. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49(8): 3606-3613.

[29] Brand W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 1995; 28(1): 25-30.

[30] Yokozawa T, Chen C, Dong E, Tanaka T, Nonaka G, Nishioka I. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Radical Biochemical Pharmacology*. 1998; 56(1): 213-222.

[31] Deng G, Lin X, Xu X, Gao L, Xie J, Li H. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. *Journal of functional foods*. 2013; 5(1): 260-266.

[32] Dos Santos Júnior HM, Oliveira DF, De Carvalho DA, Pinto JMA, Campos VAC, Mourão ARB, Costa-Lotufo LV. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. *Journal of Natural Medicines*. 2010; 64(2): 231–238.

[33] Saha M, Bari F, Rahman M, Islam M. In Vitro Cytotoxic and Anthelmintic Activities of Leaf and Root Extracts of *Leonurus sibiricus* L. *Journal of Scientific Research*. 2012; 4(3): 721-727.

[34] Jaramillo C, D'Armas H, Troccoli L, Rojas L, Jaramillo A. Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. *Revista de Biología Tropical*. 2016; 64(3): 1171-1184.

[35] ZhaoW, Qin G, Lou L. Evaluation of toxicity of some saponins on brine shrimp. *Journal of Asian Natural Product Research*. 1999; 1(1): 307-311.

[36] Eslava P, Wedler E, Serna D. Caracterización y criterios de eclosión de quistes de *Artemia sp.*, en la salina de pozos colorados (Santa Marta, Colombia). *Revista del Instituto de Investigaciones Tropicales*. 2011; 6(1): 101-108.