



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**  
**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES**  
**“DR. ALFREDO NICOLAS USUBILLAGA DEL HIERRO”**



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE**

**LAS HOJAS DE *Leonurus japonicus* Houtt (LAMIACEAE)**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de**

**Licenciado en Bioanálisis**

**Autores:**

**Malavé L. María J.**

**Mendoza G. Zulimar K.**

**Tutor:**

**Dra. Marielba Morillo**

**Mérida, Octubre de 2019**

## DEDICATORIA

Primeramente gracias a Dios, por darme la salud y la fuerza necesaria para superar cada obstáculo, y nunca desmayar. Hoy, ratifico que “no se mueve la hoja del árbol sin la voluntad de Dios”.

A mi madre Zaydi Lacruz, mi compañera eterna, la tercera integrante de éste trabajo, mi ángel. Gracias mamita por tanto amor, tanta dedicación, por motivarme a ser mejor siempre, por acompañarme en mis desvelos, levantarme en mis fracasos y celebrar mis éxitos, nuestros éxitos. Todos tus sacrificios, hoy son recompensados, sé que desde el cielo estás orgullosa de tu niña, tu licenciada y que seguirás llevándome de la mano y guiándome en cada paso que dé. Éste logro es tan tuyo como mío. Te amo por siempre

A mi padre José Malavé, gracias por apoyarme siempre, por estar ahí para mí e impulsarme siempre hacia adelante; por tus sacrificios e innumerables esfuerzos para brindarme todas las herramientas necesarias para poder obtener el tan ansiado título de Licenciada en Bioanálisis. Te amo con toda mi alma.

A mis hermanos Eduardo y Antonio, y a mi cuñada Katiusca, por ser ejemplo de perseverancia y lucha, son mi orgullo. A mis sobrinos Williams, Gabriela, Antonio y Antonella, esos tesoros que me llenan el corazón de amor y ternura.

A mi amiga y compañera de tesis, Zulimar, mi mano derecha, a quien admiro por su capacidad de luchar por lo que se propone, por ser una de las personas más felices que conozco y contagiar de esa felicidad a todos los que tenemos la fortuna de conocerte.

A los hermanos que me regalo la universidad: Daylet, Yanibel, Emmanuel, Krystal, Yanira, Vicky. Gracias por formar parte de esta hermosa etapa de mi vida, los quiero mucho.

A la Lcda. Maria Ines Odreman, un ángel que llego a mi vida gracias a otro ángel, mi mamá. Gracias por su apoyo cuando más lo necesité, por sus palabras sabias y siempre acertadas. Que afortunado seria el mundo si contara con más personas como usted, con tanto amor por su profesión, pero lo más importante, con una calidad humana enorme. Que Dios la bendiga.

*María José Malavé Lacruz*

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## DEDICATORIA

A mi Dios todopoderoso y a la Santísima Virgen, guías espirituales que iluminan mi vida, llenándome de fe, entusiasmo y perseverancia para culminar cada uno de los proyectos que me he propuesto.

A mis padres: Luz Marina Graterol Aldana y Gerardo Antonio Mendoza, pilares fundamentales en mi vida, su apoyo ,amor y motivación han sido las herramientas más importantes que me han permitido lograr todos los proyectos personales y profesionales que me he propuesto ,son mi fuente de fortaleza y de ganas de superación ,este triunfo es de ustedes , los amo.

A mi hermana: Edelmira Suleika Mendoza Graterol, porque su amor y apoyo ha sido fundamental en el desarrollo de cada uno de mis metas, por sus palabras de aliento, por estar siempre a mi lado, fortaleciéndome a lo largo del camino. Gracias por tus consejos, por ser siempre un gran ejemplo y por dejarme saber que siempre puedo contar contigo. Te amo con todo mi corazón.

A mi amiga y compañera de tesis María José Malavé, por brindarme su apoyo incondicional, acompañarme a lo largo del camino, creyendo en mí y dándome palabras de aliento para culminar con éxito cada una de mis metas, te quiero mucho amiga.

A mi abuela María Auxiliadora Aldana, gracias por todo, eres el tesoro más especial que se puede tener, por tu cariño tan puro y sincero, te amo.

A mis tías: Leida Coromoto Graterol Aldana, Amelia Rosa Graterol Aldana y Mery del Carmen Graterol Aldana, quienes con su ayuda, cariño y comprensión han sido parte fundamental en mi vida, las amo.

A mama Zaydi Lacruz, que aunque no esté físicamente sé que está orgullosa de mi, infinitas gracias por brindarme su apoyo durante toda mi carrera, por realizar aportes en la elaboración de éste proyecto. Personas como usted son ángeles que Dios nos pone en el camino. De usted aprendí tantas cosas bonitas porque cada día me demostró lo hermosa que es la vida y lo justa que puede llegar a ser, la amare siempre.

A mis Amigos: Julia, Nurdy, Narbelis, Nardelis, Nardeli que estuvieron a lo largo de mi carrera universitaria, gracias por su apoyo incondicional y por siempre estar allí, los quiero mucho.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

*Zulimar Mendoza*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso por habernos dado la fuerza, voluntad, paciencia y perseverancia para poder concluir este trabajo.

A la ilustre Universidad de Los Andes, la cual nos acogió en sus instalaciones, convirtiéndose en nuestro segundo hogar, brindándonos a través de su personal, una formación analítica, técnica y humanística, convirtiéndonos en futuros integrantes del equipo de salud y por mantenerse en pie a pesar de las adversidades, formando a los profesionales que contribuirán en la reconstrucción de nuestra Venezuela.

A la Profesora Marielba Morillo, por su paciencia, dedicación, motivación, criterio y aliento. Sus conocimientos y experiencias en el área fueron herramientas fundamentales que nos permitieron la realización y desarrollo del presente trabajo, la colaboración y profesionalismo prestado desde el inicio de este proyecto es un ejemplo firme de ayuda a todos los profesionales con aspiraciones de superación para un mejor futuro.

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis "Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga Del Hierro" por abrirnos sus puertas y contribuir al desarrollo exitoso de esta investigación.

Al departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos y departamento de Ciencia de los Alimentos por toda su valiosa colaboración durante el desarrollo de este trabajo.

A las profesoras Alida Pérez y María Eugenia Rondón, por su orientación, disposición y con sus conocimientos y sugerencias aportar en el mejoramiento de esta investigación.

A los Profesores: Luis Rojas, Ing. Juan Carmona, Dra. Rosa Aparicio, Sr. Emilio Salazar, y Sr. Eduardo Gavidia por todos sus aportes en esta investigación.

Un agradecimiento especial, al profesor Tomas Visbal, su apoyo, solidaridad y disposición humana y profesional para con nosotras como tesistas, fueron clave determinante a lo largo de este trabajo.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
VEREDICTO	
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	VII
ÍNDICE DE CONTENIDO	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABLAS	XV
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XVII
RESUMEN	XVIII
Introducción	1
<b>CAPITULO I: El Problema</b>	
Planteamiento del Problema	3
Justificación de la Investigación	5
Objetivos de la Investigación	6
Objetivo General	6
Objetivos Específicos	6
Alcances y Limitaciones de la Investigación	7
<b>CAPITULO II: Marco Teórico</b>	
Trabajos Previos	8
Antecedentes Históricos	14
Bases Teóricas	15

Familia Lamiaceae	15
Composición química de la familia Lamiaceae	16
Género Leonurus	17
Usos farmacológicos	18
Composición química del género Leonurus	19
Especie <i>Leonurus japonicus</i>	22
Usos farmacológicos	22
Clasificación taxonómica	23
Composición química de <i>Leonurus japonicus</i>	23
Producto Natural	38
Clasificación de los Metabolitos secundarios	39
Extracto Vegetal	44
Clasificación de los extractos vegetales	44
Técnicas de obtención de extractos vegetales	46
Estudio fitoquímico	47
Antioxidantes	51
Determinación de la actividad antioxidante	51
Ensayo del DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)	52
<i>Artemia salina</i>	54
Clasificación taxonómica	55
Características morfológicas	55
Ciclo vital	55
Bioensayo de determinación de toxicidad para <i>Artemia salina</i>	58

Operacionalización de las variables	59
Sistema de Hipótesis	62
Hipótesis afirmativa	62
Hipótesis nula	62
<b>CAPITULO III: Marco Metodológico</b>	
Tipo de Investigación	63
Diseño de la Investigación	63
Población y Muestra	64
Sistema de Variables	64
Instrumento de Recolección de Datos	65
Procedimientos y Metodología	65
Recolección del material vegetal e identificación botánica de la especie	65
Obtención del Extracto Vegetal	66
Tamizaje fitoquímico	68
Alcaloides: Ensayo de Dragendorff, Wagner y Mayer	68
Fenoles: Prueba con FeCl <sub>3</sub>	68
Flavonoides: Ensayo de Shinoda	69
Saponinas: Ensayo de la espuma	69
Terpenos y/o esteroides: Ensayo de Lieberman-Burchard	69
Taninos: Prueba de la gelatina	70
Cumarinas	70
Quinonas	70
Cuantificación de fenoles totales	70

Estudio Estadístico	72
Evaluación de actividad biológica	73
Determinación de actividad antioxidante	73
Ensayo de DPPH	73
Estudio Estadístico	75
Evaluación de toxicidad sobre nauplios de <i>Artemia salina</i>	75
Estudio Estadístico	80
Diseño de Análisis	80
<b>CAPÍTULO IV: Resultados y Discusiones</b>	
Estudio fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de <i>Leonurus japonicus</i>	82
Cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>Leonurus japonicus</i> por el método Folin-Ciocalteu.	85
Actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de <i>Leonurus japonicus</i>	89
Evaluación de toxicidad del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>Leonurus japonicus</i> sobre nauplios de <i>Artemia salina</i>	97
<b>CAPITULO V: Conclusiones y Recomendaciones</b>	
Conclusiones	100
Referencias Bibliográficas	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura química de los terpenoides aromáticos reportados en el orégano	16
Figura 2. Estructura química de algunos flavonoides reportados en la familia Lamiaceae	17
Figura 3. Estructura química del ácido rosmarínico	17
Figura 4. Estructura química de la estaquidrina	19
Figura 5. Estructuras químicas de algunos terpenoides reportados en el género <i>Leonurus</i>	19
Figura 6. Estructuras químicas de flavonoides reportados en el género <i>Leonurus</i>	20
Figura 7. Estructuras químicas de compuestos esteroideos reportados en el género <i>Leonurus</i>	20
Figura 8. Estructuras químicas de fenilpropanoides y glucósidos fenólicos reportados en el género <i>Leonurus</i>	21
Figura 9. Clasificación taxonómica de la especie <i>L. japonicus</i>	23
Figura 10. Estructura química de alcaloides reportados en <i>L. japonicus</i>	34
Figura 11. Estructura química de terpenoides reportados en <i>L. japonicus</i>	35
Figura 12. Estructura química de esteroides reportados en <i>L. japonicus</i>	36
Figura 13. Estructura química de flavonoides reportados en <i>L. japonicus</i>	37
Figura 14. Estructura química de fenilpropanoides reportados en <i>L. japonicus</i>	38
Figura 15. Estructura química de la cafeína	39
Figura 16. Estructura química de la catequina	40

Figura 17. Estructura química de la genisteína	41
Figura 18. Estructura química de la digitoina	41
Figura 19. Estructura química del $\beta$ -caroteno	42
Figura 20. Estructura química del florotanino	43
Figura 21. Estructura química de la Aflatoxina B1	43
Figura 22. Estructuras químicas de algunas quinonas	44
Figura 23. Reacción entre el ácido gálico y el reactivo de Folin-Ciocalteu	51
Figura 24. Estructuras del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante	54
Figura 25. Taxonomía de la <i>A. salina</i>	55
Figura 26. Nauplio de <i>A. salina</i>	56
Figura 27. Metanauplio de <i>A. salina</i>	56
Figura 28. Adulto de <i>A. salina</i>	58
Figura 29. Ejemplar de la especie con su respectivo voucher depositado en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis	66
Figura 30. Proceso de obtención del extracto de las partes aéreas de <i>L. japonicus</i>	67
Figura 31. Determinación de actividad antioxidante por medio del ensayo de DPPH	75
Figura 32. Flujograma para determinar la toxicidad sobre nauplios de <i>A. salina</i>	79
Figura 33. Ensayo de ecotoxicidad en nauplios de <i>A. salina</i>	80
Figura 34. Estudio fitoquímico de los extractos obtenidos a partir de las hojas de <i>L. japonicus</i>	83

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Especies pertenecientes al género <i>Leonurus</i>	18
Tabla 2. Composición química de <i>L. japonicus</i>	23
Tabla 3. Operacionalización de las Variables	59
Tabla 4. Cantidad obtenida de cada extracto con su respectivo rendimiento	67
Tabla 5. Diluciones empleadas para realizar la curva patrón con ácido gálico	71
Tabla 6. Diluciones empleadas para determinar la actividad antioxidante del extracto	74
Tabla 7. Diluciones empleadas para realizar la curva patrón de ácido ascórbico	74
Tabla 8. Componentes del agua de mar artificial, usada en el cultivo y eclosión de los quistes de <i>A. salina</i>	76
Tabla 9. Clasificación de toxicidad según el CYTED	78
Tabla 10. Estudio fitoquímico de los extractos obtenidos a partir de las partes aéreas de <i>L. japonicus</i>	82
Tabla 11. Lectura de absorbancia de las distintas concentraciones de la solución de ácido gálico empleada como patrón	85
Tabla 12. Cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>L. japonicus</i>	86
Tabla 13. Estudio estadístico de la cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>L. japonicus</i>	87
Tabla 14. Análisis de varianza de la cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>L. japonicus</i>	87

Tabla 15. Curva patrón de ácido ascórbico	89
Tabla 16. Determinación del potencial antioxidante de las fracciones	91
Tabla 17. Actividad antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>L. japonicus</i>	92
Tabla 18. Concentración eficiente 50 (IC <sub>50</sub> ) del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>L. japonicus</i>	94
Tabla 19. IC <sub>50</sub> del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>L. japonicus</i>	95
Tabla 20. Análisis de varianza ANOVA de una sola vía de la actividad antioxidante de las partes aéreas de <i>L. japonicus</i>	95
Tabla 21. Cuantificación de la DL <sub>50</sub> del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>L. japonicus</i> y los controles sobre <i>A. salina</i>	97

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Curvas de calibración de ácido gálico	86
Gráfico 2. Curva de calibración del ácido ascórbico	90
Gráfico 3. Porcentaje de inhibición (% I) del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>L. japonicus</i>	93
Gráfico 4. Concentración eficiente 50 (IC <sub>50</sub> ) del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>L. japonicus</i>	94
Gráfico 5. Porcentaje (%) de letalidad del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>L. japonicus</i> sobre <i>A. salina</i> a las concentraciones probadas en unidades de ppm (µg/mL)	98

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
“DR. ALFREDO NICOLAS USUBILLAGA DEL HIERRO”



COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE  
LAS HOJAS DE *Leonurus japonicus* Houtt (LAMIACEAE)

Trabajo de Grado

**Autores:** María J. Malavé L.

Zulimar K. Mendoza G.

**Tutor:** Dra. Marielba Morillo

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

*Leonurus japonicus* es una planta silvestre bienal originaria de países asiáticos, y perteneciente a la familia Lamiaceae. En las últimas tres décadas, muchos fitoquímicos, farmacólogos y médicos se han centrado en investigar sus componentes químicos, las actividades farmacológicas y sus aplicaciones, logrando aislar más de 280 compuestos químicos de esta planta. Por ello, el objetivo de esta investigación fue estudiar la composición química y actividad biológica de los extractos obtenidos a partir de sus partes aéreas. El análisis fitoquímico preliminar arrojó la presencia de esteroides en los extractos hexanoico y diclorometanoico; y alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides y esteroides en el extracto etanólico. El extracto etanólico tuvo un contenido fenólico total de 0,89 µg AG/mg. En cuanto a su actividad biológica, la actividad antioxidante fue determinada mediante la técnica DPPH, donde solo el extracto etanólico mostró actividad antioxidante, con un porcentaje de inhibición de 57,7 %, en comparación de 96,1 % del ácido ascórbico utilizado como control positivo. Además, dicho extracto, no presentó toxicidad alguna (relativamente inocuo), sobre nauplios de *Artemia salina*.

Palabras clave: *Leonurus japonicus*, fitoquímico, contenido fenólico, actividad antioxidante, toxicidad.

## Introducción

Desde tiempos inmemoriales, el hombre ha experimentado con diferentes partes de hierbas, arbustos o árboles para encontrar solución a sus problemas de salud. La situación económica actual, la crisis de los servicios de atención a la salud y una medicina cada día más costosa, han hecho que se incremente el uso de las plantas como una alternativa válida en la curación de enfermedades, práctica que se ve reforzada por el hecho de ser fuentes naturales de eficacia comprobada (Martínez, 2003).

En relación con el uso de las plantas, existe un gran desconocimiento sobre como emplearlas, sus principios tóxicos y su dosificación para lograr efectos terapéuticos. Es por ello, que para poder entender los beneficios y riesgos del uso de éstas como medicamentos, es necesario aprender a reconocerlas, aislar sus compuestos y comprender sus mecanismos de acción, lo cual es una tarea delicada que apenas está comenzando (Martínez, 2003).

Los estudios farmacológicos modernos muestran que los componentes activos de plantas del género *Leonurus*, más específicamente de la especie *Leonurus japonicus*, poseen amplias acciones farmacológicas, tales como efectos sobre el útero, así como acciones cardioprotectoras, anticancerígenas, analgésicas, antiinflamatorias, neuroprotectoras y antibacterianas (Shang, Pan, Wang, He, y Li, 2014).

Debido a su importante papel en las enfermedades de las mujeres, los académicos han comenzado a prestar mucha atención a esta planta y han llevado a cabo investigaciones en profundidad sobre sus componentes químicos y actividades farmacológicas; sin embargo, todavía hay una deficiencia en las revisiones de su aplicación clínica (Miao, Zhou, Peng, Liu y Xiong, 2019)

Tomando en consideración lo expuesto anteriormente, esta investigación tiene como objetivo determinar la composición química, contenido de polifenoles, actividad antioxidante y toxicidad en *Artemia salina* de los extractos de las partes aéreas de *Leonurus japonicus*, para así poder aportar una alternativa terapéutica útil en la prevención o cura de determinadas patologías.

Este proyecto de investigación ha sido estructurado en cinco capítulos. El primer capítulo, denominado El Problema, contiene los siguientes elementos: Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia, objetivos, alcances y limitaciones de la Investigación. El segundo capítulo, denominado Marco Teórico abarca: Trabajos previos, antecedentes históricos, bases teóricas, operacionalización del evento de estudio e hipótesis. El tercer capítulo, denominado Marco Metodológico comprende los siguientes puntos: Tipo de Investigación, diseño de investigación, población y muestra, instrumento de recolección de datos, procedimientos de la investigación y diseño de análisis. En el cuarto capítulo se aborda el análisis y discusión de los resultados y el Capítulo V, se destacan las conclusiones y recomendaciones.

# CAPITULO I

## EL PROBLEMA

### Planteamiento del Problema

A lo largo de la historia, la humanidad ha venido utilizando los compuestos aislados de las plantas, convirtiéndolos en una fuente inagotable de complejas sustancias activas. El uso de plantas como una alternativa medicinal ha despertado cada vez más el interés científico ya que en varias ocasiones han llegado a presentar las mismas garantías que los medicamentos de síntesis química. De hecho, sus facultades han sido tan notables, que de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) casi el 80 % de la población mundial ha incorporado el uso del tratamiento a base de plantas como su primera opción en el cuidado de la salud (Akerlele, 1985; Katewa, Chaudhary y Jain, 2004; Sheldon, Balick y Laird, 1997; Shrestha y Dhillion, 2003).

Sin embargo, se ha estimado que tan solo el 6 % de plantas superiores han sido investigadas para el estudio de su actividad biológica, es decir, para encontrar sus compuestos activos terapéuticos. Esto demuestra que hay un gran potencial curativo en el 94 % de las plantas restantes que aún no han sido estudiadas y la mejor forma de acercarse acertadamente a éstas es a través del estudio fitoquímico (Montealegre, 2011).

Tras la realización de varias investigaciones se ha comprobado que un gran número de especies pertenecientes a la familia Lamiaceae presentan actividad biológica; encontrando entre estas, a las perteneciente al género *Leonurus*, el cual incluye unas 80 especies aproximadamente y está conformado por plantas florales y aromáticas. Estudios han demostrado que los aceites esenciales y extractos obtenidos de estas especies, presentan actividades antibacterianas,

antiinflamatorias, anticancerígenas y antioxidante, inhibiendo la proliferación de microorganismos patógenos causantes de innumerables procesos patológicos (Shang y col., 2014).

En la última década, se han incorporado algunos ensayos de gran utilidad y eficacia que requieren pequeñas cantidades de muestras y permiten la evaluación rápida de extractos crudos y fracciones, conduciendo con seguridad a los principios activos y descartando todo lo que no sea de interés. Hay que indicar claramente la diferencia entre un estudio de productos naturales convencional, cuyo objetivo es el conocimiento de los componentes químicos de una planta, y la búsqueda de nuevos productos bioactivos que depende siempre de los ensayos biológicos que guían el fraccionamiento y el aislamiento final (Pino y Lazo, 2010).

Un lugar sobresaliente dentro del grupo de bioensayos más utilizados lo ocupa el ensayo de *Artemia salina*. Este es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal del extracto en larvas de *A. salina*., y de esta manera se predice su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos, matar insectos y/o ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos (Pino y Lazo, 2010).

Por otra parte, la peroxidación lipídica es conocida como uno de los principales factores que producen el olor o el sabor desagradable de los aceites o grasas en descomposición en los alimentos, y podría estar relacionado con una causa de envejecimiento y carcinogénesis (Sugaya y col., 1998).

Los antioxidantes son los principales productos químicos que protegen las células de la peroxidación lipídica; por ello, una forma inteligente de cuidar nuestro organismo es consumiendo productos ricos en antioxidantes, destacándose los de origen natural, ya que

compuestos químicos como por ejemplo los flavonoides y los glucósidos presentes en algunas plantas, hacen que las células alarguen su proceso de vida y le resten fuerza al fenómeno de oxidación que tiende a dañarlas (Sugaya y col., 1998).

Partiendo de todo lo dicho, se decidió investigar los extractos de las partes aéreas de *Leonurus japonicus*; con la finalidad de encontrar moléculas antioxidantes naturales y descartar la toxicidad de dicha planta, de manera que ésta, pueda ser utilizada en la prevención o tratamiento de determinadas enfermedades.

Debido a esto surgió la siguiente interrogante: ¿Cuál es la relación que existe entre la composición química y la actividad biológica de los extractos de las partes aéreas de *Leonurus japonicus*?

### **Justificación de la investigación**

La sabiduría popular conoce las cualidades curativas de muchas plantas de su medio y, a través del tiempo ha estimulado a la ciencia para descubrir los principios activos de especies botánicas, lo que ha propiciado la fabricación industrial de medicamentos.

Muchos nuevos compuestos naturales están aislados, caracterizados y publicados sin ningún tipo de prueba biológica. Sus útiles actividades biológicas pueden permanecer desconocidas durante años. Sin los datos biológicos que lo acompañan, el descubrimiento de nuevos constituyentes de plantas medicinales no es más que pura fitoquímica.

En la actualidad hay un incremento en el número de enfermedades causadas ya sea por sustancias tóxicas o por la acción de agentes que oxidan moléculas vitales del organismo.

Por lo señalado anteriormente nos resulta de gran importancia, estudiar la composición química y actividad biológica que pueda presentar la especie *Leonurus japonicus*, con la finalidad imprescindible de ofrecer una cura o prevención a una enfermedad, de manera natural.

Este proyecto de investigación tiene una justificación práctica, ya que su desarrollo podría ayudar a resolver un problema o proponer estrategias que al aplicarse podría contribuir a resolverlo.

### **Objetivos de la Investigación**

#### **Objetivo General**

Confirmar la relación que existe entre la composición química y la actividad biológica de los extractos de las partes aéreas de *Leonurus japonicus*.

#### **Objetivos Específicos**

- Determinar la composición química cualitativa de los extractos de las partes aéreas de *L. japonicus*., a través de pruebas químicas específicas.
- Cuantificar el contenido de polifenoles en el extracto etanólico de *L. japonicus*.
- Comprobar la actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *L. japonicus*.
- Valorar la toxicidad sobre *Artemia salina* del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*.

## **Alcances y Limitaciones de la Investigación**

Con la realización de este proyecto de investigación se buscó confirmar la relación que existe entre la composición química y la actividad biológica de los extractos de las partes aéreas de *Leonurus japonicus*, lo cual puede convertirse en una alternativa natural para la cura de una enfermedad.

Para desarrollar este trabajo de investigación se presentaron limitaciones en cuanto a la disponibilidad de materiales en general, reactivos, aparatos, instrumentos, que son necesarios para la ejecución de la parte experimental, o de recursos económicos para costear los mismos.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Trabajos Previos

Zhou y col. (2019), estudiaron la composición química del extracto etanólico de *Leonurus japonicus*. El objetivo del estudio fue ampliar los conocimientos de la composición fitoquímica del género *Leonurus* y demostrar la presencia de metabolitos nuevos y poco comunes presentes en las plantas pertenecientes a la familia Lamiaceae. La determinación fue realizada mediante análisis espectroscópico, logrando identificar tres nuevos triterpenoides y 17 triterpenoides conocidos, pertenecientes a cicloartano, taraxastano, oleanano, ursano, lupano, eufano y damarano, que, a pesar de ser conocidos, no habían sido reportados en el género *Leonurus*, excepto el tipo ursano.

Gan, Han, Wang y Yang (2019) evaluaron la actividad antimicobacteriana de *Leonurus japonicus* en el tratamiento de la tuberculosis genital. Para ello, utilizaron el extracto obtenido a partir de las partes aéreas de ésta especie, y realizaron un ensayo de microtitulación con resazurina (REMA), un indicador redox que permite detectar la viabilidad de las células por la conversión de una tinción no fluorescente a un color rojo altamente fluorescente en respuesta a una reducción química del medio de cultivo resultado del crecimiento celular; empleando el modelo de ratas infectadas en el útero con *Mycobacterium tuberculosis*, para así probar el efecto antituberculoso de dicho extracto. Los resultados mostraron que la leonurina presente en la planta, produjo intervenciones significativas en el metabolismo de los lípidos de *M. tuberculosis* y se redujo significativamente la carga micobacteriana en el útero de las ratas; demostrando que puede ser un candidato preclínico prometedor para el tratamiento de la tuberculosis genital.

Lai y col. (2018) analizaron el extracto de *Leonurus japonicus*, con el objetivo de investigar sus componentes activos y propiedades; logrando aislar seis nuevos diterpenoides, clasificados como halimano y lábdano, junto con 19 compuestos conocidos. Sus estructuras se dilucidaron mediante datos espectroscópicos de Resonancia Magnética Nuclear, EM (Espectrometría de masas), Espectroscopia infrarroja, Espectroscopia UV, y ESD (estudio espectroscópico experimental y computacional). Los compuestos aislados contenían una diversidad de estructuras y propiedades biológicas; de los cuales los norisoprenos, lignanos, y flavonoides podrían ser utilizados como estimuladores de melanogénesis, como potentes antioxidantes, y podrían proteger la piel de daño por radicales libres. Los resultados demostraron que los compuestos aislados pueden ser cosmeceúticos, útiles para el tratamiento y prevención de trastornos de la piel como hipopigmentación, hiperpigmentación, y antienvjecimiento.

Lee, Park y Ma (2018) investigaron los efectos farmacológicos del extracto etanólico de *Leonurus japonicus* en la enfermedad del hígado graso no alcohólico, también conocida como esteatosis hepática. Para ello, utilizaron un modelo *in vitro*, tratado con ácidos grasos libres en células HepG2 (células de carcinoma hepático humano) y a su vez establecieron un modelo de hígado graso no alcohólico *in vivo* usando ratones alimentados con una dieta alta en grasas y a los cuales se le administro el extracto por vía oral durante 14 semanas. El estudio mostró que el extracto inhibió la acumulación de lípidos en células de carcinoma hepático humano inducidas por ácidos grasos libres significativamente. En ratones obesos inducidos por dieta alta en grasas, disminuyó el aumento de peso corporal, niveles séricos de la alanina aminotransferasa (ALT), tenamfetamina (MDA), glucosa, insulina, lípidos hepáticos y triglicéridos. Los autores concluyeron que el extracto etanólico de *L. japonicus*. podría ser un agente terapéutico potencial para tratar la esteatosis hepática.

Liu y col. (2018) analizaron el extracto etanólico de *Leonurus japonicus*, con el objetivo de observar sus efectos uterotónicos. Para ello, analizaron la composición química del extracto y además le suministraron dicho extracto a ratas adultas normales. Las pruebas realizadas arrojaron como resultado un aislamiento de cuatro ciclopéptidos, nueve alcaloides y tres glucósidos de flavonoides; donde, los ciclopéptidos y los alcaloides promovieron la contracción del músculo liso uterino de las ratas, mientras que los glucósidos flavonoides tuvieron los efectos opuestos.

Nguyen y col. (2017), analizaron el extracto hexanoico de las partes aéreas de *Leonurus japonicus*; con el objetivo de determinar su composición química y evaluar la actividad inhibidora de la  $\alpha$ -glucosidasa del extracto y los compuestos aislados. Para ello, utilizaron métodos espectroscópicos, principalmente Resonancia Magnética Nuclear. Los investigadores, aislaron dos nuevos compuestos: Un diterpenoide labdano, denominado leojaponina; un norlabdano (Metil-15,16-dinor-7-oxolabda-8-eno-14-oato); junto con cuatro labdanos conocidos: Hispanona, leoheteroninas A- B y 15-metoxileoheteronina B, además de, tres norlabdanos: Ácido 14,15,16-trinor-7-oxolabda-8-eno-13-oico; Metil 14,15,16-trinor-7-oxo-labda-8-eno-13-oato; 14,15-dinor-8-labdeno-7,13-diona y un esteroide, estigmast-4-eno-3-ona; además, al evaluar la actividad inhibidora de la  $\alpha$ -glucosidasa de los compuestos aislados, el 15-metoxileoheteronina B, exhibió la mayor actividad, con un valor de  $CI_{50}$  de 26.7  $\mu$ M (en comparación con el control positivo acarbossa,  $CI_{50}$ = 214.5  $\mu$ M).

Peng, Zheng, Wang y Dai (2017) analizaron una porción del extracto etanólico obtenido a partir de las partes aéreas de *Leonurus japonicus*; con el objetivo de determinar su composición química e investigar sus efectos sobre la agregación plaquetaria. Su composición fue determinada por análisis espectroscópicos y evidencias fisicoquímicas; lo que condujo al aislamiento de tres nuevos diterpenoides de labdano leojaponas A – C, y un nuevo análogo

artificial, junto con dos diterpenoides y dos sesquiterpenoides conocidos de labdano. Además, al investigar sus efectos sobre la agregación plaquetaria inducida por el difosfato de adenosina; en lugar de inhibir la agregación plaquetaria anormal, la leojapona A y C, la aumentaron significativamente.

Wu y col. (2017), estudiaron la composición de *Leonurus japonicus*. El objetivo del estudio fue aislar e identificar los compuestos presentes en la planta, y evaluar la actividad inhibidora sobre la acetilcolinesterasa de estos compuestos. Las estructuras químicas de los mismos se elucidaron por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), incluidas las técnicas espectroscópicas Coherencia Heteronuclear Cuántica Múltiple (HMQC) y Conectividad Heteronuclear a enlaces múltiple (HMBC). Como resultado, los autores lograron aislar e identificar tres nuevos diterpenoides de labdano: Leojaponicona A, isoleojaponicona A y metilisojaponicona A. Todos los nuevos compuestos fueron probados *in vitro* para determinar su actividad inhibidora sobre la acetilcolinesterasa y la  $\alpha$ -glucosidasa, observándose que la leojaponicona A y la metilisojaponicona A, exhibieron bajos efectos inhibitorios sobre la  $\alpha$ -glucosidasa con respecto a la acarbosa y altos efectos inhibitorios sobre la acetilcolinesterasa con respecto a la huperzina A.

Jiang, Li, Feng, Yang y Zhang (2015), analizaron las partes aéreas de *Leonurus japonicus*, con el objetivo de identificar nuevos compuestos no reportados en la especie, como resultado, aislaron tres nuevos ácidos glucáricos: 2-feruloil-4-siringoilo (Ácido 5-feruloil-3-siringoilo glucárico); 2-siringoilo-4-feruloilo (Ácido 5-siringoilo-3-feruloilo glucárico) y 3-feruloil-4-siringoilo (Ácido 4-feruloil-3-siringoilo glucárico). Sus estructuras se elucidaron por métodos espectroscópicos detallados que incluyen Resonancia Magnética Nuclear, Ultravioleta, Infrarrojo y HR-ESI-MS (Espectrometría de Masas por Ionización por Electropulverización de Alta Resolución). Determinaron la actividad hepatoprotectora de los compuestos bioactivos aislados,

donde, el compuesto 2-siringoil-4-feruloilo, exhibió una actividad hepatoprotectora moderada y la tasa de supervivencia celular fue del 74 % ( $10^{-5}$  mol / L), utilizando biciclol (tasa de supervivencia: 66 %,  $10^{-5}$  mol / L) como control positivo. Además, se evaluaron las actividades citotóxicas *in vitro* de estos compuestos que no mostraron actividad.

Wu y col. (2015), analizaron el extracto etanólico de la hierba de *Leonurus japonicus*. El objetivo del estudio fue el aislamiento y elucidación estructural de los compuestos presentes en dicho extracto. Las estructuras químicas se determinaron mediante análisis de resonancia magnética nuclear (NMR), y HRESIMS. Como resultado, lograron aislar e identificar dos nuevos diterpenoides de tipo labdano, 5-etoxi-3-(2-((R)-4-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-3-oxo-3,5,6,7,8,8a-hexahidronaftaleno-1-il)-etil)-furan-2(5H)-ona y 5-hidroxi-4-(2-((1R,3S,7aS)-1-hidroxi-4,4,7a-trimetil-3-propioniloctahidroisobenzofuran-1-il)etil)furan-2(5H)-ona.

Zhou y col. (2015) analizaron el extracto etanólico de *Leonurus japonicus*, con el objetivo de identificar βlos compuestos presentes en la planta. Sus estructuras fueron aclaradas por métodos espectroscópicos y químicos. Los autores reportaron el aislamiento de dos nuevos ésteroides, (24S)-stigmast-4,28-dien-24-ol-3-ona (1) y mono-β-sitosteril azelato (2), junto con diez conocidos, destacándose (24R)-5α-stigmast-3,6-dione, β-sitosterol y 3β-hidroxi-7α-etoxi-24-β-etilcolest-5-eno. Los compuestos (24R)-5α-stigmast-3,6-diona, β-sitosterol y 3β-hidroxi-7α-etoxi-24-β-etilcolest-5-eno, mostraron actividades inhibitorias significativas contra la agregación plaquetaria inducida por ADP, mientras que el compuesto (24S)-stigmast-4,28-dien-24-ol-3-ona tuvo una actividad citotóxica débil contra la línea celular MV4-11 de leucemia mieloide aguda.

Kuchta, Ortwein, Hennig y Rauwald (2014) realizaron la cuantificación de estaquidrina en *Leonurus japonicus* y *Leonurus cardiaca*. Cabe señalar que, al no contener la estaquidrina

ningún cromóforo adecuado, se dificultaba su detección por la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia a través de luz ultravioleta. Es por ello que decidieron aplicar la técnica de espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), con el fin de comparar su eficacia en la cuantificación de dicho compuesto. Los resultados del estudio concluyeron que RMN es una técnica exacta en la cuantificación de estaquidrina y por ello puede ser una herramienta de gran alcance para indicar su concentración en plantas y drogas herbarias, como es el caso de *L. japonicus*. y *L. cardiaca*.

Zhang y col. (2013) analizaron las partes aéreas de *Leonurus japonicus* y lograron aislar cinco nuevos compuestos glucósidos, flavónicos denominados leonurusoides (A-E) unidos a un sexto compuesto denominado 2-siringolrutina. Sus estructuras fueron estudiadas por métodos químicos y espectroscópicos y los resultados mostraron que los compuestos encontrados presentan efectos inhibidores de la acumulación de triglicéridos (TG) en células hepáticas HepG2 inducidas por ácidos grasos libres.

Zhou y col. (2013), estudiaron la presencia de compuestos aromáticos en el extracto etanólico de *L. japonicus*, recolectada en China. y lograron aislar tres lignanos, cinco cumarinas, dos compuestos aldehído aromáticos pequeños y un fenilpropanoide. Las cumarinas aisladas habían sido reportadas anteriormente en la familia Labiatae pero no en el género *Leonurus*.

Moon (2010) examinó los efectos citoprotectores de *Leonurus japonicus* partiendo de la toxicidad inducida por glutamato en neuronas corticales a partir de los extractos metanólicos de la especie. Los autores realizaron el aislamiento e identificación de los compuestos activos *L. japonicus*., identificando tres diterpenos: Hispanolona, leojaponina e isopreleoheterina. De estos tres compuestos, leojaponina mostró actividades citoprotectoras significativas contra la toxicidad

inducida por glutamato. Es por ello que concluyó, que el efecto citoprotector de *L. japonicus*. podría deberse a la inhibición de la toxicidad inducida por glutamato por los diterpenos que contiene.

### **Antecedentes Históricos**

Se puede afirmar que el uso de las plantas medicinales nació con el hombre. Desde tiempos prehistóricos hasta comienzos del siglo XIX se utilizaron por ensayo y error, extractos que podían ser utilizados para la cura de enfermedades. Esta práctica médica fue perfeccionándose de generación en generación, por lo cual se denominó medicina tradicional (Lizcano y Vergara, 2008).

Hasta el siglo XVIII, se conocieron las propiedades curativas de las plantas, su efecto sobre el organismo y su modo de aplicación, desconociendo en muchas de los casos la composición y caracterización de los principios activos. Con el desarrollo de las teorías de la evolución, herencia genética, el uso del microscopio y el nacimiento de ciencias como la fitoquímica, fue posible el reconocimiento y el aislamiento de principios activos de muchas especies vegetales (Lizcano y Vergara, 2008).

La mayoría de los principios activos se han obtenido sintéticamente en laboratorios, para su posterior uso en la preparación de medicamentos químicos. Con el paso de los años el consumo de medicamentos sintéticos se incrementó, desplazando cada vez más el uso directo de plantas medicinales alejándose así de la medicina tradicional (Lizcano y Vergara, 2008).

Desde tiempos muy remotos las plantas han cumplido un papel importante en el área terapéutica gracias a las múltiples propiedades que ellas poseen. Por esta razón, en las últimas décadas ha ido tomando cada día mayor importancia su estudio y el desarrollo de técnicas

analíticas que permitan la determinación e identificación de las sustancias o principios activos contenidos en especies vegetales (Lizcano y Vergara, 2008).

En la actualidad, el gran desafío para los países ricos en biodiversidad es poder vincular y convertir el conocimiento proveniente de los recursos biológicos en compuestos, procesos, métodos, herramientas o productos útiles, como parte del aprovechamiento y la explotación sostenible de la diversidad biológica en beneficio de la sociedad (Lizcano y Vergara, 2008).

## **Bases Teóricas**

### **Familia Lamiaceae**

La familia Lamiaceae (Labiatae), es la sexta familia de plantas más grande que existe con más de 200 géneros y más de 7000 especies (Bekut y col., 2018). 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 (OMS, 2014). 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 (Velázquez, 1995).

Las plantas de la familia Lamiaceae, son generalmente hierbas, perennes o anuales, raramente suculentas, pero también plantas arbustivas, y con menor frecuencia enredaderas e incluso árboles. Usualmente son aromáticas y de uso extendido. La mayoría de la familia presenta aceites esenciales y otros compuestos de importancia a nivel farmacológico, médico, microbiológico y químico. Crecen en todo tipo de hábitat, son especies de lugares abiertos, pero

se encuentran principalmente en el Mediterráneo y el suroeste de Asia y apenas en los bosques tropicales (Gordillo, 2016).

### Composición química de la familia Lamiaceae

**Terpenos:** Estudios recientes sobre la planta de orégano (*Origanum vulgare L.*) demuestran que sus aceites volátiles son muy valiosos por sus propiedades antioxidantes debido a su actividad contra radicales libres, en los procesos redox que ocurren a nivel celular. La actividad antioxidante del orégano se atribuye al alto contenido de los terpenoides aromáticos 5-isopropil-2-metilfenol (1) y timol (2) (Ruiz y Moreira, 2017).

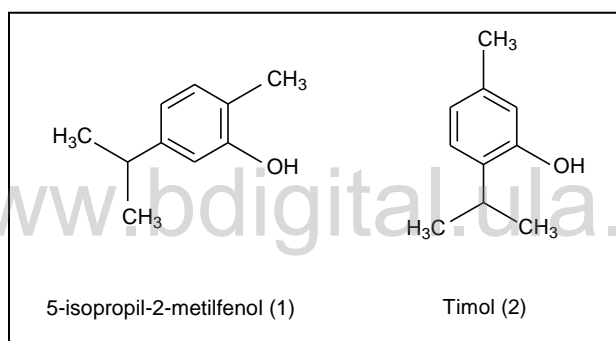


Figura 1. Estructura química de los terpenoides aromáticos reportados en el orégano (Ruiz y Moreira, 2017)

**Flavonoides:** En muchas especies de Lamiaceae como el *Origanum vulgare L.* (orégano), la *Mentha sativa L.* (hierbabuena), la *Salvia officinali* (salvia) y el *Thymus* (tomillo) se aíslan los flavonoides apigenina (3) y luteolina (4), los cuales juntos con otros compuestos fenólicos, son los que más contribuyen a la actividad antioxidante (Ruiz y Moreira, 2017).

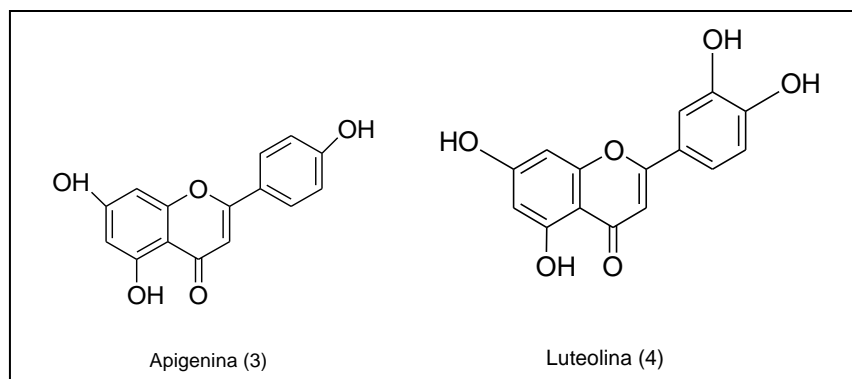


Figura 2. Estructura química de algunos flavonoides reportados en la familia Lamiaceae (Ruiz y Moreira, 2017).

**Polifenoles:** El más común es el ácido rosmarínico (5), el cual está presente en plantas como la menta o el tomillo. Estudios biológicos y farmacológicos recientes han demostrado que este fitoquímico posee muchos efectos beneficiosos, que incluyen actividades antivirales, antibacterianas, antioxidantes, antiinflamatorias, antiangiogénicas, antidepresivas, anticancerígenas y antihepatotóxicas (Knežević y col., 2014). En la figura 3, se muestra la estructura del ácido rosmarínico (5).

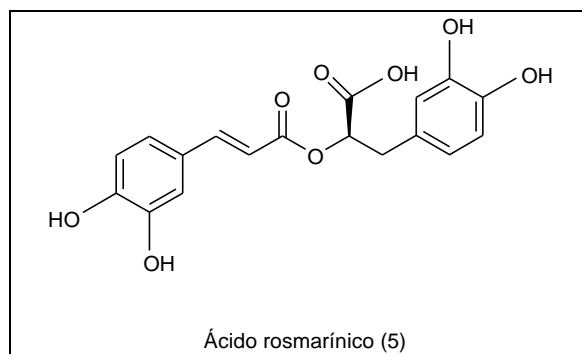


Figura 3. Estructura química del ácido rosmarínico (Knežević y col., 2014).

### Género *Leonurus*

El género *Leonurus* pertenece a la familia Lamiaceae, originariamente crece en la zona templada de Asia y Europa y fue posteriormente introducido en América y África. Se han

identificado cerca de 24 especies de *Leonurus*, de las cuales 13 especies se encuentran distribuidas en China (Zhang y col., 2018)

Según figura en la obra Flora Ibérica se conocen alrededor de 23 especies del género *Leonurus* repartidas por toda Europa y Asia y al menos una especie más en América. Numerosas especies de este género le han servido al hombre, especialmente, en el campo de la medicina popular (Shang y col., 2014)

Las plantas pertenecientes a este género (Tabla 1), se usan tradicionalmente para el trastorno ginecológico en el este de Asia y como sedante en Europa (Zhang y col., 2018).

Tabla 1.  
*Algunas especies pertenecientes al género Leonurus*

<i>L. cardiaca</i>	<i>L. kuprijanoviae</i>	<i>L. pseudomacranthus</i>	<i>L. tibeticus</i>
<i>L. chaituroides</i>	<i>L. macranthus</i>	<i>L. pseudopanzerioides</i>	<i>L. turkestanicus</i>
<i>L. deminutus</i>	<i>L. mongolicus</i>	<i>L. pubescens</i>	<i>L. villosissimus</i>
<i>L. glaucescens</i>	<i>L. nuristanicus</i>	<i>L. quinquelobatus</i>	<i>L. wutaishanicus</i>
<i>L. incanus</i>	<i>L. panzerioides</i>	<i>L. royleanus</i>	<i>L. urticifolius</i>
<i>L. japonicus</i>	<i>L. persicus</i>	<i>L. tataricus</i>	

### Usos farmacológicos

Se ha reportado, el efecto de protección cardiovascular de la leonurina, uno de los compuestos químicos presentes en este género, también, se le ha atribuido actividad de neuroprotección, antiinflamatoria, anticancerígeno, agregación plaquetaria y muchas otras actividades biológicas, además, diversos compuestos tienen actividad antiinflamatoria, como el diterpenoides labdano, cuyo potencial terapéutico aún continúa siendo investigado (Zhang y col., 2018).

## Composición química del género *Leonurus*

**Alcaloides:** La estaquidrina (6) y la trigonelina (19) son dos alcaloides que se encuentran en gran parte de las especies del género *Leonurus*, entre ellas la *Leonurus cardiaca* (Zhang y col., 2018).

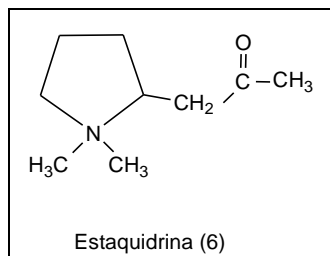


Figura 4. Estructura química de la estaquidrina (Zhang y col., 2018).

**Terpenos:** Se han aislado e identificado diterpenoides como la isomacrantina F (7) en la especie *Leonurus macranthus* y leopersina L (8) en la especie *Leonurus persicus*; y triterpenoides como el ácido ursólico (9), en la especie *L. cardiaca* (Zhang y col., 2018).

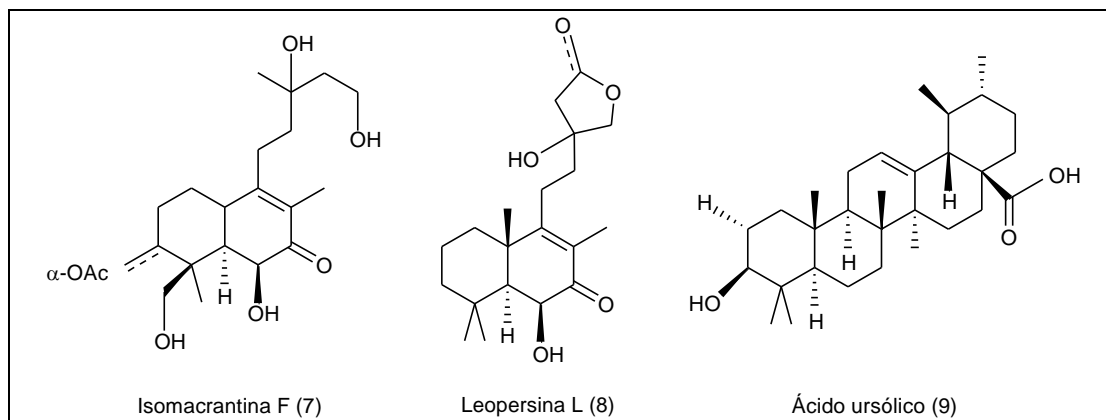


Figura 5. Estructuras químicas de algunos terpenoides reportados en el género *Leonurus* (Zhang y col., 2018).

**Flavonoides:** Se aislaron varios flavonoides y glucósidos flavonoides de las partes aéreas de *L. persicus* y *L. cardiaca*, entre ellos tenemos la daidzeína (10), astragalina (11) y vitexina (12) (Zhang y col., 2018).

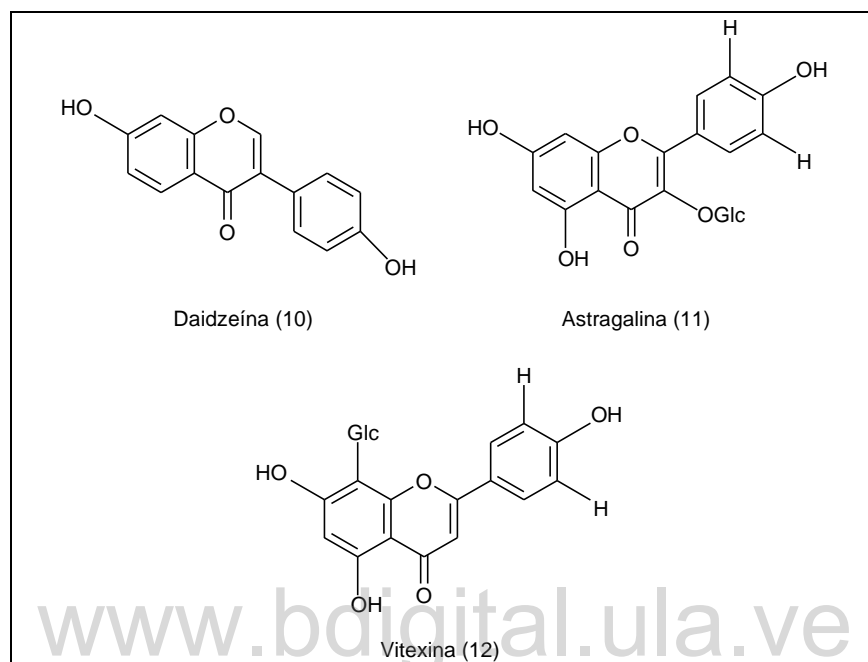


Figura 6. Estructuras químicas de flavonoides reportados en el género *Leonurus* (Zhang y col., 2018).

**Esteroides:** Se han aislado una variedad de esteroides y glucósidos esteroideos, entre los que se encuentran la  $\beta$ -sitosterona (13) y ciatisterona (14) (Zhang y col., 2018).

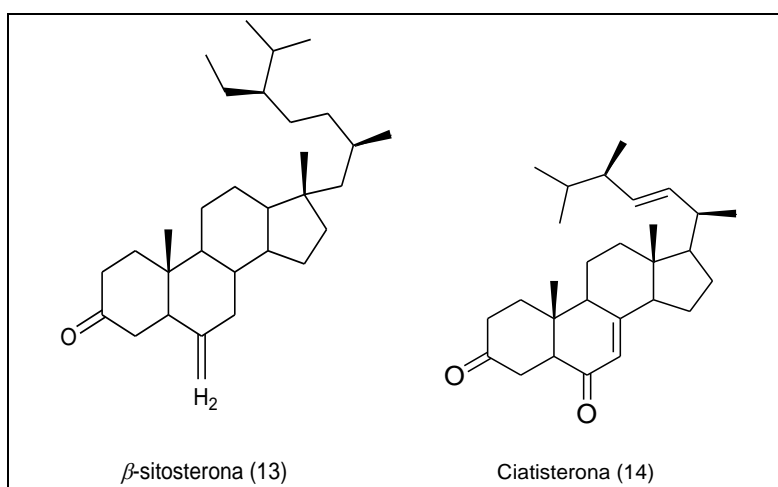


Figura 7. Estructuras químicas de compuestos esteroideos reportados en el género *Leonurus* (Zhang y col., 2018).

**Fenilpropanoides y glucósidos fenólicos:** Como el primer glucósido fenilpropanoide informado de este género, el ácido cafeico-4-rutinósido (15) se aisló de las hojas y flores de *L. cardiaca*. En *L. glaucescens*, una especie distribuida en Asia central y occidental, se obtuvo una serie de fenilpropanoides, entre los que destaca el verbascosido (16). Por último, en las partes aéreas de *L. persicus*, se identificó el eugenol rutinosoide (17) (Zhang y col., 2018).

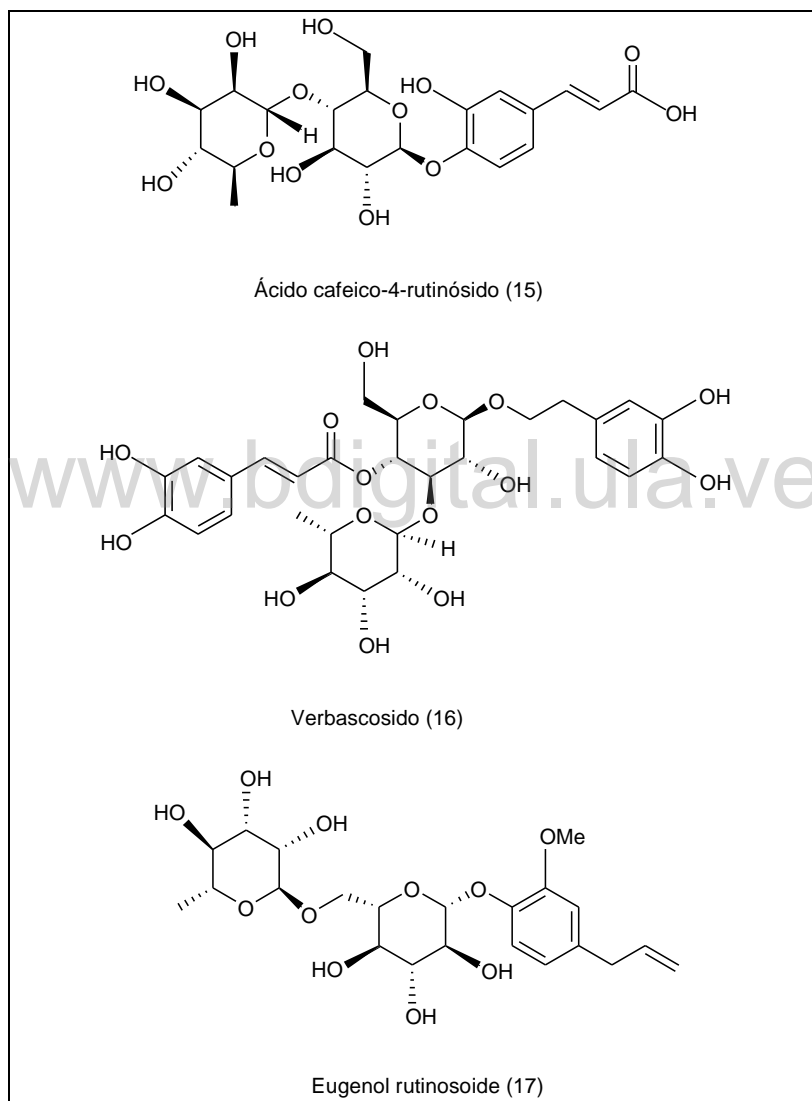


Figura 8. Estructuras químicas de fenilpropanoides y glucósidos fenólicos reportados en el género *Leonurus* (Zhang y col., 2018).

### **Especie *Leonurus japonicus***

También conocido como “cola de león” o “agripalma” es un género de plantas florales anuales/bienales (Pérez, 2013).

Esta planta puede llegar a alcanzar noventa centímetros de altura, florece de julio a septiembre y las semillas maduran de agosto a septiembre. Se vale de antófilos para polinizar sus flores de color rosa con toques magenta y blanco dotadas de unidades reproductivas hermafroditas. Son aptas para suelos ligeros (arenosos), medios (limosos) y pesados (arcilla) y pueden crecer en suelos nutricionalmente pobres y en semi sombra (bosque claro) o sin sombra, prefiere el suelo húmedo (Pérez, 2013).

### **Usos farmacológicos**

Una revisión realizada, revela que, durante años, la parte aérea de *Leonurus japonicus*, se ha utilizado principalmente para tratar la menoxenia, la dismenorrea, la amenorrea, el edema del cuerpo, las llagas, las ulceraciones y otras enfermedades en las mujeres (Shang y col., 2014).

Es utilizada comúnmente en la herbolaria china, donde es considerada como una de las 50 hierbas fundamentales. Las hojas son diuréticas y se colocan en el agua del baño para aliviar el picor en el herpes zóster. Las flores secas se utilizan en el embarazo y para ayudar a expulsar la placenta después del parto, el fruto es antibacteriano, diurético, hipotensor y vasodilatador, se utiliza en el tratamiento de la menstruación anormal, nebulosa y conjuntivitis (Duke y Ayensu, 1985).

La planta fue clasificada como número uno, en una encuesta de 250 plantas de anti-fertilidad potencial en China. La semilla se utiliza en el tratamiento de la conjuntivitis y ceguera nocturna,

en el tratamiento de la menstruación anormal, dolor abdominal postparto, tumores, hemorragias uterinas, edema y absceso purulento. También se utiliza externamente como cataplasma para las contusiones, estimula la circulación sanguínea (Duke y Ayensu, 1985).

### Clasificación taxonómica



Figura 9. Clasificación taxonómica de la especie *L. japonicus* (Chu, Wu y Li, 1989).

www.bdigital.ula.ve

### Composición química de *Leonurus japonicus*

Miao y col. (2019) han publicado recientemente una revisión acerca de los compuestos que han sido aislados e identificados en *Leonurus japonicus* hasta el año 2019, encontrando así, un total de 284 compuestos, agrupados en diferentes grupos de metabolitos, como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2.  
Composición química de *L. japonicus*

Compuesto	Nombre
<b>Monoterpenoides</b>	9-Hidroxilinalool-6- <i>O</i> -glucosido
	9-Hidroxilinalool-9- <i>O</i> -glucosido
	Ajugosido
	(-)-Loliolido

Continuación Tabla 2.  
*Composición química de Leonurus japonicus*

Compuesto	Nombre
<b>Sesquiterpenoides</b>	Stafilionosido E
	(7E,9E)-9-Hidroxi-5,7-megastigmadien-4-ona
	9-Hidroxi-megastigma-4,7-dien-3-ona-9-O-glucopiranosido
	Citrosido A
	Megastigmano
	3-Oxo- $\alpha$ -ionona
	(+)-Dehidrovomifoliol
	(6S,9R)-Vomifoliol
	(3S,5R,6S,7E,9R)-5,6-Epoxi-3,9-dihidroxi-7-megastigmeno [22]
	5,6-Epoxi-3-hidroxi-7-megastigmen-9-ona
	(+)-3-Hidroxi- $\beta$ -ionona
	(2S,5S)-2-Hidroxi-2,6,10,10-tetrametil-1-oxaspiro-[4.5]dec-6-en-8-one
	Chamigrenal
	Ácido $\beta$ -Chamigrenico.
	(-)-(1S*,4S*,9S*)-1,9-Epoxibisabola-2,10-diene-4-ol
	(-)-(1S*,2S*,3R*)-3-Etoxicupar-5-ene-1,2-diol
	Arteannuin B
	Saniculamoid D
7 $\alpha$ (H)-Eudesmano-4,11(12)-dieno-3-ona-2 $\beta$ -hidroxi-13- $\beta$ -D-glucopiranosido.	
<b>Diterpenoides</b>	Prehispanolona
	Iso-preleoheterina
	Preleoheterina
	13-Epi-preleoheterina
	16-Oxo-leoheteronona A
	(+)-(5S,7R,8R,9R,10S,13S,15R)-7-Hidroxi-15-metoxi-9,13;15,16-diepoxilabdan-6,16-diona
	14,15-Dihidroprehispanolona
	Leoheteronona B
	15-Epileoheteronona B
	Leopersina B
	15-Epileopersina B

Continuación Tabla 2.  
*Composición química de Leonurus japonicus*

Compuesto	Nombre
	Leoheteronona A
	6 $\beta$ ,15 $\alpha$ -Dihidroxi-9 $\alpha$ ,13 $\alpha$ :15,16-bisepoxilabdan-7-ona
	6 $\beta$ ,15 $\beta$ -Dihidroxi-9 $\alpha$ ,13 $\alpha$ :15,16-bisepoxilabdan-7-ona
	Leoheteronona D
	15-Epileoheteronona D
	Leoheteronona E
	15-Epileoheteronona E
	Leoheteronona C
	Leosibirinona A
	Isoleopersin J
	15-Epi-isoleopersin J
	(+)-(5 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,15 <i>R</i> )-7-Hidroxi-15-etoxi-9,13;15,16-diepoxilabdan-6-ona
	(-)-(5 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,15 <i>S</i> )-7-Hidroxi-15-metoxi-9,13;15,16-diepoxilabdan-6-ona
	(3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,9 $\alpha$ ,15 $\beta$ )-9,13:15,16-Diepoxi-15-etoxi-3,7-dihidroxilabdan-6-ona
	(3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,9 $\alpha$ ,15 $\alpha$ )-9,13:15,16-Diepoxi-15-etoxi-3,7-dihidroxilabdan-6-ona
	(3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,9 $\alpha$ ,15 $\alpha$ )-3-Acetiloxi-9,13:15,16-diepoxi-7-hidroxi-15-methoxilabdan-6-ona
	(-)-(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,15 <i>S</i> )-3-Acetoxi-7-hidroxi-15-metoxi-9,13;15,16-diepoxilabdan-6-ona
	(3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,9 $\alpha$ ,15 $\alpha$ )-3-Acetiloxi-9,13:15,16-diepoxi-15-etoxi-7-hidroxilabdan-6-ona
	(3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,9 $\alpha$ ,15 $\beta$ )-3-Acetiloxi-9,13:15,16-diepoxi-15-etoxi-7-hidroxilabdan-6-ona
	Leosibirona B
	15-Epi-leosibirona B
	Leopersina C
	15-Epileopersina C
	3 $\alpha$ -Acetoxi-15-O-metilleopersin C
	(-)-(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,15 <i>R</i> )-3-Acetoxi-7-hidroxi-15-etoxi-9,13;15,16-diepoxilabdan-6-ona

Continuación Tabla 2.  
*Composición química de Leonurus japonicus*

Compuesto	Nombre
	(-)-(5S,7R,8R,9R,10S,13R,15R)-7-Hidroxi-15-ethoxi-9,13;15,16-diepoxilabdan-6-ona
	Leopersina G
	Leoheteronina E
	Leoheteronina A
	Leoheteronina C
	Leoheteronina B
	15-Metoxileoheteronin B
	Leojapona C
	Leojaponicin
	Leojaponicona A
	Isoleojaponicona A
	Metiliseojaponicona A
	Leoheterina
	Leojaponea A
	Isoleosibirina
	Hispanolona
	Galeopsina
	6 $\beta$ ,9 $\alpha$ -Dihidroxi-15,16-epoxi-13(16),14-labdadien-7-ona
	15,16-Epoxi-3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,9 $\alpha$ -trihidroxilabda-13(16),14-dien-7-ona
	15,16-Epoxi-6 $\beta$ ,9 $\alpha$ -dihidroxilabda-13(16),14-dien-3,7-diona
	Hispanona
	15,16-Epoxi-3 $\alpha$ -hidroxilabda-8,13(16),14-trien-7-ona
	6 $\beta$ -Hidroxi-15,16-epoxilabda-8,13(16),14-trien-7-ona
	Heteronona A
	Leojapona B
	Leojaponina
	Heteronona B
	Leojaponina C
	(6 $\beta$ )-15,16-Epoxi-15-etoxi-6,13-dihidroxilabd-8-en-7-ona
	Leojapona D
	Leojaponina I
	Leojaponina E

Continuación Tabla 2.  
*Composición química de Leonurus japonicus*

Compuesto	Nombre
	Leojaponina F
	Methoxilsecolabdano
	Seco-labdano
	Secoleojaponol
	8,9-Secohispanolona
	(-)- $\epsilon$ 8-Acetoxi-15,16-epoxi-8,9-seco-13(16),14-labdadiene-7,9-diona
	Leojaponina D
	Leojaponina B
	Villenol
	Leoheteronina D
	Leoheteronina F
	Leojaponina K
	Leojaponina L
	Leojaponina J
	Ácido Leojaponico B
	(+)-14,15-Bisnorlabda-8-en-7,13-diona
	Ácido Leojaponico A
	Metil 15,16-dinor-7-oxolabda-8-ene-14-oate
	(-)-3 $\alpha$ -Acetoxi-6 $\beta$ -hidroxi-15,16-dinorlabd-8(9)-eno-13-ine-7-ona
	Leonuketal
	Isoleojaponina
	Leojaponina G
	Leojaponina H
	Leojaponina A
<b><i>Triterpenoides</i></b>	Phlomistetraol B
	Leonurusoleanolido A
	Leonurusoleanolido B
	Leonurusoleanolido C
	Leonurusoleanolido D
	Leonurusoleanolido J
	Leonurusoleanolido G
	Leonurusoleanolido H

Continuación Tabla 2.  
*Composición química de Leonurus japonicus*

Compuesto	Nombre
	Leonurusoleanolido E
	Leonurusoleanolido F
	Leonurusoleanolido I
	(23S)-23-Metoxi-cicloart-24-en-3 $\beta$ -ol
	Cicloart-23,25(26)-dien-3 $\beta$ -ol
	(24R)-Cicloartane-24,25-triol-3 $\beta$ -tetradecanoate
	22 $\alpha$ -Metoxi-20-taraxastene-3 $\beta$ -ol
	12-Oleanene-3 $\beta$ ,21 $\beta$ -diol
	Ácido Oleanolico
	Ácido Urjinolico
	$\beta$ -Amirenol
	Leonuronina B
	Leonuronina A
	Ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-Trihidroxioleana-11,13(18)-dien-28-oico.
	12-En-3 $\beta$ -hidroxi-urs-11-oná
	$\alpha$ -Amirina
	Ácido Ziziberenalico.
	20S-17 $\beta$ ,29-Epoxi-28-norlupan-3 $\beta$ -ol
	28-Norlup-20(29)-ene-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol
	28-Norlup-20(29)-en-3 $\beta$ -hidroxi-17 $\beta$ -hidroperoxido
	Lupeol
	Betulina
	Ácido Betulinico
	Ácido Mesagenico C
	Dihidrobetulina
	Cornusalterina D
	Cornusalterina J
	Foliasalacina A4
<b>Ésteroides</b>	$\beta$ -Sitosterol
	(24S)-Saringosterol
	(3 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-Stigmast-5-ene-3,7-diol
	(3 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-7-Methoxistigmast-5-en-3-ol

Continuación Tabla 2.  
*Composición química de Leonurus japonicus*

Compuesto	Nombre
	3 $\beta$ -Hidroxi-7 $\alpha$ -etoxi-24 $\beta$ -etilcolest-5-eno
	Mono- $\beta$ -sitosteril azelato
	Sitosterol-3- $\beta$ -D-glucosa
	3- $\beta$ -O-(2-Acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil)- $\beta$ -sitosterol
	$\beta$ -Sitosterone
	(24 <i>S</i> )-Stigmast-4,28-diene-24-ol-3-ona
	24 <i>R</i> -5 $\alpha$ -Stigmast-3,6-diona
	Demetilincisterol A <sub>3</sub>
	Ciatisterona
	(22 <i>E</i> ,24 <i>R</i> )-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxiergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol
	5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxi-23-metil-(22 <i>E</i> ,24 <i>R</i> )-ergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol
	(22 <i>E</i> ,24 <i>R</i> )-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxiergosta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol
	(24 <i>R</i> )-3- $\beta$ -O-(2-Acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil)-ergosta-5-eno
	(24 <i>S</i> )-3- $\beta$ -O-(2-Acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil)-ergosta-5-eno
	3- $\beta$ -O-(2-Acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil)-ergosta-5,24(28)-dieno
<i>Alcaloides, amino ácidos, y ciclopeptidos</i>	Cicloleonuripeptido A
	Cicloleonuripeptido B
	Cicloleonuripeptido C
	Cicloleonuripeptido D
	Cicloleonuripeptido E
	Cicloleonuripeptido F
	Cicloleonuripeptide G
	Cicloleonuripeptide H
	Cicloleonurinina
	Hapepunine 3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-rhamnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopiranosido
	Hapepunine 3- <i>O</i> - $\beta$ -cellobiosido
	Libeinosido A
	Imperialine-3 $\beta$ -D-glucosido
	N <sup>1</sup> ,N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -Tri- <i>p</i> -( <i>ZZZ</i> )-coumaroilspermidina
	N <sup>1</sup> ,N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -Tri- <i>p</i> -( <i>EEZ</i> )-coumaroilspermidina
	Juzirina
Leonurina	

Continuación Tabla 2.  
*Composición química de Leonurus japonicus*

Compuesto	Nombre
	10-Metoxi-leonurina
	4-Hidroxi-3,5-dimetoxibenzoicacido 5-guanidinopentil éster
	Estaquidrina
	Colina
	Trigonelina
	3-Hidroxipiridina
	3-Hidroxi-2-metilpiridina
	5-Hidroxi-2-hidroximetilpiridina
	Uracilo
	5-Metiluracilo
	Guanosina
	L-triptofano
	L-Fenilalanina
	Valina
	N-Isobutil-L-valina
	L-Piroglutamato acido metil éster
	Alanina
<b>Flavonoides</b>	Genkwanina
	Hidroxigenkwanina
	Luteolina
	Apigenina
	Wogonina
	5,7,3',4',5'-Pentamethoxi flavone
	Cosmosina
	Espinosina
	Linarina
	Apigenin-7- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopiranosido
	Kaempferol
	Quercetina
	Miricetina
	Kaempferol-3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopiranosido
	Kaempferol-3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -galactopiranosido

Continuación Tabla 2.  
*Composición química de Leonurus japonicus*

Compuesto	Nombre
	Isoquercitrina
	Hiperosido
	Kaempferol-7-O- $\alpha$ -L-rhamnosido
	Kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranoside-7-O- $\alpha$ -L-rhamnosido
	Nicotiflorina
	Kaempferol-3-neohesperidoside
	Kaempferol-3-O- $\beta$ -robinobinosido
	Rutina
	Quercetin-3-O-robinosido
	Tilirosido
	Kaempferol-3-O-(6''-O- <i>cis</i> -p-coumaroil)- $\beta$ -D-glucopiranosido
	Leonurusoido A
	Leonurusoido C
	Leonurusoido E
	Heteronosido
	Leonurusoido B
	Leonurusoido D
	2'''-Siringilrutina
	Quercetin-3-O-[(3-O-siringoil- $\alpha$ -L-rhamnopyranosil)-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosido]
	Daidzeina
<b><i>Fenilpropanoides</i></b>	Ácido Ferulico
	4'-Hidroxi-2,3-dihidrocinnamic ácido tetracosil éster
	Ácido 2-Feruloil-4-siringoil or 5-feruloil-3-siringoil glucarico
	Ácido 2-Siringoil-4-feruloil or 5-siringoil-3-feruloil glucarico
	Ácido 3-Feruloil-4-siringoil or 4-feruloil-3-siringoil glucarico
	Martinosido
	2-(3,4-Dihidroxifenil)-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-6-O- $\beta$ -D-glucopiranosido
	Bergapteno
	Xantotoxina
	Isopimpinellina

Continuación Tabla 2.  
*Composición química de Leonurus japonicus*

Compuesto	Nombre
	Imperatorina
	Isogosferal
	Nodakenina
	Murraiona
	Auraptenol
	Ostol
	Meransina hidratada
	Isomeranzima
	Dimetilgomisina J
	Gomisina K <sub>1</sub>
	Sesamina
	(-)-Pinoresinol
	(-)-Siringaresinol
<i>Otros compuestos</i>	Leonurisido B
	Leonosido E
	CistanosidoE
	Leonosido F
	Leonurisido A
	4-Hidroxibenzaldehido
	Vanillina
	Ácido Siringico
	Siringico acido metil éster
	Ácido Galico
	Ácido 3,4,5-Trimetoxibenzoico
	1-(3-Etilfenil) ethano-1,2-diol
	1,6-Di- <i>O</i> -siringoil- $\beta$ - <i>D</i> -glucopiranososa
	Leonurenosido I
	Leonurenosido II
	2,6-Dimetil-2 <i>E</i> ,7-octadieno-1,6-diol
	(-)-Nonadeca-5,6-dienoico ácido metil éster
	Metil octadeca-5,6-dienoato
	Ácido Arachidico

Continuación Tabla 2.  
*Composición química de Leonurus japonicus*

Compuesto	Nombre
	Ácido Heneicosanoico
	Ácido Heptacosanoico
	Metil miristato

**Alcaloides:** Son los principales compuestos químicos y componentes activos de ésta especie. Los más estudiados son la leonurina (18) y la estaquidrina (6) (Figura 10), los cuales han presentado una amplia gama de actividades farmacológicas. La leonurina es útil para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y enfermedades obstétricas y ginecológicas, además de que el clorhidrato de leonurina, podría inducir la apoptosis de las células del cáncer de pulmón (Miao y col., 2019).

La estaquidrina posee efecto terapéutico en la hipertrofia cardíaca, contracción uterina y en el tratamiento de la hemorragia postparto; además tiene actividad antitumoral, suprime la inflamación, el estrés oxidativo y tiene efectos significativos en el endotelio vascular, ya que puede mejorar la lesión de las células endoteliales de la vena umbilical humana inducida por anoxia y reoxigenación (Miao y col., 2019)

Otros alcaloides reportados son la trigonelina (19) y la colina (20) (Figura 10), los cuales, al realizar pruebas de anticoagulantes, la trigonelina prolongó claramente el tiempo parcial de tromboplastina activada, y tanto la trigonelina como la colina inhibieron la agregación plaquetaria (Miao y col., 2019).

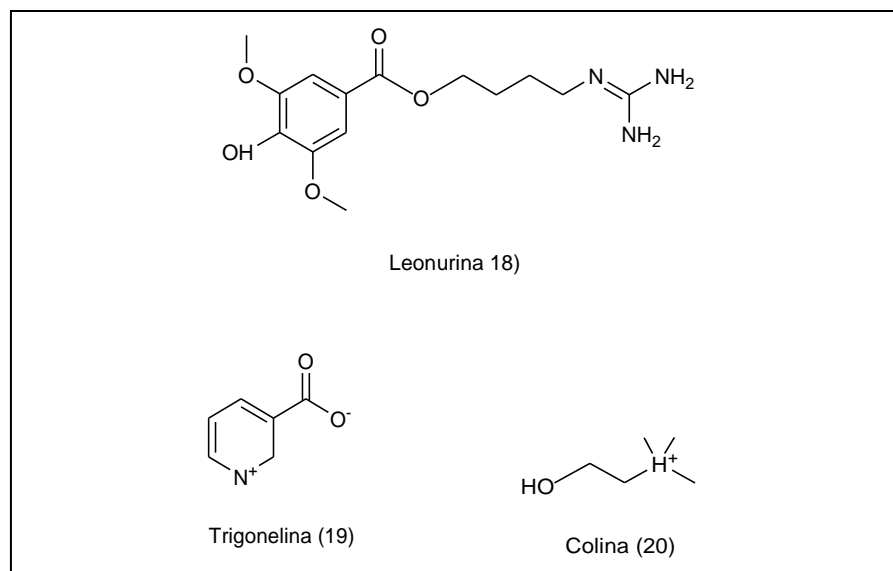


Figura 10. Estructura química de alcaloides reportados en *L. japonicus* (Miao y col., 2019)

**Terpenos:** Actualmente, se han aislado e identificado más de 100 terpenoides (Tabla 2), donde la mayoría son diterpenos derivados del labdano. En relación con sus efectos tradicionales, algunos de los terpenoides mostraron actividades antitrombóticas, vasorrelajantes, antiplaquetarias y antiinflamatorias. Se puede sugerir que los terpenoides son las sustancias efectivas para promover la circulación sanguínea y eliminar el estancamiento sanguíneo. La leojaponina (21) presenta propiedades neuroprotectoras e inhibe la producción de melanina en células tipo melanoma. Otros ejemplos de terpenoides reportados son el ácido leojaponico (22) y la isoleojaponina (23) (Figura 11). (Miao y col., 2019).

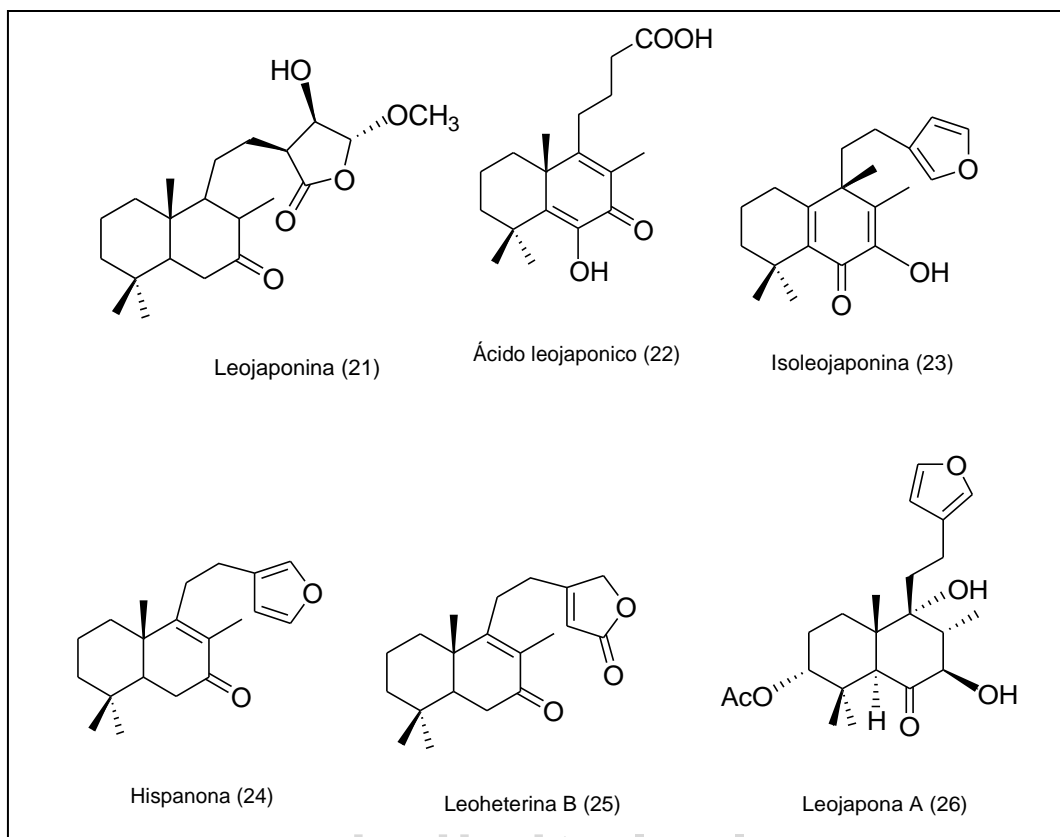


Figura 11. Estructura química de terpenoides reportados en *L. japonicus* (Miao y col., 2019)

**Ésteroides:** Once estigmasteranos y ocho ergosteranos se han aislado y caracterizado a partir de *L. japonicus*. (Tabla 2). Los ésteroides de *L. japonicus*. rara vez se usan para evaluar actividades relacionadas con los usos tradicionales de la especie; sin embargo, se ha reportado en algunos de ellos considerables actividades inhibitoras de la agregación plaquetaria inducida por ADP. Entre los ésteroides aislados e identificados en la especie, podemos encontrar el  $\beta$ -Sitosterol (27) y la Ciatisterona (28) (Figura 12) (Miao y col., 2019).

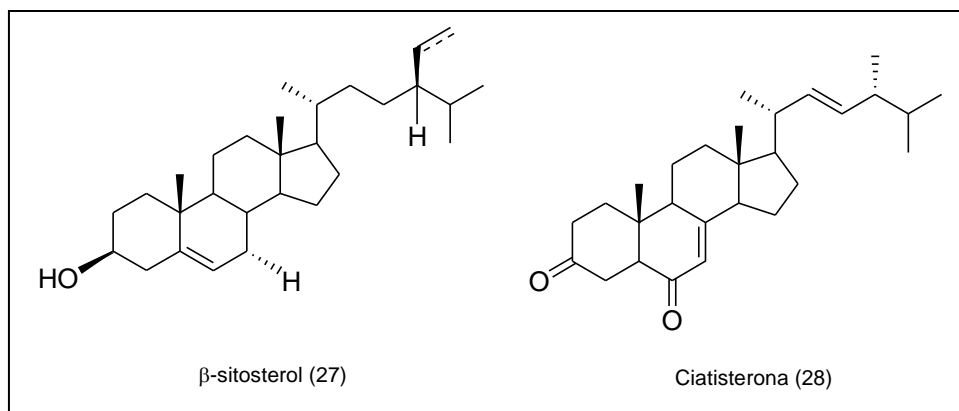


Figura 12. Estructura química de esteroides reportados en *L. japonicus* (Miao y col.,2019)

**Flavonoides:** *L. japonicus*. es rico en flavonoides; su concentración es mayor en las hojas y más baja en las raíces. Como se muestra en la Tabla 2, se han aislado y caracterizado 35 flavonoides de *L. japonicus*.; estos incluyen flavonas, flavonoles y una isoflavona. La apigenina-7-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosido (29) tiene un notable efecto inhibitorio sobre el músculo liso uterino. La luteolina (4), el kaempferol (30), la quercetina (31), la miricetina (32) y rutina (33), presentan una fuerte actividad antioxidante (Miao y col., 2019).

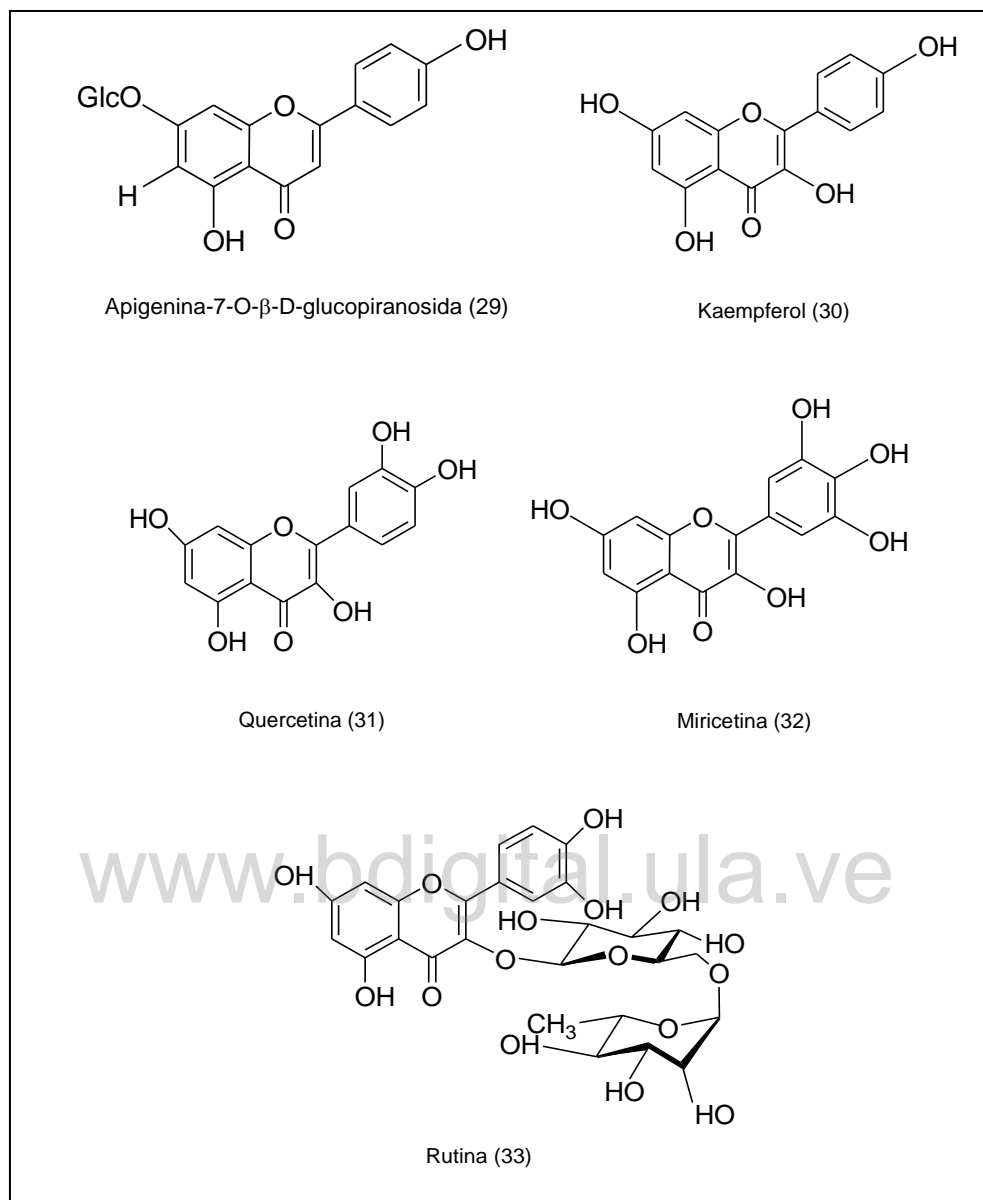


Figura 13. Estructura química de flavonoides reportados en *L. japonicus* (Miao y col., 2019)

**Fenilpropanoides:** Investigaciones químicas previas han llevado al aislamiento de 23 compuestos fenilpropanoides, destacándose las cumarinas; las cuales han presentado una actividad hepatoprotectora moderada y además evitan el aumento anormal de la agregación plaquetaria inducida por el difosfato de adenosina. Entre las cumarinas identificadas están el bergapteno (34) y el ostol (35) (Figura 14) (Miao y col., 2019).

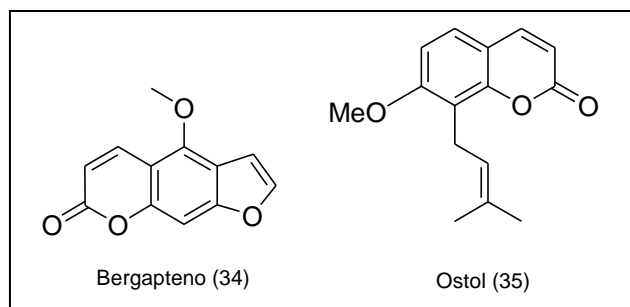


Figura 14. Estructura química de fenilpropanoides reportados en *L. japonicus* (Miao y col., 2019)

## Producto Natural

Para poder vivir, crecer y reproducirse los organismos necesitan transformar una gran variedad de compuestos orgánicos. Estas transformaciones requieren energía que la obtienen en forma de ATP y la presencia de sistemas enzimáticos. El conjunto de reacciones específicas mediante el cual un organismo fabrica sus propias sustancias y mantiene la vida se conoce como metabolismo (Gutiérrez y Estévez, 2009).

Las moléculas más importantes para la vida son las proteínas, los hidratos de carbono, las grasas y los ácidos nucleicos. A pesar de las características extremadamente diferentes de los distintos seres vivos, las rutas generales para modificar y sintetizar estas sustancias son esencialmente las mismas para todos, con muy pequeñas modificaciones. Estos procesos se conocen como metabolismo primario y los compuestos implicados en las diferentes rutas se conocen como metabolitos primarios (Gutiérrez y Estévez, 2009).

Se denomina metabolismo secundario al conjunto de procesos en el que participan compuestos con una distribución mucho más limitada y específica según el ser vivo. Los compuestos que participan en este metabolismo se denominan metabolitos secundarios y son específicos de las especies (Gutiérrez y Estévez, 2009).

Cuándo se habla de productos naturales se hace referencia a los extractos o sustancias que se obtienen de plantas, generalmente de aquellas que tienen un uso medicinal o nutricional. De manera particular, se les llama productos naturales a los metabolitos secundarios obtenidos de organismos vivos tales como bacterias, algas, hongos, animales y vegetales (Pérez, 2006).

En sentido amplio un producto natural está formado por todos los compuestos de la naturaleza. En sentido más restrictivo un producto natural sólo es un metabolito secundario (Gutiérrez y Estévez, 2009).

### Clasificación de los Metabolitos secundarios

**Alcaloides:** Son compuestos que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos, aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina, por ejemplo. Otro de los alcaloides más comunes es la cafeína (36) (Figura 15). Estos compuestos se encuentran en el 20 % aproximadamente de las plantas vasculares (Bruneton, 2001).

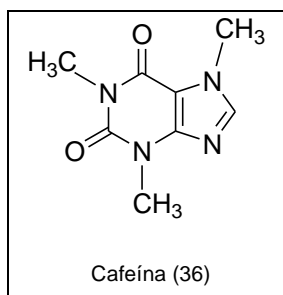


Figura 15. Estructura química de la cafeína

**Polifenoles:** Compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.) Un ejemplo de polifenoles es la catequina (37) (Figura 16) (Quiñones, Miguel y Aleixandre, 2012).

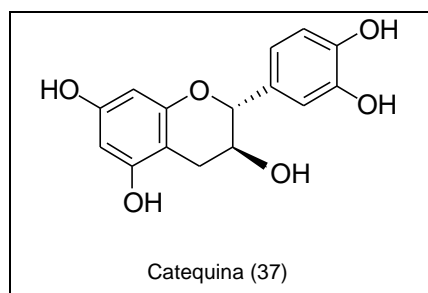


Figura 16. Estructura química de la catequina

**Flavonoides:** Estos compuestos son pigmentos casi universales en los vegetales. Casi siempre son hidrosolubles y son los responsables de la coloración de los frutos, flores y en algunos casos las hojas. Su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo las principales antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas (Bruneton, 2001). Compuestos como el kaempferol (30), tienen propiedades antiulcéricas al proteger la mucosa gástrica, y otros como la genisteína (38) (Figura 17), tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación (Graf, Milburi y Blumberg, 2005).

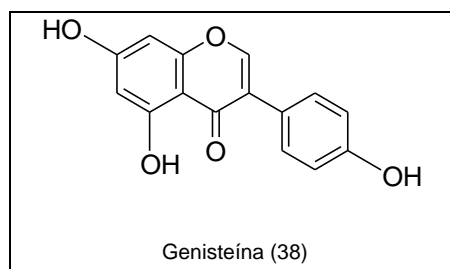


Figura 17. Estructura química de la genisteína

**Saponinas:** Las saponinas son glicósidos hidrosolubles, con propiedades tensoactivas y hemolíticas, ambas atribuidas a sus características estructurales de naturaleza anfifílica. Estos metabolitos también pueden ejercer una amplia actividad biológica y farmacológica, destacándose su efecto insecticida, anti-protozoos, antiinflamatorio, leishmanicida, anti-trichomonas, anti-agregante plaquetario, broncolítico, hipo-colésterolémico, como su actividad citotóxica frente a varias neoplasias (Valdés y col., 2015). En la Figura 18, se muestra la estructura de la digitoína (39).

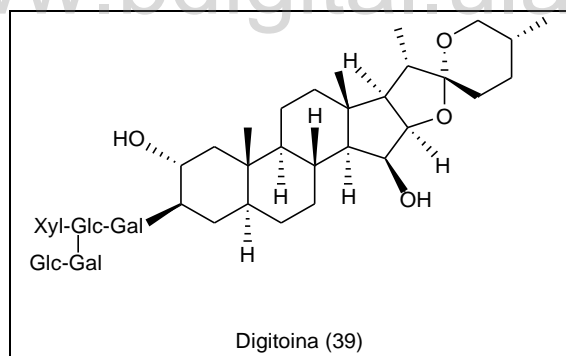


Figura 18. Estructura química de la digitoína

**Terpenos:** Los terpenos o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios. Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (5C) que contienen: los terpenos de 10C contienen dos unidades 5C y se llaman monoterpenos; los de 15C tienen tres unidades 5C y se denominan sesquiterpenos, y los de 20C

tienen cuatro unidades 5C, son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30C, los tetraterpenos tienen 40C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno (Bruneton, 2001). En la Figura 19, se muestra el  $\beta$ -caroteno (40) que es un terpenoide.

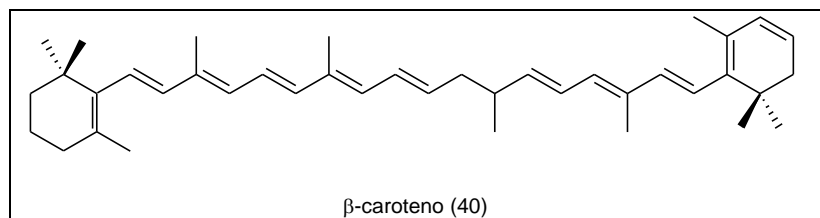


Figura 19. Estructura química del  $\beta$ -caroteno

**Taninos:** Son compuestos químicos complejos resultantes de la combinación de fenoles y azúcares, tienen masas moleculares relativamente elevadas, de sabor astringente, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, alcaloides, celulosa, gelatina), son también agentes quelantes; por esta razón se utilizan como antídoto en intoxicaciones causadas por metales pesados (mercurio, plomo, estaño, cinc), se oxidan con facilidad, sobre todo en medio ácido, y pueden actuar como reductores de ciertos compuestos. Los taninos se disuelven en agua formando disoluciones coloidales, son solubles en alcoholes y en acetona. Suelen acumularse en determinadas partes de la planta como las hojas, frutos, tallos, cortezas, semillas, raíces y en menor proporción en las flores (Toledo, 2015). En la Figura 20 se muestra la estructura del tanino condensado florotanino (41).

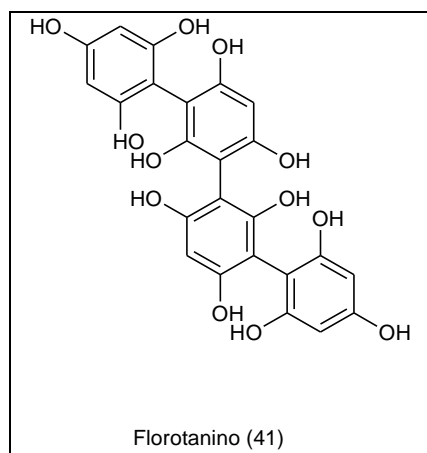


Figura 20. Estructura química del florotanino

**Cumarinas:** Son una amplia familia de lactonas, más de 1500 identificadas en más de 800 especies de plantas, que actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación. La cumarina más simple es la que se encuentra como constituyente en el aceite de bergamota, un aceite esencial que aporta aroma al tabaco de pipa, el té y otros productos. Las más tóxicas son producidas por hongos, por ejemplo, la aflatoxina producida por *Aspergillus flavus* quizá el carcinogénico más potente de las toxinas naturales (Ávalos y Pérez, 2009). En la Figura 21, se muestra la estructura de la Aflatoxina B1 (42).

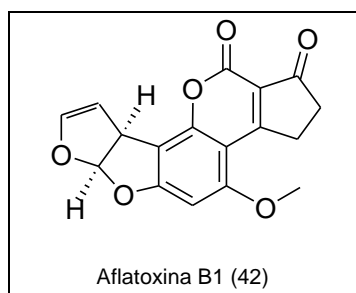


Figura 21. Estructura química de la Aflatoxina B1

**Quinonas:** Son compuestos aromáticos con dos grupos cetona, son dicetonas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles (Carrión, 2010). Las quinonas son muy abundantes en la naturaleza, en el reino vegetal se encuentran tanto en vegetales superiores como en hongos y

bacterias. Dependiendo del grado de complejidad de su estructura química pueden clasificarse en benzoquinonas, naftoquinonas o antraquinonas. Se les ha reportado actividad fungicida, propiedades laxantes; también son útiles en el tratamiento de la tos y algunas naftoquinonas pueden ser empleadas en cosmética como colorantes naturales (Villatoro, 2008). En la Figura 22 se muestran las estructuras de la 1,4-benzoquinona (43), lawsona (44) y de una antraquinona (45).

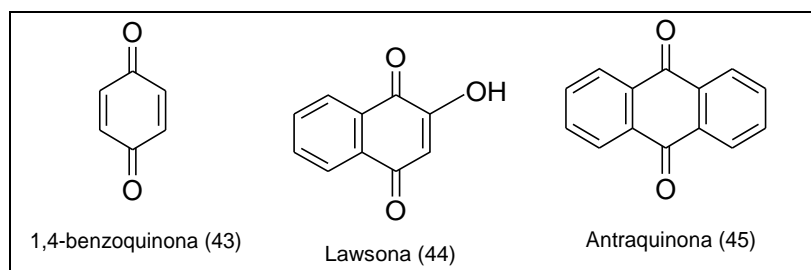


Figura 22. Estructuras químicas de algunas quinonas

## Extracto Vegetal

Es una disolución de los principios activos de una planta en un determinado disolvente. En su composición hay un mínimo de principios activos, que son los encargados de aportar propiedades biológicas a la planta (Carrión, 2010).

Para elaborarlo se puede utilizar la planta completa o las partes que tienen más concentración de principios activos. Para su obtención se usan métodos con calor o en frío (Carrión, 2010).

## Clasificación de los extractos vegetales

### Según su consistencia:

**Líquidos (extractos fluidos o tinturas):** Se encuentran en diferentes diluciones. Por ejemplo, los que encontramos más fácilmente en las herboristerías, son de dilución 1:5, o sea que una

parte de la planta seca equivale a 5 partes de disolvente, lo que es lo mismo, que 1 g del material vegetal equivale a 5 g de extracto (Carrión, 2010).

***Semisólidos (extractos blandos o densos):*** Suelen ser extractos concentrados, lo que se consigue evaporando parte del disolvente (Carrión, 2010).

***Sólidos (extractos secos):*** El disolvente ha sido completamente evaporado. Se suelen vender como capsulas que contienen el extracto en polvo. Son los más utilizados en la medicina natural, ya que contienen muchos principios activos en poco volumen (Carrión, 2010).

#### **Según el disolvente utilizado:**

***Alcohol y agua (extractos hidroalcohólicos o tinturas):*** El alcohol parece ser el disolvente más eficaz y por eso, este es el tipo de extracto más comúnmente utilizado en perfumería y en la industria farmacéutica (Carrión, 2010).

***Aceite (oleados):*** Hay principios activos que no pasaran al aceite, por lo que, en algunos casos, estos extractos son menos efectivos (Carrión, 2010).

***Glicerina y agua (extractos glicerizados):*** No pueden ingerirse. Se utilizan mucho en cosmética, ya que se evita el problema de las irritaciones por el alcohol y además, suelen ser menos oscuras que las tinturas (Carrión, 2010).

***Propilenglicol (extractos glicólicos):*** Es un alcohol, muy utilizado en la cosmética convencional. Su uso en la cosmética natural es tema de debate, aunque parece ser que no hay evidencias suficientes de su toxicidad (Carrión, 2010).

## **Técnicas de obtención de extractos vegetales**

### **Extracción por solución con disolventes orgánicos:**

Penetran en la materia vegetal y disuelven las sustancias, que son evaporadas y concentradas a baja temperatura. Después, se elimina el disolvente, obteniendo la fracción deseada. La extracción puede ser sólido-líquido o líquido-líquido en función del estado de la muestra (Palomino, 2001).

***Extracción sólido-líquido:*** Cuando se trata de una muestra sólida, se pulveriza y a continuación, se extraen los analitos mediante un disolvente en el que sean muy solubles que los diferencie de las sustancias presentes en la matriz, que han de ser muy insolubles en ese disolvente, se suele hacer con agitación, temperatura o ultrasonidos para una mayor eficacia. Normalmente se somete a centrifugación tras la extracción para eliminar los sólidos que hayan podido quedar (Palomino, 2001).

***Extracción líquido-líquido:*** Consiste en extraer los analitos de una muestra líquida mediante un disolvente inmisible en ella, como puede ser una fase acuosa con un disolvente orgánico no miscible. El pH es fundamental para conseguir buen rendimiento (Palomino, 2001).

### **Extracción por centrifugación**

Los extractos obtenidos por este proceso tienen grandes características aromáticas. Al no ser un proceso térmico, sus propiedades son más estables, por los antioxidantes naturales presentes. Aun así, la fricción interna de la materia prima provoca un aumento de temperatura no controlable que puede implicar una degradación térmica y un oscurecimiento del extracto (Palomino, 2001).

### **Extracción en fase sólida**

Se emplean columnas o cartuchos capaces de retener el analíto, que se extrae posteriormente con un pequeño volumen de disolvente (Palomino, 2001).

### **Estudio fitoquímico**

El análisis fitoquímico tiene como objetivo determinar los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal a estudiar por ejemplo en las plantas medicinales, aplicando para ello una serie de técnicas de extracción, de separación, purificación y determinación estructural (Marcano y Hasegawa, 2002).

El estudio fitoquímico, también llamado tamizaje fitoquímico, consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación, debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente en una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del tamizaje farmacológico (Palacios, 2008).

Así cuando una planta revela acción sobre el sistema nervioso central durante el tamizaje farmacológico y presencia de alcaloides en el tamizaje fitoquímico, es bastante probable que la acción farmacológica se deba a la fracción alcaloidal. De la misma manera, el hecho de evidenciarse acción anti-inflamatoria en el tamizaje farmacológico y la presencia de flavonoides en el tamizaje fitoquímico, puede dar lugar a procesos de aislamiento y sometimiento a pruebas más específicas de estos compuestos. Efectos catárticos pueden ser asociados a las antraquinonas. La presencia de glicósidos cianogénicos durante la marcha fitoquímica puede dar lugar a la decantación de la planta por su alta toxicidad (Palacios, 2008).

Sin embargo, existen etapas comunes que no necesariamente ocurren al mismo tiempo, las cuales se resumirán a continuación:

**a. Selección del material**

La selección del material depende del interés que tenga el estudio, ya sea su actividad biológica, para utilizar la planta como cierto tipo de remedio curativo o para estudiar algún compuesto químico presente en la planta (Marcano y Hasegawa, 2002).

**b. Examen químico de las muestras**

***Pruebas químicas de campo:***

*Alcaloides:* El extracto proveniente de la maceración del material con HCl diluido se precipita con reactivo de Meyer o se somete a reacciones de color con reactivo de Dragendorff o ácido yodoplatínico (Marcano y Hasegawa, 2002).

*Saponinas:* El extracto acuoso se agita. La aparición de espuma es indicio de estos compuestos (Marcano y Hasegawa, 2002).

*Taninos:* El extracto en NaOH al 10 % se trata con unas gotas de solución de gelatina al 1 %. La presencia de taninos se manifiesta con la precipitación del complejo proteína-tanino (Marcano y Hasegawa, 2002).

*Flavonoides:* El extracto alcohólico se trata con un trozo de Mg y HCl. La formación de una coloración roja es indicativa de flavonoides (Marcano y Hasegawa, 2002).

***Pruebas químicas de laboratorio (Marcano y Hasegawa, 2002):***

Las mismas pruebas preliminares de campo hay que repetirlas en el laboratorio, pero en este caso los análisis deben ser aplicados a un extracto un poco más elaborado. En esta etapa hay que considerar el objetivo del trabajo. Sin embargo, es conveniente efectuar una serie de pruebas rápidas que permitan decidir la estrategia de separación; la evaluación fitoquímica se repite entonces para los grupos principales de sustancias tanto en el vegetal fresco como en un “crudo” preparado por extracción del material vegetal molido. Este extracto crudo total, obtenido por digestión en caliente, de la muestra (100 g) en alcohol (100-200 mL) que está libre de almidón, proteínas y de la mayoría de azúcares de bajo peso molecular, se concentra y se evalúa para: Alcaloides, saponinas y ésteroles, flavonoides, taninos y polifenoles, antraquinonas, y glicósidos cianogénicos.

Hay que tomar en cuenta que las pruebas indicadas antes son de carácter general y que posiblemente algunas fallen debido a interferencias ocasionadas por la complejidad del extracto a analizar, o bien la polifuncionalidad que caracteriza a algunos metabolitos impide obtener respuestas claras para un determinado grupo.

***Determinación del contenido de Polifenoles Totales.***

Para identificar polifenoles se utilizan varios métodos, como lo son resonancia magnética nuclear, cromatografía de gases acoplada a detectores selectivos de masas, cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), cromatografía líquida acoplada a detectores UV-visible. Para cuantificar contenidos totales de polifenoles se utiliza el método Folin-Ciocalteu (Martin, 2018).

### *Método Folin-Ciocalteu*

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido de compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 760 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido de polifenoles (García y col., 2015).

El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total (García y col., 2015).

La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 760 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico. Se trata de un método preciso y sensible, que puede padecer numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción (García y col., 2015). En la Figura 23 se muestra la reacción entre el ácido gálico y el reactivo de Folin-Ciocalteu

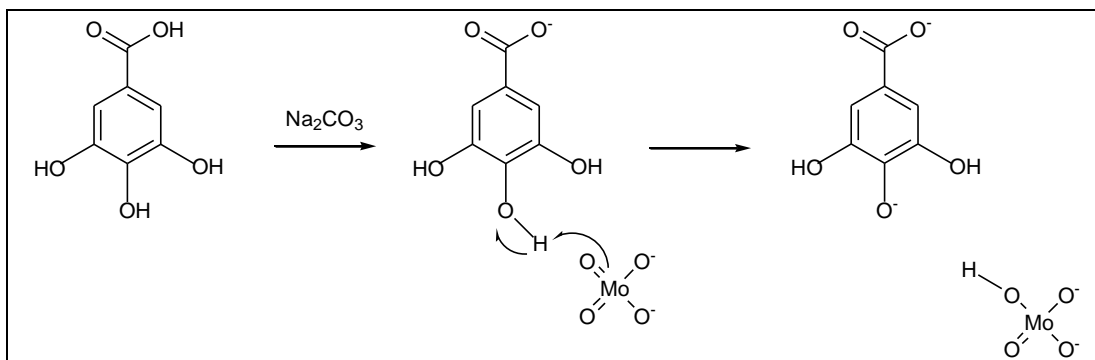


Figura 23. Reacción entre el ácido gálico y el reactivo de Folin-Ciocalteu

## Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhibiendo la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres (González, Soto, Kite y Martínez, 2007).

Los antioxidantes se dividen en dos categorías principalmente que son: sintéticos y naturales. En general los antioxidantes sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, mientras que los antioxidantes naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminos) o carotenoides, así como el ácido ascórbico (González, Soto, Kite y Martínez, 2007).

## Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado. En la medición de una muestra oxidante, pueden usarse intermediarios o productos finales para valorar la actividad antioxidante (Tovar, 2013).

La actividad antioxidante de una muestra no puede ser determinada basándose solo en un ensayo de prueba. En la práctica se realizan muchos modelos de test para evaluar la actividad antioxidante de la muestra de interés; sin embargo, es necesario considerar que los modelos presenten diferentes variaciones ya que puede dificultarse un poco la comparación de los resultados entre un método y otro (Tovar, 2013).

### **Ensayo del DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)**

Método propuesto por Blois en el año 1958, en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH para aceptar un átomo de hidrógeno proveniente de una molécula de cisteína (Tovar, 2013).

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes (Tovar, 2013).

Después de aproximadamente tres décadas, este ensayo comenzó a utilizarse rutinariamente para la caracterización de las propiedades antioxidantes. El procedimiento original para el ensayo DPPH ha sido adoptado por muchos laboratorios y a pesar de que existen modificaciones a conveniencia, una revisión detallada de la literatura ha revelado que la mayoría de los estudios

están basados en un tiempo de reacción de 20-30 min en vez de un tiempo de reacción total de 120 minutos requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox (Tovar, 2013).

Los resultados del ensayo DPPH se han presentado de diferentes maneras. La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria ( $IC_{50}$ ), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50 %. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor  $IC_{50}$  cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH• usado (Tovar, 2013).

El ensayo DPPH tiene algunas desventajas que limitan su aplicación, entre estas se encuentran (Tovar, 2013):

- La diferencia en el mecanismo de reacción que normalmente ocurre entre antioxidante y radicales peróxilo.
- DPPH es un radical del nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peróxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación lipídica. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peróxilo, reaccionan lentamente o son inertes al DPPH•. Esto se evidencia en el tiempo necesario para determinar el  $IC_{50}$  que van en un rango de 1,15 min (Ácido ascórbico) a 103 min (Rutina).
- La reacción cinética entre el DPPH• i los antioxidantes no es lineal con la concentración de DPPH•, por lo cual es arbitrario medir la capacidad antioxidante usando IC

- La reacción de DPPH• con eugenol fue reversible, lo que podría resultar en falsas lecturas (bajas) para la capacidad antioxidante de muestras que contengan eugenol y otros fenoles que guarden un tipo de estructura similar.

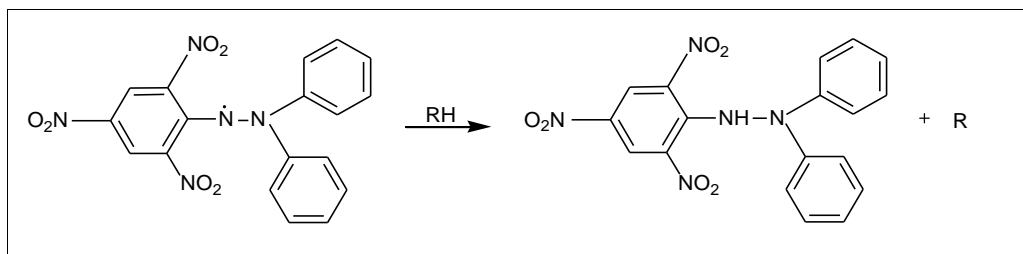


Figura 24. Estructuras del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante

### *Artemia salina*

Conocida también como “camarón de salmuera”, es el crustáceo braquiópodo de mayor distribución mundial, por ser cosmopolita (Yockteng, 2017). Desde los años 30 su uso en la acuicultura se ha incrementado considerablemente, siendo en la actualidad, el mejor y en algunos casos el único alimento vivo para los primeros estados larvarios de muchas especies de peces y crustáceos (Martín, 2014).

Se calcula que la demanda anual mundial de quistes de *A. salina*. es de unas 2.000 toneladas, de las cuales el 5 % es utilizada en acuariofilia. Su distribución se extiende a todos los continentes, excepto en la Antártida, se encuentran en más de 300 lagos de alta salinidad donde sus predadores no pueden sobrevivir, llegando a encontrarse en aguas con una concentración de hasta 300 g de sal por litro de agua, pero su facilidad de adaptación hace que también pueda encontrarse en agua dulce (Martín, 2014).

Pueden sobrevivir en agua con un gran déficit de oxígeno, llegando a soportar 0,5 mg de oxígeno por litro en su fase adulta (Martín, 2014).

## Clasificación taxonómica

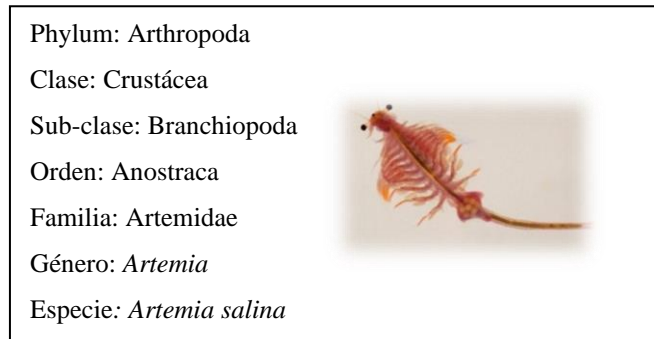


Figura 25. Taxonomía de la *A. salina* (Yockteng, 2017).

## Características morfológicas de la *Artemia salina*

Los adultos de *A. salina*. llegan a alcanzar un tamaño de 10 mm de longitud en poblaciones bisexuales y 20 mm en poblaciones partenogenéticas. La *A. salina*. tiene un marcado dimorfismo sexual; las hembras desarrollan el saco de puesta o útero, que se encuentra al final de los toracópodos, y los machos desarrollan las antenas que se transforman en pinzas bastante grandes que ayudarán en el momento del apareamiento. Las antenas en las hembras pasan a ser órganos sensoriales (Martín, 2014).

## Ciclo vital

### *Nauplio 1:*

Larva recién nacida, se caracteriza por la ausencia de segmentos en el cuerpo y por presentar gran cantidad de reservas vitelinas, su sistema digestivo lo tienen en formación (no se alimentan del exterior). Sus reservas nutricionales, su pequeño tamaño y su forma de obtención (eclosión de quistes), lo hace un alimento vivo insustituible en la acuicultura. El Nauplio es de color anaranjado, presenta en la base de la cabeza un ocelo central (ojo Nauplio). Este estadio mide aproximadamente entre 125 a 250 micras según la sepa (procedencia), y dura entre 6 a 10 horas a

25 grados centígrados, para luego pasar al sub-estadio de Nauplio 2 donde se hace notorio la formación de su sistema digestivo. Este estadio a su vez dura entre 15 a 20 horas (Yockteng, 2017).

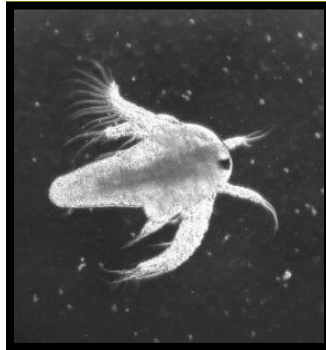


Figura 26. Nauplio de *A. salina* (Yockteng, 2017)

### ***Metanauplio:***

Es el periodo más largo de la fase larval, en el que desarrolla los toracópodos, lo que permite diferenciarlos de la fase anterior, además del tamaño que alcanzan (150 a 400 micras (Yockteng, 2017).

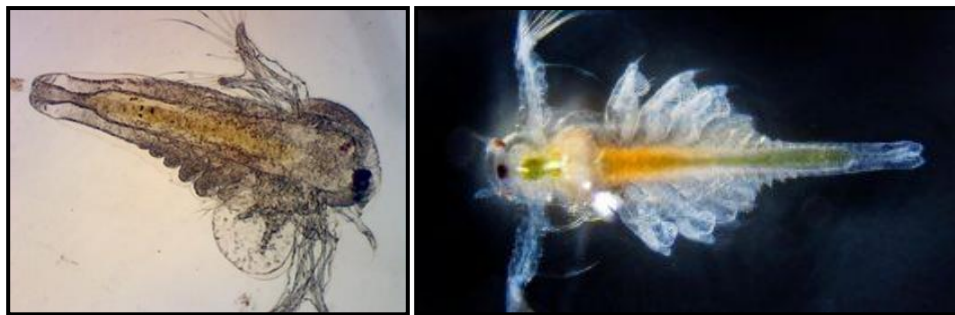


Figura 27. Metanauplio de *A. salina* (Yockteng, 2017)

### ***Pre adulto:***

Estadio en el que se manifiesta el dimorfismo sexual, especialmente por la forma que adoptan las antenas. En los machos, como ya se describió, adoptan la forma de tenazas y en la hembra la forma de hoja bastante pequeña (Yockteng, 2017).

### ***Adulto:***

Su cuerpo está dividido en tres partes diferenciadas: cabeza-tórax-abdomen, en este estadio, se observa un claro dimorfismo sexual, donde los animales alcanzan su madurez sexual, lo cual es fácilmente advertido con el comportamiento pre-copulativo, en el que el macho se adhiere (abraza) a la hembra fuertemente, nadando juntos (pegados). La hembra presenta en la región abdominal al lado del tubo digestivo, unas “bolsitas” donde desarrollan los huevos. Una hembra adulta es capaz de producir más de 300 quistes/nauplios cada cinco días, durante seis meses. En la práctica esta producción está condicionada a variables como: nutrientes y condiciones físico-químicas. La cantidad de quistes (cists) por gramo varía según la sepa de *A. salina.*, la que sacan de una lata importada (Utah-USA) es de aproximadamente 200.000 quistes por gramo, la sepa de Virrilá (Perú) así como la de Salinas (Ecuador), llegan a más de 300.000 quistes por gramo (Yockteng, 2017).

Los Nauplios pueden llegar a adultos en menos de tres semanas en ambientes naturales (entre 14 a 25 días), según las variables del ambiente (temperatura y alimento disponible), pero bajo condiciones de laboratorio y cultivos intensivos, logramos obtener adultos en menos de 12 días (Yockteng, 2017).



Figura 28. Adulto de *A. salina* (Yockteng, 2017)

## **Bioensayo de determinación de toxicidad para *Artemia salina* de compuestos presentes en productos naturales**

### **Alcance y campo de aplicación**

Esta variante fue desarrollada por Meyer y col. (1982) y ha sido mejorada desde entonces por diferentes investigadores como McLaughlin y col. (1982). El ensayo permite la evaluación rápida y conveniente de extractos crudos, fracciones y compuestos puros. También puede ser utilizado para establecer la actividad biológica de compuestos sintéticos (Pino y Lazo, 2010).

### **Principio**

Se basa en la determinación de la mortalidad in vivo de un organismo zoológico simple, las larvas de *A. salina*. En 24 horas a dosis iguales o menores de 1000 mg. mL<sup>-1</sup> (Pino y Lazo, 2010).

## Operacionalización de las Variables

Tabla 3.  
*Operacionalización de las Variables*

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Composición química	Independiente	El tamizaje fitoquímico permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés (Palacios, 2008).	A través de tamizaje fitoquímico	Presencia de alcaloides, fenoles, flavonoides, saponinas, terpenos y ésteroles, taninos, entre otros...	Reacciones de coloración o precipitación, y fluorescencia.

Continuación Tabla 3.  
Operacionalización de las Variables

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Contenido de Polifenoles	Dependiente	Compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos (Quiñones y col., 2012)	A través de reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Tungstofosfato y molibdofosfato).	Presencia de compuestos polifenólicos., evidenciándose con una coloración azul. Por reducción del reactivo Folin	Contenido de polifenoles en µg/mg de extracto, que se consigue al interpolar los valores de absorbancia en la curva de calibración del ácido gálico para hallar la concentración.

www.bdigital.ula.ve

Continuación Tabla 3.  
Operacionalización de las Variables

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Actividad antioxidante	Dependiente	Es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres (Londoño, 2011).	Mediante el método del DPPH	Presencia de compuestos con actividad antioxidante: fenoles, flavonoides, taninos, entre otros.	Porcentaje (%) de inhibición. IC <sub>50</sub>
Toxicidad en <i>Artemia salina</i>	Dependiente	Capacidad inherente de una sustancia química de producir efectos adversos en los organismos vivos, ya sea de tipo funcional, lesiones patológicas que afectan el funcionamiento del organismo y reducen su capacidad de respuesta a factores de riesgo o estrés (Curtis, 2008).	Mediante exposición de los nauplios de <i>A. salina</i> a los extractos naturales, para determinar valores de dosis letal 50 (DL <sub>50</sub> ).	Extremadamente tóxico Altamente tóxico Moderadamente tóxico Ligeramente tóxico Prácticamente no tóxico Relativamente inocuo	Porcentaje (%) de letalidad Valores de DL <sub>50</sub> .

## **Sistema de Hipótesis**

### **Hipótesis afirmativa**

Numerosas investigaciones han permitido ampliar los conocimientos sobre las plantas pertenecientes al género *Leonurus*, siendo la especie *Leonurus japonicus* una de las que ha reportado mayores propiedades farmacológicas, por ello, es posible que, basándose en su composición química, los extractos de las partes aéreas de *L. japonicus*., presenten un alto contenido de polifenoles, buena actividad antioxidante, y sean muy poco tóxicos sobre los nauplios de *Artemia salina*.

### **Hipótesis nula**

Numerosas investigaciones han permitido ampliar los conocimientos sobre las plantas pertenecientes al género *Leonurus*, siendo la especie *Leonurus japonicus* una de las que ha reportado mayores propiedades farmacológicas; por ello, es posible que, basándose en su composición química, los extractos de las partes aéreas de *L. japonicus*., no presenten un alto contenido de polifenoles, no tengan buena actividad antioxidante, y sean muy tóxicos sobre los nauplios de *Artemia salina*.

## CAPITULO III

### MARCO METODOLOGICO

#### Tipo de Investigación

Es importante hacer énfasis en que tipo de investigación se fundamentó el presente trabajo para poder determinar si el mismo aportó elementos que permitieran desarrollar el tipo de problema que se desea resolver, los objetivos que se pretenden lograr y también conocer la disponibilidad de recursos con los cuales cuenta el investigador para llevar a cabo su trabajo, por tanto, el tipo de investigación está relacionada con la complejidad (profundidad) del estudio, la cual es marcada por el verbo que enuncia el objetivo general. Existen varios tipos de investigación como la exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa (Hurtado, 2010).

Ahora bien, la presente investigación es de carácter confirmatoria ya que la misma tiene como propósito verificar la hipótesis derivada de las teorías, es decir, buscamos confirmar la relación que existe entre la composición química y la actividad biológica de los extractos de las partes aéreas de *Leonurus japonicus*.

#### Diseño de la Investigación

En cuanto al diseño de la investigación, autores como Balestrini (2002) lo definen como:

“El plan global de investigación que integra de un modo coherente y adecuadamente correcto técnicas de recolección de datos a utilizar, análisis previstos en función de los objetivos, el diseño de una investigación intenta dar de manera clara y no ambigua respuestas a las preguntas planteadas en la misma”.

La aseveración de este autor, permite inferir que el diseño de investigación es el que orienta la selección de las formas y maneras en que se pudo recoger la información y el tipo de análisis que se le dio a la misma; según Arias (2012), en atención al diseño, la investigación se clasifica en documental, de campo y experimental.

La presente investigación se considera experimental, ya que la especie vegetal se sometió a determinadas condiciones, estímulos o tratamiento, para observar los efectos o reacciones que se producen.

### **Población y Muestra**

La población a estudiar estuvo constituida por plantas de la especie *Leonurus japonicus*, pertenecientes a la familia Lamiaceae, y la muestra fueron las partes aéreas (hojas, tallos y flores) de dicha planta, que se recolectaron en el sector Portachuelo, vía Jají, en el estado Mérida-Venezuela.

### **Sistema de Variables**

Las variables de una investigación son características presentes en la unidad de investigación. Específicamente, se considera en algunos casos tres categorías: Dependiente, Independiente e Interviniente. En este estudio se considera el siguiente sistema de variables:

#### **Variable Dependiente:**

- Contenido de polifenoles en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Leonurus japonicus*.
- Actividad antioxidante.
- Toxicidad sobre *Artemia salina*

### **Variable Independiente:**

- Composición química de los extractos obtenidos de las partes aéreas de *Leonurus japonicus*.

### **Instrumento de Recolección de Datos**

Los datos recolectados en el análisis fitoquímico preliminar fueron reflejados en tablas; mientras que los obtenidos en el análisis antioxidante y en el ensayo de ecotoxicidad (Toxicidad sobre *A. salina*) fueron reflejados mediante tablas y gráficas.

### **Procedimientos y Metodología**

#### **Recolección del material vegetal e identificación botánica de la especie**

El material vegetal fue recolectado en el sector Portachuelo, vía Jají, Venezuela en el estado Mérida, Municipio Campo Elías, Parroquia Montalbán, con una altitud aproximadamente de 1781 msnm.

La identificación de la especie se realizó mediante su diferenciación taxonómica, la hierba es de 0,5 a 1,5 m de alto, tallos tetragonos glabros ligeramente tomentosos, con flores moradas dispuestos en verticilos con presencia de brácteas. Tomando en cuenta su estado al momento de la recolección, esta fue realizada por el Ing. Juan Carmona del Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis ULA. Se depositó un ejemplar en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y se se realizó un voucher, que se clasificó con el número tres (03) (Figura 29).

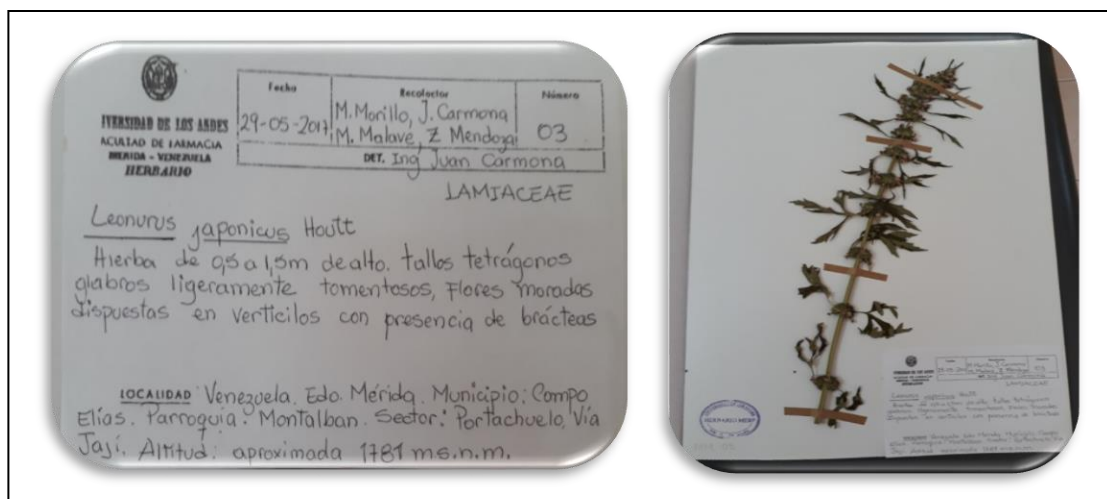


Figura 29. Ejemplar de la especie con su respectivo voucher depositado en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis

### Obtención del Extracto Vegetal

Se partió de aproximadamente 1 Kg de las partes aéreas (hojas, tallos y flores) de la planta, fueron secadas en una estufa a 45 °C durante 48 horas y se procedió a molerlas y pesarlas.

Aproximadamente 200 g del material vegetal molido y seco de las partes aéreas de *L. japonicus*, se colocó en un erlenmeyer y se le adicionó aproximadamente 200 mL de disolvente orgánico hexano para luego dejarlo macerando durante dos días (48 horas), cumpliendo este tiempo se procedió a filtrar, luego de filtrada la muestra, se evaporó el solvente en un rotavapor para obtener el extracto, este procedimiento se repitió por lo menos tres veces. El extracto obtenido se guardó en un recipiente seco y previamente tarado (Figura 30). El mismo procedimiento de macerado, filtrado y evaporación de solvente, se repitió con los disolventes diclorometano y etanol, para finalmente lograr la obtención de tres extractos.



Figura 30. Proceso de obtención del extracto de las partes aéreas de *L. japonicus*

Los extractos fueron pesados y de cada uno de ellos se obtuvo la siguiente cantidad en gramos y su respectivo rendimiento.

Tabla 4.  
*Cantidad obtenida de cada extracto con su respectivo rendimiento*

Extracto	Cantidad (g)	Rendimiento en %
Hexanoico	1,8	0,9
Diclorometanoico	2,11	1,06
Etanólico	2,45	1,23

## **Pruebas químicas para la identificación de los metabolitos secundarios presentes en los diferentes extractos (Tamizaje fitoquímico).**

La determinación de la composición química de los extractos de las partes aéreas de *L. japonicus*, se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo la supervisión de la profesora Marielba Morillo. Se realizaron una serie de pruebas específicas para determinar cualitativamente los compuestos químicos presentes en los extractos obtenidos.

### **Alcaloides**

#### ***Ensayo de Dragendorff, Wagner y Mayer***

Se toman 100 mg del extracto etanólico y se le agregan de 5 a 10 mL de HCl al 10 %; se calienta en baño de maría hasta ebullición, por 30 minutos. Seguidamente se filtra y el filtrado se coloca en tres tubos de ensayo a los cuales se le adicionan varias gotas de los reactivos Dragendorff, Wagner y Mayer a cada tubo. La aparición de un precipitado o turbidez, indicara la positividad de la prueba.

### **Fenoles**

#### ***Prueba con $FeCl_3$***

Se añade 1 mL de solución alcohólica de los extractos (diclorometanoico y etanólico) y luego se agrega una gota de solución acuosa de cloruro férrico al 10 %, por las paredes del tubo. La formación de color azul o verde indicó la presencia de fenoles.

## **Flavonoides**

### ***Ensayo de Shinoda***

Se disuelven los extractos en etanol, se le añade 2 gotas de HCl concentrado, si se forma una coloración roja la prueba es positiva para auronas y chalconas, luego colocar algunas virutas de magnesio metálico; si se forma un color naranja o rojo indica la presencia de flavonas y si es color magenta es positiva para flavonones.

## **Saponinas**

### ***Ensayo de la espuma***

Se coloca en un tubo una pequeña cantidad de cada uno de los extractos, se le añade 1 mL de agua y se agita vigorosamente durante un minuto. Si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de espesor o altura y esta se mantiene por más de cinco minutos indica la positividad de la prueba.

## **Terpenos y/o esteroides**

### ***Ensayo de Lieberman-Burchard***

Se disuelven los tres extractos en 0,5 mL de diclorometano anhidro, en un tubo para cada extracto. Se añade 0,5 mL de anhídrido acético a cada tubo. Luego se le adiciona cuidadosamente por las paredes del tubo una gota de ácido sulfúrico concentrado. Se considera positiva la prueba cuando aparece un color rojo (terpenos); verde o azul (esteroides).

## **Taninos**

### ***Prueba de la gelatina***

Se toma una muestra seca del extracto etanólico y se disuelve en agua; por otra parte, se prepara una solución al 10 % de gelatina, y se coloca en un tubo, añadiéndose el extracto vegetal etanólico disuelto en agua. En el caso de los taninos, al formarse turbidez o un precipitado (se rompe la gelatina), indica que se desnaturalizó la proteína y la prueba es positiva.

## **Cumarinas**

Se disuelve el extracto vegetal en su propio solvente, adicionar 2 gotas de hidróxido de amonio concentrado. Se considera positiva la prueba si se presenta una fluorescencia azul o violeta bajo la luz ultravioleta.

## **Quinonas**

Se le adicionan gotas de hidróxido de amonio concentrado, a los extractos disueltos en su respectivo solvente. Se considera positiva la prueba para antraquinonas al observarse una coloración roja que aparece en los 2 primeros minutos.

### **Cuantificación de fenoles totales, en el extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*.**

La determinación de los polifenoles totales se llevó a cabo en el Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos y el Instituto de Investigaciones de La Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo la supervisión de las profesoras María Eugenia Rondón y Marielba Morillo.

## Preparación de los reactivos

- Solución de ácido gálico: En un matraz aforado, 50 mg de ácido gálico se disuelven en 100 mL de etanol (o acetona: agua 1:1 v/v). la solución debe conservarse en refrigeración.
- Solución de carbonato de sodio 0,7 M: Se disuelven 74,19 g de carbonato de sodio en 800 mL de agua desmineralizada y se lleva a ebullición: dejar enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente y completar hasta 1 L con agua.

## Curva de calibración del ácido gálico

Preparar una solución inicial del patrón (ácido gálico) a 50 mg/L. Se diluye 10 mL de la solución madre del ácido gálico a 100 mL con etanol (o acetona: agua 1:1 v/v).

En la Tabla 5, se muestran las diferentes concentraciones de ácido gálico, con la que se construyó la curva de calibración, y las diferentes proporciones en mL de los diferentes componentes de la reacción de Folin-Ciocalteu.

Tabla 5.  
*Diluciones empleadas para realizar la curva patrón con ácido gálico*

Componentes de la Reacción	Concentración en mg/L							
	0	5	10	20	25	30	40	50
Solución de patrón ácido gálico	0	0,1	0,2	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
Etanol (acetona/agua 1:1) (mL)	1	0,9	0,8	0,6	0,5	0,4	0,2	0
Reactivo Folin Ciocalteu (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2
Reactivo carbonato-tartrato (mL)	8	8	8	8	8	8	8	8

**Procedimiento:**

Mezclar bien los tubos, utilizando un agitador vortex, colocarlos en la oscuridad, esperar 30 minutos para que se desarrolle el color azul y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a 760 nm. Trazar la curva de calibrada concentración/absorbancia (Ainsworth y Gillespie, 2007).

**Análisis de los extractos:** tomar 1 mL de la muestra filtrada y añadir 0,5 mL del reactivo folin ciocalteu y a los dos minutos 2 mL de solución de carbonato de sodio, esperar 30 minutos para que se desarrolle el color. Efectuar la lectura en el espectrofotómetro a 760 nm y extrapolar los valores de absorbancia en la curva de calibrado para obtener los valores de concentración de compuestos fenólicos en el extracto (Ainsworth y Gillespie, 2007).

**Contenido de compuestos fenólicos:**

La determinación de fenoles totales en el extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*, es considerado un valor arbitrario, ya que se relaciona la absorbancia de la muestra con la absorbancia del fenol estándar a través de sus respectivas curvas de calibración, se determina de acuerdo a la ecuación obtenida a partir de la curva de calibración del ácido gálico ( $y = ax + b$ ). Las cantidades reportadas, se expresarán como  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico por mg de extracto (Ainsworth y Gillespie, 2007).

**Estudio Estadístico.**

Los datos fueron estudiados estadísticamente utilizando el programa IBM SPSS Statistic editor de datos, versión 21.

## **Evaluación de actividad biológica**

### **Determinación de actividad antioxidante**

La determinación de la actividad antioxidante, se llevó a cabo en el Departamento de Ciencias de Los Alimentos, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA, bajo la supervisión de los profesores Marielba Morillo y Tomas Visbal.

### **Ensayo de DPPH**

1. Inicialmente, se realizó un barrido, con el fin de determinar si los tres extractos a estudiar presentaban actividad antioxidante. Se pesaron en una balanza analítica marca Adventurer TM, 4mg de cada uno de los extractos en un tubo de eppendorf, para luego añadirle 1mL de metanol y mezclarlo en un agitador vortex.
2. Se utilizaron tres tubos de ensayo para cada extracto, a los cuales se le colocaron, 700 $\mu$ L de reactivo DPPH y 300 $\mu$ L de la dilución preparada anteriormente; estos se dejaron en reposo durante 30 minutos en oscuridad, debido a que el reactivo DPPH es fotosensible.
3. Transcurridos los 30 minutos, se procedió a medir la absorbancia en el espectrofotómetro Genesis 10 Bio Thermo Electron Corporation a una longitud de onda de 517nm.
4. Se determinó el porcentaje de inhibición para cada extracto, para saber cuál era el potencial antioxidante de cada uno, y así determinar que extracto presentaba actividad antioxidante.
5. Posteriormente al extracto que resulto en un % de inhibición superior a 50 %, se le procedió a determinar la actividad antioxidante a través del método DPPH, para tal fin se preparó una solución madre de concentración 1 mg/mL y a partir de la misma se

prepararon varias diluciones (25, 50, 100, 150, 250 y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Al igual que en el paso número 2, se utilizaron tres tubos para cada una de las diluciones realizadas.

En la Tabla 6, se muestra la proporción de solución madre del extracto ( $\mu\text{L}$ ) a una concentración de 1  $\text{mg}/\text{mL}$  y metanol ( $\mu\text{L}$ ), para obtener las diferentes diluciones.

Tabla 6.

*Diluciones empleadas para determinar la actividad antioxidante del extracto*

Concentración $\mu\text{g}/\text{mL}$	Diluciones					
	500	250	150	100	50	25
Solución madre 1 $\text{mg}/\text{mL}$	500 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
Metanol	500 $\mu\text{L}$	750 $\mu\text{L}$	850 $\mu\text{L}$	900 $\mu\text{L}$	950 $\mu\text{L}$	975 $\mu\text{L}$

6. Finalmente, se realizó una curva patrón con ácido ascórbico a diferentes diluciones, partiendo de una solución madre con una concentración de 1 $\text{mM}$  (0,176  $\text{mg}$  en 100 $\text{mL}$  de metanol).

En la Tabla 7, se muestra la proporción de solución madre de ácido ascórbico ( $\mu\text{L}$ ) a una concentración de 176  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y metanol ( $\mu\text{L}$ ), para obtener las diferentes diluciones.

Tabla 7.

*Diluciones empleadas para realizar la curva patrón de ácido ascórbico*

	Concentración $\mu\text{g}/\text{mL}$			
	100	75	50	25
Madre (176 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	568,2 $\mu\text{L}$	426,1 $\mu\text{L}$	284,1 $\mu\text{L}$	142,1 $\mu\text{L}$
Metanol	431,8 $\mu\text{L}$	573,9 $\mu\text{L}$	715,9 $\mu\text{L}$	857,9 $\mu\text{L}$

En la Figura 31, se muestra el procedimiento para determinar la actividad antioxidante con el reactivo DPPH.



Figura 31. Determinación de actividad antioxidante por medio del ensayo de DPPH

### **Estudio Estadístico.**

Los datos fueron estudiados estadísticamente utilizando el programa IBM SPSS Statistic editor de datos, versión 21.

### **Evaluación de toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina***

El bioensayo de toxicidad sobre nauplio (larvas) de *A. Salina*. de los extractos de las partes aéreas de *Leonurus japonicus* se realizó en el Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo la supervisión de la tutora Prof. Marielba Morillo y del profesor Tomas Visbal. Este método estándar se basó en la determinación de la concentración o dosis que causa la muerte al 50 % de una población de larvas de *A. salina*. en 24 horas, esta dosis es conocida como dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>).

a. Reactivos

Los reactivos utilizados para evaluar la toxicidad de los extractos frente a *A. salina.*, fueron: Cloruro de Sodio (NaCl), Sulfato de Magnesio hexahidratado ( $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ ), Cloruro de Magnesio hexahidratado ( $MgCl \cdot 6H_2O$ ), Cloruro de Potasio (KCl), Bicarbonato de Sodio ( $NaHCO_3$ ), Carbonato de Sodio ( $Na_2CO_3$ ), Cloruro de Calcio ( $CaCl_2$ ) y Dodecil Sulfato de Sodio [ $CH_3(CH_2)_{10}CH_2OSO_3Na$ ] conocido también como Lauril sulfato sódico obtenido de Merck® (Germany), Levadura comercial, Quistes del crustáceo *Artemia salina* (yourfishstuff ifsr®-USA). Todos los químicos usados incluyendo los solventes, fueron de grado analítico.

b. Ensayo de toxicidad general (Figura 32)

En el desarrollo del bioensayo, primero se preparó una solución marina (agua de mar artificial), que proporcione las condiciones necesarias para el desarrollo de los nauplios de *A. salina.* Esta solución se mantuvo en aireación (burbujeo) 72 h, previas al bioensayo, con la finalidad de oxigenar la misma. La composición de la solución marina se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8.

*Componentes del agua de mar artificial, usada en el cultivo y eclosión de los quistes de A. salina*

Sales	g/L
Cloruro de sodio (NaCl)	27,65
Sulfato de Magnesio hexahidratado ( $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ )	14,29
Cloruro de Magnesio hexahidratado ( $MgCl \cdot 6H_2O$ )	5,18
Cloruro de Potasio (KCl)	0,697
Bicarbonato de sodio ( $NaHCO_3$ )	0,143
Carbonato de Sodio ( $Na_2CO_3$ )	0,035
Cloruro de calcio ( $CaCl_2$ )	1,54
Agua destilada estéril	1000mL

c. Eclosión de los quistes (Figura 32)

Una vez transcurrido el tiempo de aireación de la solución marina, se dividió la solución en dos recipientes (Erlenmeyer) con 500 mL. Aproximadamente, en cada uno; en uno se añadió entre 120-200 mg de quistes, manteniendo una temperatura constante de  $28 \pm 2$  °C por 48 h (tiempo necesario para su eclosión). La solución marina contenida en el otro Erlenmeyer, se utilizó como diluyente para los extractos y llenado de las placas (ambos recipientes se mantuvieron con aireación constante).

d. Realización de la prueba (Figura 32)

- El bioensayo se realizó en placas de microtitulación de 96 pozos; a cada pozo se le adicionaron 130  $\mu$ L de solución salina (aireada), para luego colocar en cada pozo aproximadamente quince (15) larvas con ayuda de una micropipeta. Para facilitar la pesca de los nauplios, se iluminó un sector del envase que contenían las mismas, hasta concentrar las larvas en esa zona y facilitar su recolección (aprovechando su fototropismo). El volumen agregado de solución marina con larvas, fue de 10  $\mu$ L. Posteriormente a cada pozo se le adiciono 10  $\mu$ L de levadura comercial (5mg/mL). Estas placas fueron incubadas en un área con iluminación permanentemente por 24 horas, para excitar su actividad metabólica. Transcurrido al tiempo de incubación, se colocaron 50  $\mu$ L de cada extracto a evaluar, a distintas concentraciones (5, 25, 250, 750, 1250 y 2500 ppm).
- Los extractos se diluyeron en DMSO y solución marina (1:9). 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 [CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>Na] (DSS), con seis replicas para cada grupo.

- Durante el bioensayo se registraron el número de nauplios puesto inicialmente en cada pozo (NV), y al cabo de 24 h. de contacto con los extractos ensayados se realizó el conteo del número de nauplios muertos (NM) para determinar la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) con un intervalo por Finney. Además, se calculó el porcentaje de letalidad mediante la ecuación.

$$\% \text{ letalidad} = \frac{\text{NM}}{\text{NV}} \times 100$$

Finalmente, la DL<sub>50</sub> de los extractos y de los blancos evaluados se clasificó según la toxicidad, tomando con referencia las recomendaciones del Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) (Tabla 9). El análisis Probit, se calculó utilizando el software SPSS 15.0 para Windows.

Tabla 9.  
*Clasificación de toxicidad según el CYTED*

Concentración DL <sub>50</sub> (µg/mL)	Categoría
1-10	Extremadamente tóxico
10-100	Altamente tóxico
100-500	Moderadamente tóxico
500-1000	Ligeramente tóxico
1000-1500	Prácticamente no tóxico
>1500	Relativamente inocuo

En la Figura 32. Se muestra el Flujograma para determinar la toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*.

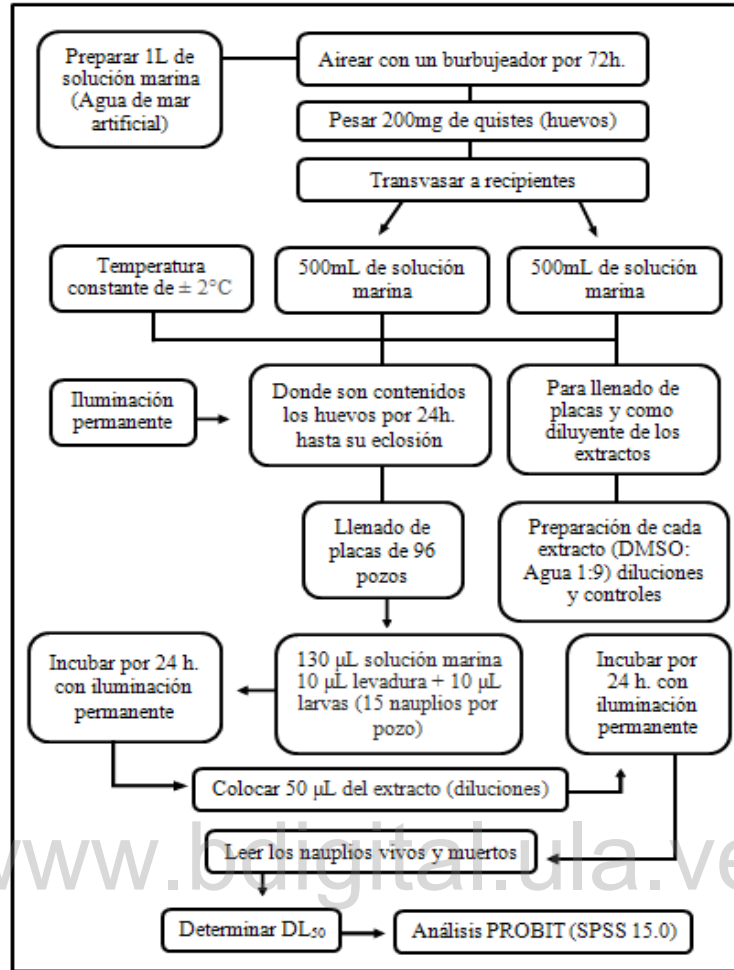


Figura 32. Flujograma para determinar la toxicidad sobre nauplios de *A. salina*

En la Figura 33. Se muestra el procedimiento del ensayo de toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*.



Figura 33. Ensayo de ecotoxicidad en nauplios de *A. salina*

### Estudio Estadístico.

Los datos fueron estudiados estadísticamente utilizando el programa IBM SPSS Statistic editor de datos, versión 21, a través de análisis de regresión PROBIT.

### Diseño de Análisis

En un proceso de investigación existen dos tipos de enfoques: cualitativo y cuantitativo (Hurtado, 2010). La metodología cuantitativa se basa en métodos de recolección de datos con medición numérica, análisis matemático y la metodología cualitativa se basa en la calidad de analizar datos subjetivos (artículo u objeto). Por lo tanto, esta investigación tuvo un enfoque cualitativo ya que permitió demostrar la composición química de las partes aéreas de *L. japonicus*. a través de pruebas químicas específicas, y tiene un enfoque cuantitativo ya que los

resultados obtenidos del análisis fitoquímico de *Leonurus japonicus* permitieron comprobar la actividad antioxidante, contenido de polifenoles y toxicidad en *Artemia salina* de los extractos de las partes aéreas de *L. japonicus.*, cuyos resultados se presentarán en tablas y figuras.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### Estudio fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de *Leonurus japonicus*.

Se realizaron una serie de pruebas para determinar cualitativamente los compuestos químicos presentes en los extractos hexanoico, diclorometanoico y etanólico de las partes aéreas (hojas, tallos y flores) de *L. japonicus*. (Tabla 10).

El análisis fitoquímico preliminar reveló la presencia de varios metabolitos secundarios de interés biológico; detectándose en los extractos hexanoico y diclorometanoico la presencia de esteroides y en el extracto etanólico, se detectó la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides y esteroides (Figura 34)

Tabla 10.

Estudio fitoquímico de los extractos obtenidos a partir de las partes aéreas de *L. japonicus*

METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA	EXTRACTO		
		Hexano	Diclorometano	Etanol
Alcaloides	Dragendorff			+++
	Wagner	ND	ND	+++
	Mayer			+++
Taninos y Compuestos Fenólicos	FeCl <sub>3</sub>	ND	-	+++
Flavonoides	Shinoda	ND	-	+++
Saponinas	Espuma	-	-	-
Terpenos	Lieberman	-	-	-
Esteroides	Lieberman	+++	+++	+++
Taninos	Gelatina	ND	ND	-
Cumarinas	LUV	-	-	-
Quinonas	Hidróxido de amonio	-	-	-

- Ausente, +++ Abundante, ND: No determinado



Figura 34. Estudio fitoquímico de los extractos obtenidos a partir de las partes aéreas de *L. japonicus*

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 (Tabla 2). Estos constituyentes químicos son principalmente monoterpenoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, triterpenoides, esteroides, alcaloides, flavonoides y fenilpropanoides (Miao y col., 2019). 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 en el extracto etanólico, alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides y esteroides.

La presente investigación difiere además de la realizada por Melo (2006) quien al analizar las hojas y tallos de *L. japonicus*, únicamente indicó la presencia de flavonoides, saponinas y taninos en el extracto etanólico; y alcaloides y glicósidos en el extracto clorofórmico; lo contrario a nuestra investigación, donde no solo reportamos la presencia de flavonoides, sino también de

alcaloides, compuestos fenólicos y esteroides en extracto etanólico y no se detectó la presencia de taninos y saponinas.

La diferencia en cuanto a los componentes encontrados puede deberse a la sensibilidad del método a la cantidad de alcaloides presentes en la muestra o 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 (Santacoloma y Granados, 2012).

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, humedad, nivel, de nutrientes y presión osmótica (Masa, 2011).

Por otra parte, Zachow (2016), realizó un análisis fitoquímico de las partes aéreas de *Leonurus sibiricus* e indicó la presencia de terpenos, esteroides y alcaloides en los extractos metanólico y ácido metanólico; por el contrario en el análisis fitoquímico realizado a las fracciones hexanoica, diclorometanoica y etanólica de *L. japonicus* (Figura 33), tanto la fracción hexanoica como la diclorometanoica solo mostraron la presencia de esteroides; mientras que la fracción etanólica resultó positiva para alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides y esteroides.

Según Waterman y Mole (1994) 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), 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.

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

En un estudio realizado por Altamirano, Romano, Repetto, Abadi, y Moreno (2007), 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, y han adquirido un valor agregado inusitado al observarse que son capaces de manipular la expresión génica en células de mamíferos (Demmig y Adams, 2002); confiriéndole a las plantas pertenecientes a ésta familia, un gran potencial terapéutico.

En la Tabla 11, se muestran las lecturas de absorbancia a 760 nm del ácido gálico a diferentes concentraciones producto de la reacción con el reactivo Folin-Ciocalteu. Y en el en el gráfico 1, las curvas de calibración del ácido gálico, que se realizó por triplicado.

### Curva de calibración del ácido gálico

Tabla 11.

Lectura de absorbancia de las distintas concentraciones de la solución de ácido gálico empleada como patrón

Concentración de Ácido gálico (mg/mL)	Absorbancia a 760 nm		
	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\lambda_3$
10	0,118	0,193	0,155
20	0,362	0,432	0,397
25	0,532	0,574	0,553
40	0,919	0,925	0,922
50	1,100	1,098	1,099

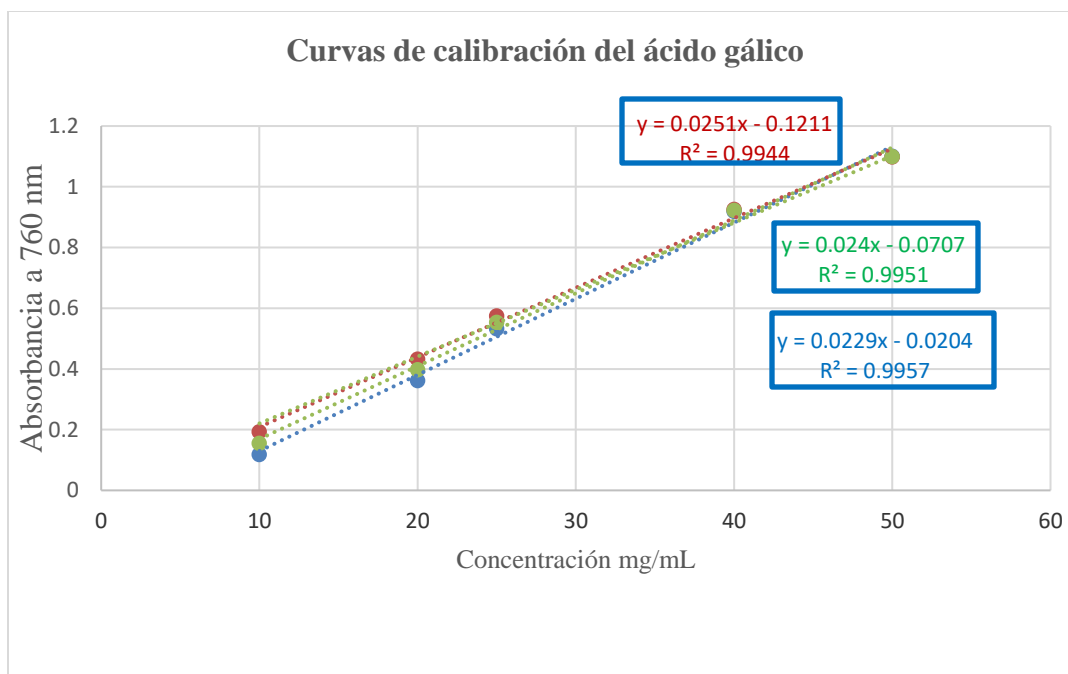


Gráfico 1. Curvas de calibración de ácido gálico

En el Gráfico 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 12).

Tabla 12.

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

Extracto	Concentración µg/mL	Absorbancia 760 nm			[ ] µg AG/mg de extracto seco			[ ] µg AG/mg de extracto seco ±
		$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\lambda_3$	$C_1$	$C_2$	$C_3$	DE
		Etanólico	50	1,142	1,140	1,141	0,81	0,89

AG = ácido gálico

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

**Estudio estadístico de la Cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus* por el método Folin-Ciocalteu.**

En la Tabla 13 se muestran los datos estadísticos de la cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*

*Tabla 13.*

Estudio estadístico de la cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*

		Absorbancia	Concentración $\mu\text{g}$ de Ácido
		760 nm	gálico / mg de extracto
N	Válidos	3	3
	Perdidos	0	0
Media		1,1410	0,8933
Error típ. de la media		0,00058	0,04910
Mediana		1,1410	0,8900
Desv. típ.		0,00100	0,08505
Varianza		0,000	0,007
Rango		0,00	0,17
Mínimo		1,14	0,81
Máximo		1,14	0,98

En la Tabla 14, se muestran los análisis de varianza ANOVA de la cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*.

*Tabla 14.*

Análisis de varianza de la cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	0,003	1	0,003	0,284	0,688
Residual	0,011	1	0,011		
Total	0,014	2			

La variable independiente es absorbancia 760 nm.

La variable dependiente es concentración  $\mu\text{g}$  de Ácido gálico/ mg de extracto

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 µg AG/mg.

Ravipati y col. (2012) evaluaron las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de 44 extractos de hierbas medicinales tradicionales chinas, y con el fin de comprender la variación de las actividades antioxidantes de los extractos con sus contenidos de antioxidantes, estimaron las cantidades fenólicas totales de cada especie, obteniendo niveles fenólicos de 0,84 mg de ácido gálico en el extracto etanólico de la especie *Leonurus japonicus*. La diferencia en cuanto al contenido de polifenoles, entre dicho estudio y nuestra investigación, aunque es poca, puede deberse a factores como el genotipo, lugar de recolección y parte de la planta, condiciones ambientales, cambios de estación, grado de madurez, composición del suelo y ubicación geográfica (Haminiuk, Maciel, Plata y Peralta, 2012).

Según Van der Sluis, Dekker, de Jager, y Jongen (2001), 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 los polifenoles. El grado de conservación puede también determinar el contenido en polifenoles fácilmente oxidables. La conservación en frío, sin embargo, no afecta al contenido de polifenoles.

Los factores mencionados, podrían explicar la gran diferencia entre los resultados obtenidos en el presente estudio, con los obtenidos por Kim y col. (2012), quienes 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 en el extracto etanólico de *L. japonicus*.

### Actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *Leonurus japonicus*

#### Curva patrón del ácido ascórbico.

En la Tabla 15, se muestran los resultados de % inhibición correspondiente a la curva patrón del ácido ascórbico.

Tabla 15.  
Curva patrón de ácido ascórbico

[ ] µg/mL	Absorbancia			Promedio	DE	%I
	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\lambda_3$	$\lambda$		
176	0,022	0,022	0,029	0,024	0,0	96,1
100	0,044	0,038	0,031	0,038	0,01	93,92
75	0,16	0,162	0,172	0,165	0,01	73,41
50	0,271	0,304	0,291	0,289	0,02	53,39
25	0,461	0,463	0,456	0,460	0,0	25,73
DPPH	0,62	0,619	0,619	0,619	0,0	
Blanco	0,062	0,061	0,067			

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

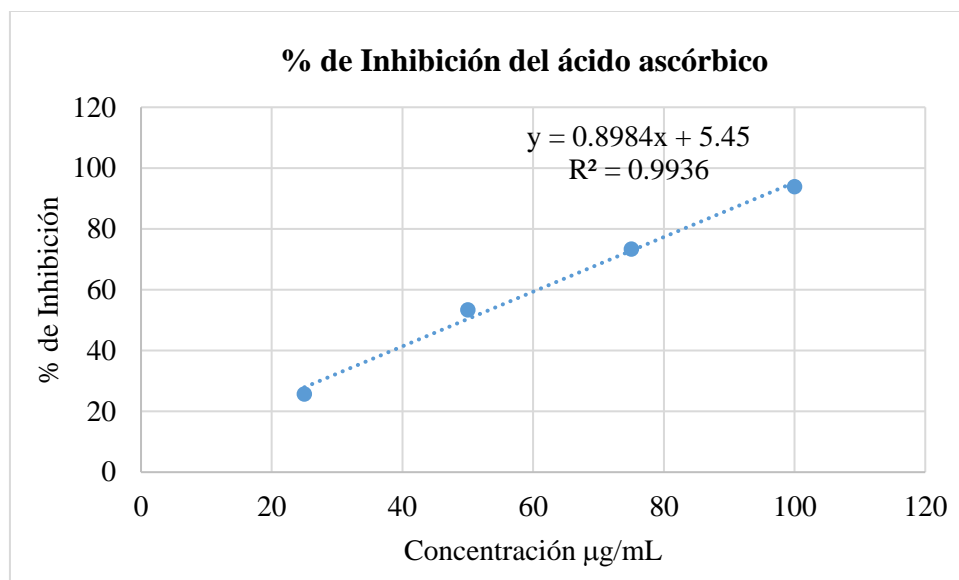


Gráfico 2. Curva de calibración del ácido ascórbico

La actividad antioxidante fue determinada mediante el método DPPH; previamente se realizó un barrido inicial con las fracciones hexanoica, diclorometanoica y etanólica, a una concentración de 4 mg/mL, con el fin de conocer si estas poseían potencial antioxidante.

Al realizar el barrido inicial, se observó que la fracción etanólica 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 las fracciones hexanoica y diclorometanoica mostraron un % inhibición de 45,07 y 15,9 respectivamente, lo que indicó que no poseían actividad antioxidante significativa (Tabla 16).

Tabla 16.

Determinación del potencial antioxidante de las fracciones

Muestra	Absorbancia a 517nm			Media	% Inhibición
	1	2	3		
Hexanoico	0,294	0,296	0,295	0,295	45,07
Diclorometanoico	0,598	0,602	0,602	0,601	15,9
Etanólico	0,046	0,061	0,046	0,051	92,9
Ácido ascórbico	0,027				
DPPH	0,715				

El potencial antioxidante fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Absorbancia DPPH} - \text{Absorbancia Muestra})}{(\text{Absorbancia DPPH})} \times 100$$

$$\% \text{ Inhibición C}_6\text{H}_{14} = \frac{(0,715 - 0,295)}{(0,715)} \times 100 = 45,07 \%$$

$$\% \text{ Inhibición CH}_2\text{Cl}_2 = \frac{(0,715 - 0,601)}{(0,715)} \times 100 = 15,9 \%$$

$$\% \text{ Inhibición CH}_3\text{OH} = \frac{(0,715 - 0,051)}{(0,715)} \times 100 = 92,9 \%$$

Posteriormente, se procedió a realizar la determinación de la actividad antioxidante al extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*. En la Tabla 17, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 17.

Actividad antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*

Concentración (mg/mL)	% Inhibición
0,5	57,7 ± 0,1
0,25	36,9 ± 0,1
0,15	22,8 ± 0,3
0,1	17,5 ± 0,5
0,05	14,1 ± 0,6
0,025	12,9 ± 0,1

Existen diferencias estadísticas significativas entre datos ( $p < 0,05$ ), con un nivel de confianza de 95%, cada determinación se realizó por triplicado ( $n = 3$ ), y los valores son presentados en %I ± DE donde DE es desviación estándar

Al utilizar el método DPPH se pudo observar y comprobar que la capacidad antioxidante de la fracción etanólica es alta ya que a su máxima concentración de dilución el porcentaje de inhibición fue de  $57,7 \pm 0,6$  %, en comparación de  $96,1$  % del ácido ascórbico a una concentración de  $0,176$  mg/mL.

En el Gráfico 3, se muestra el % de inhibición del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*.

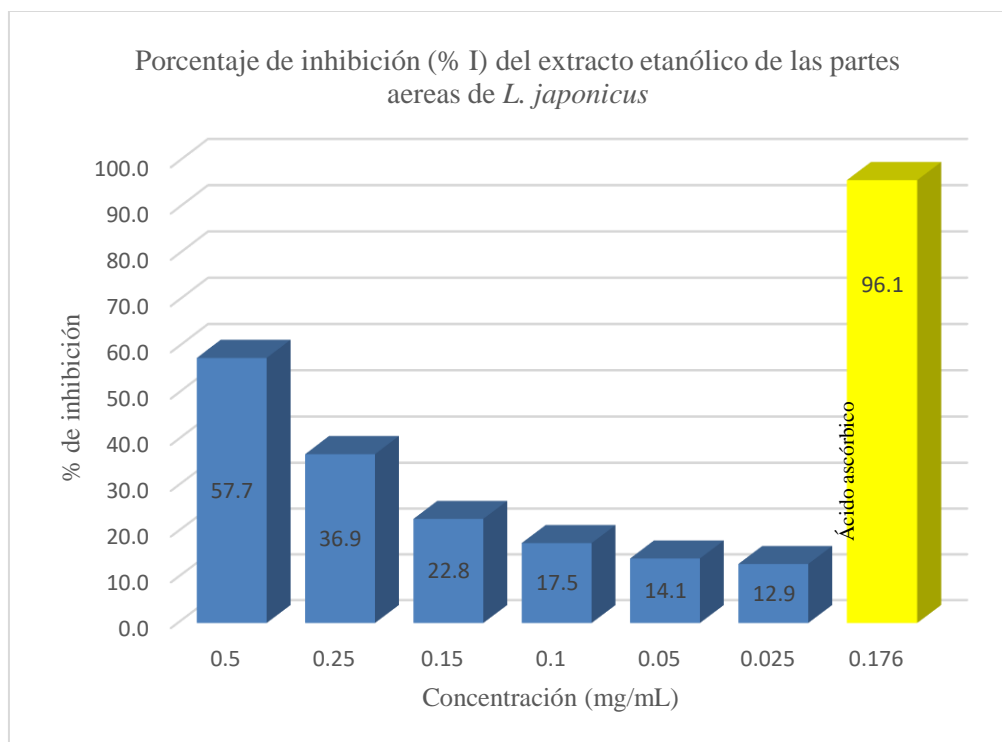


Gráfico 3. Porcentaje de inhibición (% I) del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*

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

Brand, Cuvelier y Berset (1995), 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 18, se muestra los valores de  $IC_{50}$  (n = 3).

Tabla 18.

Concentración eficiente 50 (IC<sub>50</sub>) del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*

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

En el Gráfico 4, se muestra la concentración eficiente 50 (IC<sub>50</sub>) por triplicado (n=3), del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*.

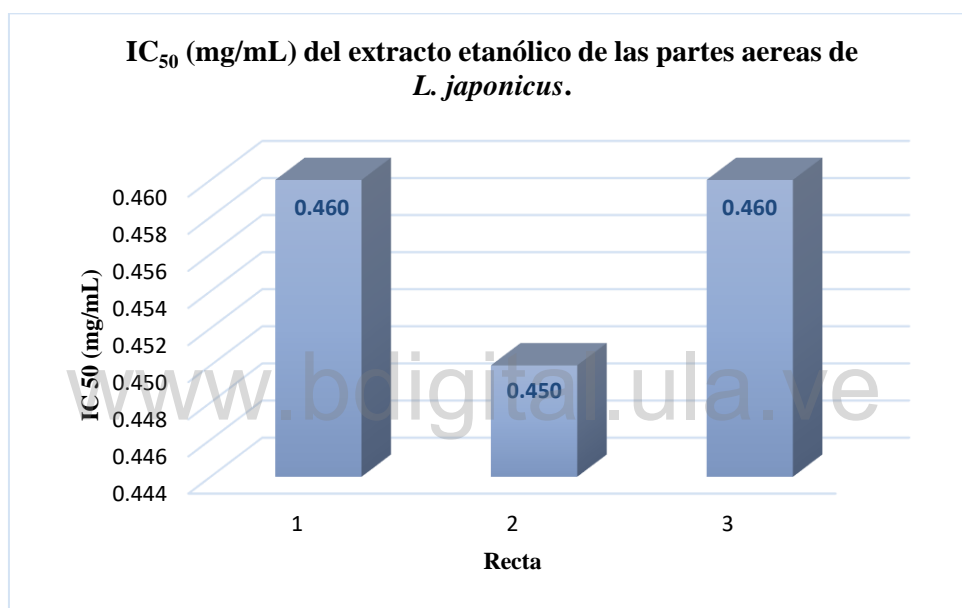


Gráfico 4. Concentración eficiente 50 (IC<sub>50</sub>) del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*

En la Tabla 19 se muestran los datos estadísticos de la actividad antioxidante de las partes aéreas de *L. japonicus*.

Tabla 19.

IC<sub>50</sub> del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*

	Concentración	
	Válidos	Perdidos
N	6	0
Media	0,1792	26,98
Error típ. de la media	0,07200	7,103
Mediana	0,1250	20,15
Moda	0,03 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>
Desv. típ.	0,17636	17,399
Varianza	0,031	302,722
Rango	0,48	45
Mínimo	0,03	13
Máximo	0,50	58
Suma	1,08	162

En la Tabla 20, se muestran los análisis de varianza ANOVA de una sola vía de la actividad antioxidante de las partes aéreas de *L. japonicus*.

Tabla 20.

Análisis de varianza ANOVA de una sola vía de la actividad antioxidante de las partes aéreas de *L. japonicus*

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	1498,403	1	1498,403	394,189	0,000
Residual	15,205	4	3,801		
Total	1513,608	5			

Variable Dependiente: % Inhibición

Variable Independiente: Concentración mg/mL

Variables Predictoras: (Constante), 0,1

En promedio, la concentración eficiente 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 Melo (2006), quien al realizar la determinación de la actividad antioxidante de *L. japonicus*, encontró que el extracto etanólico presentaba un IC<sub>50</sub> de 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), 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) 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), 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 21, se muestran los resultados promisorios del bioensayo de letalidad en *A. salina.*, del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus.* y timolos controles.

*Tabla 21.*

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> (ppm)	Límite de confianza (95%) ppm		Categoría según el CYTED
		Límite inferior	Límite superior	
Partes aéreas	2913,55			Relativamente inocuo
DMSO	-	-	-	Inocuo
DDSS	28,026	23,372	33,507	Altamente toxico

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 el Gráfico 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 (µg/mL).

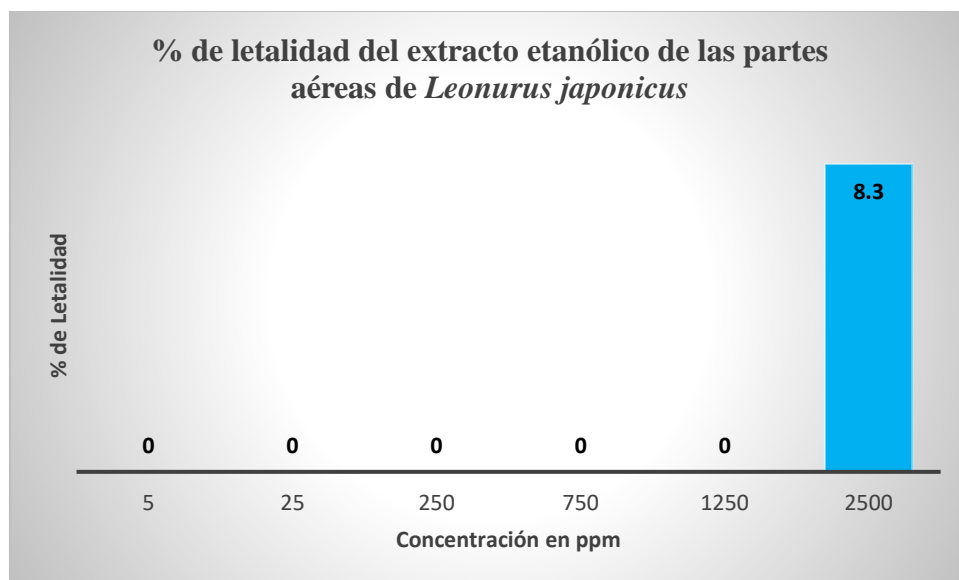


Gráfico 5. Porcentaje (%) de letalidad del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*. sobre *A. salina*. a las concentraciones probadas en unidades de ppm ( $\mu\text{g/mL}$ )

Con respecto al porcentaje de letalidad, el extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus*. fue de 8,3 % 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.

Martins y col. (2010), reportaron, utilizando los extractos metanólicos obtenidos a partir de las hojas y raíces de *L. sibiricus*., una  $DL_{50}$  sobre *Artemia salina* de 657,2 ml, mientras que, Saha, Bari, Rahman y Islam (2012) obtuvieron valores de  $DL_{50}$  de 1,0 ml del extracto de las hojas mientras que en el caso de la raíz fue de 2,0 ml. Es decir, los extractos fueron altamente tóxicos para *A. salina*.

Éstas 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, D'Armas, Troccoli, Rojas y Jaramillo (2016), 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, Qin y Lou (1999), indicaron que a menor concentración de saponinas, disminuye la toxicidad contra *A. salina.* Esto indica que las saponinas y los polifenoles pueden ser letales a *A. salina.* a bajas concentraciones. Cabe mencionar que en el extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus,* no se encontró presencia de saponinas, esta podría ser una razón válida para afirmar que, por esto, posiblemente en nuestro estudio se refleja la baja toxicidad del extracto sobre *A. salina.*

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 influenciar en la toxicidad del extracto sobre los nauplios de *A. salina* (Eslava, Wedler y Serna, 2011).

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPITULO V

### 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 fenólico total del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. japonicus* fue de 0,89 µg AG/mg.
- El extracto etanólico obtenido a partir de las partes aéreas de *L. japonicus*, a su máxima concentración de dilución, que fue 0,5 mg/mL, mostró un porcentaje de inhibición de 57,7, en comparación de 96,1 % del ácido ascórbico a 0,176 mg/mL. Además, su concentración eficiente 50 (mg/mL) para captar radicales libres fue de 0,457 mg/mL.
- 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, con un porcentaje de letalidad, de 8,3 % a 2500 ppm.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainsworth, E., Gillespie, K. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc*, 2(4), 875-877.
- Akerele, O. (1985). The who traditional medicine program: policy and implementation. *International Trade Medicinal Newsletter*, 1(1), 1-3.
- Altamirano, N., Romano, C., Repetto, M., Abadi, K., y Moreno, S. (2007). Bioactividades de compuestos polifenólicos no volátiles aislados de plantas Lamiaceae de Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(6), 319-320.
- Arias, F. (2012). *El proyecto de investigación. Introducción a la metodología científica* (6ª ed.). Caracas, Venezuela: Episteme.
- Ávalos, A., y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, 2(3), 119-145.
- Balestrini, M. (2002). *Cómo se Elabora un Proyecto de Investigación*. (6ª ed.). Caracas, Venezuela: Consultores Privados, Servicio Editorial.
- Bekut, M., Brkić, S., Kladar, N., Dragović, G., Gavarić, N., y Božin, B. (2018). Potential of selected Lamiaceae plants in anti(retro)viral therapy. *Pharmacological Research*, 133(1), 301–314.
- Brand, W., Cuvelier, M., y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. (2ª ed)*. Zaragoza, España: Acribia S. A.
- Carrión, A. (2010). *Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica* (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.
- Chu, Y., Wu, D., y Li, J. (1989). *Plantae Medicinales China Boreali-Orientalis*. Harbin, China: Heilongjiang Science and Technology Publishing House.
- Curtis, K. (2008). *Casarett and Doull's Toxicologi: The Basic Science of Poisons*. New York, EEUU: McGraw-Hill.
- Demmig, B., y Adams, W. (2002). Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science*, 298(1), 2149-2153.
- Deng, G., Lin, X., Xu, X., Gao, L., Xie, J., y Li, H. (2013). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. *Journal of functional foods*, 5(1), 260-266.
- Duke, J., y Ayensu, E. (1985). *Medicinal plants of China*. Míchigan, EEUU: University of Michigan. Reference Publications.
- Eslava, P., Wedler, E., y Serna, D. (2011). 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*, 6(1), 101-108.
- Gan, M., Han, L., Wang, R., y Yang, Z. (2019). Bioassay-guided isolation of an antimicrobial compound from *Leonurus japonicus* Houtt. *South African Journal of Botani*, 121(1), 92-97.

- García, E., Fernández, I., y Fuentes, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- González, M., Soto, M., Kite, G., Martínez, M. (2007). Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK Var. *Berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnica Mexicana*, 30 (1), 43–49.
- Gordillo, A. (2016). *Estudio fitoquímico del extracto clorofórmico de las flores de la especie Hiptis dilatata (Lamiaceae)* (Tesis de pregrado). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Facultad de Ciencias, Bogotá.
- Graf, B., Milburi, P., y Blumberg, J. (2005). Flavonols, Flavones, Flavanones, and Human Health: Epidemiological Evidence. *Journal of Medicinal Food*, 8(3), 281-290.
- Gutiérrez, A., y Estévez, A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 103(2), 409-419.
- Haminiuk, C., Maciel, G., Plata, M., y Peralta, R. (2012). Phenolic compounds in fruits – an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2023-2044.
- Harborne, J. (1993). *Introduction to Ecological Biochemistry*. New York, EEUU: Academic Press.
- Hurtado, J. (2010). *Metodología y la Investigación: Guía para la comprensión holística de la ciencia*. Caracas, Venezuela: Editorial Quirón.
- Jaramillo, C., D’Armas, H., Troccoli, L., Rojas, L., y Jaramillo, A. (2016). 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*, 64(3), 1171-1184.
- Jiang, J., Li, I., Feng, Z., Yang, I., y Zhang, P. (2015). Glucaric acids from *Leonurus japonicus*. *Fitoterapia*, 107(1), 85-89.
- Katewa, S., Chaudhary, B., y Jain, A. (2004). Folk herbal medicines from tribal area of Rajasthan, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(1), 41-46.
- Kim, E., Choi, J., Yu, M., Kim, M., Lee, S., y Lee, B. (2012). Total Polyphenols, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Korean Natural and Medicinal Plants. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 4(33), 337-342.
- Knežević , S., Blažeković , B., Kindl , M., Vladić , J., Nedza, A., y Brantner, A. (2014). Acetylcholinesterase Inhibitory, Antioxidant and Phytochemical Properties of Selected Medicinal Plants of the Lamiaceae Family. *Molecules*, 19(1), 767-782.
- Kuchta, K., Ortwein, J., Hennig, L., y Rauwald, HW. (2014). H-qNMR for direct quantification of stachidrine in *Leonurus japonicus* and *L. cardiaca*. *Fitoterapia*, 96(1), 8-17.
- Lai, K., Hu, H., Chiang, H., Liu, I., Yang, J., Yen-An Lin, I., Chen, C., Chang, I., y Lee, C. (2018). New diterpenes leojaponins G–L from *Leonurus japonicus*. *Fitoterapia*, 130(1), 125-133.
- Lee, M., Park, K., y Ma, J. (2018). *Leonurus japonicus* Hoult Attenuates Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Free Fatty Acid-Induced HepG2 Cells and Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients*, 10(1), 20.

- Liu, J., Peng, C., Zhou, Q., Guo, L., Liu, Z., y Xiong, L. (2018). Alkaloids and flavonoid glycosides from the aerial parts of *Leonurus japonicus* and their opposite effects on uterine smooth muscle. *Phytochemistry*, 145(1), 128-136.
- Lizcano, A., y Vergara, J. (2008). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Mircianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, Bogotá.
- Londoño J. (2011). *Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad*. Medellín, Colombia: Lasallista
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Caracas, Venezuela: Publicación del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela.
- Martín N. (10 de Noviembre de 2014). *Artemia salina* [Mensaje en un blog]. Recuperado de <http://www.zootecniadomestica.com/artemia-salina/>
- Martin, D. (2018). Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 81-104.
- Martínez, N. (8 de Noviembre de 2003). Las plantas medicinales (primera parte) [Mensaje en un blog]. Recuperado de [https://www.slan.org.ve/publicaciones/completas/plantas\\_medicinales\\_1.asp](https://www.slan.org.ve/publicaciones/completas/plantas_medicinales_1.asp)

- Martins, H., Ferreira, D., de Carvalho, D., Andrade, J., Costa, V., Braga, A., Pessoa, C., de Moraes, M., y Veras, L. (2010). Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. *Journal of Natural Medicines*, 64(1), 231-238.
- Masa, C. (2011). *Variación del metabolismo secundario en plantas debido al genotipo y al ambiente* (Tesis doctoral). Universidad de Extremadura, Badajoz, España.
- Melo, E. (2006). *Estudo farmacognóstico e farmacológico de Leonurus japonicus Houtt* (Tesis de pregrado). Universidad de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Miao, L., Zhou, Q., Peng, C., Liu, Z., y Xiong, L. (2019). *Leonurus japonicus* (Chinese motherwort), an excellent traditional medicine for obstetrical and gynecological diseases: A comprehensive overview. *Biomedicine y Pharmacotherapi*, 117(1), 1-18.
- Montealegre, C. (2011). *Etnobotánica preliminar del Espíngo (Ocotea quixos) en la medicina tradicional indígena inga, pruebas fitoquímicas y evaluación de la actividad antimicrobiana* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Moon, H. (2010). Three Diterpenes from *Leonurus japonicus* Houtt Protect Primary Cultured Rat Cortical Cells from Glutamate-induced Toxicity. *Phitotherapi Research*, 24(8), 1256-1259.
- Nguyen, L., Vo, H., Dang, S., Le, T., Ha, L., Nguyen, L-T., y Nguyen, L-H. (2017). Labdane and norlabdane diterpenoids from the aerial parts of *Leonurus japonicus*. *Phitochemistri Letters*, 22(1), 174-178.

- Palacios, M. (30 de noviembre de 2008). Introducción a la Farmacognosia: Farmacognosia [Mensaje de un blog]. Recuperado de <http://farmacognosia-farmaciaculadech.blogspot.com/>
- Palomino, O. (2001). Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales. *Apuntes del Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria*, 1(1), 15-23.
- Peng, I., Zheng, C., Wang, I., y Dai, O. (2017). Novel labdane diterpenoids from the aerial parts of *Leonurus japonicus*. *Phytochemistry Letters*, 20(1), 45-48.
- Pérez, M. (29 de Enero de 2013). *Leonurus japonicus* [Mensaje en un blog]. Recuperado de <http://www.botanicayjardines.com/leonurus-japonicus/>
- Pérez, I. (2006). *Metabolitos secundarios aislados de las raíces y las hojas de Stevia jorullensis H.B.K.* (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México.
- Pino, O., y Lazo, F. (2010). Ensayo de *Artemia*: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 25 (1), 34-43.
- Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Ravipati, A., Zhang, L., Koyyalamudi, S., Jeong, S., Reddy, N., Bartlett, J., Smith, P., Shanmugam, K., Münch, G., Wu, M., Satyanarayanan, M., y Vysetti, B. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and

- their relation with antioxidant content. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 1-14.
- Ruiz, E., y Moreira, J. (2017). Metabolitos secundarios en plantas medicinales usadas para problemas gastrointestinales. Una revisión sobre medicina ancestral ecuatoriana. *Bases de la Ciencia*, 2(3), 1-16.
- Saha, M., Bari, F., Rahman, M., y Islam, M. (2012). In Vitro Cytotoxic and Anthelmintic Activities of Leaf and Root Extracts of *Leonurus sibiricus* L. *Journal of Scientific Research*, 4(3), 721-727.
- Santacoloma, L., y Granados, J. (2012). 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*, 3(1), 53-62.
- Shang, X., Pan, H., Wang, X., He, H., y Li, M. (2014). *Leonurus japonicus* Houtt.: Ethnopharmacology, phitochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. *Journal of Ethnopharmacologi*, 152(1), 14-32.
- Sheldon, J., Balick, M., y Laird, S. (1997). *Medicinal plants: ¿can utilization and conservation coexist?*. New York, EEUU: New York Botanical Garden. Scientific Publications Department.
- Shrestha, P., y Dhillion, S. (2003). Medicinal plant diversity and use in the highlands of Dolakha district, Nepal. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(1), 81-96.

- Sugaya, K., Hashimoto, F., Ono, M., Ito, I., Masuoka, C., y Nohara, T. (1998). Anti-Oxidative Constituents from Leonurii Herba (*Leonurus japonicus*). *Food Science and Technology International Tokyo*, 4(4), 278-281.
- Toledo, M. (2015). *Estudio fitoquímico, evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de la corteza de “triumfetta semitriloba” jacq (motecepo) y análisis de parámetros reológicos del mucílago* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Tovar, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera* (Tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira, Risaralda, Colombia.
- Valdés, M., Tamargo, B., Salas, E., Plaza, L., Blanco, Y., Otero, A., y Sierra, G. (2015). Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(1), 106-116.
- Van der Sluis, A., Dekker, M., de Jager, A., y Jongen, W. (2001). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3606-3613
- Velázquez, D. (1997). Clave para los generos de Lamiaceae en Venezuela. *Acta Botánica Venezuéllica*, 20(1), 1-42.

- Villatoro, C. (2008). *Tamizaje Fitoquímico De Las Partes Aéreas (Hojas, Tallo, Flores I Fruto) de Garria Corvorum Standl. y Steierm. (Garriaceae) Especie Endémica de Guatemala* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos, Guatemala.
- Waterman, P.G., y Mole, S. (1994). *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Oxford, Reino Unido: Blackwell Scientific Publications.
- World Health Organisation (2014), WHO traditional medicine strategy: 2014-2023.
- Wu, H., Sun, T., Zhao, F., Zhang, L., Li, G., y Zhang, J. (2017). New diterpenoids isolated from *Leonurus japonicus* and their acetilcholinésterase inhibitory activity. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15(1), 860-864.
- Wu, H., Wang, S., Liu, H., E, I., Li, I., Liu, R., Wang, J., Xu, Z., Lv, I., Sun, S., Li, G., i Shi, I. (2015). Two new diterpenoids from *Leonurus japonicus*. *Phytochemistri Letters*, 12(1), 287-290.
- Yockteng J. (3 de Marzo de 2017). Biología de la *Artemia* sp. [Mensaje en un blog]. Recuperado de <https://www.bioartemia.com/2017/03/03/biologia-de-la-artemia-sp/>
- Yokozawa, T., Chen, C., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G., y Nishioka, I. (1998). Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Radical Biochemical Pharmacology*, 56(1), 213-222.
- Zachow, L. (2016). *Extração, composição química e avaliação das atividades de inibição enzimática e antimicrobiana de Leonurus sibiricus L.* (Tesis de maestría). Universidad Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.

- Zhang, R., Liu, Z., Yang, D., Zhang, X-J., Sun, H., y Xiao, W. (2018). Phytochemistry and pharmacology of the genus *Leonurus*: The herb to benefit the mothers and more. *Phytochemistry*, 147(1), 167-183.
- Zhang, Y., Deng, S., Qu, L., An, Y., Wu, C., Han, L., Gao, X., y Wang, T. (2013). Rare Syringyl Acylated Flavonol Glycosides from the Aerial Parts of *Leonurus japonicus* Houtt. *Molecules*, 18(3), 2967-2977.
- Zhao, W., Qin, G., y Lou, L. (1999). Evaluation of toxicity of some saponins on brine shrimp. *Journal of Asian Natural Product Research*, 1(1), 307-311.
- Zhou, Q., Zhu, H., Feng, R., Peng, C., Iang, H., Liu, F., Wang, I., y Xiong, L. (2019). New triterpenoids from *Leonurus japonicus* (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 82(1), 27-30.
- Zhou, Q., Peng, C., Yang, H., Liu, L., Yang, I., Xie, X., Guo, L., Liu, Z., y Xiong, L. (2015). Steroids from the aerial parts of *Leonurus japonicus*. *Phytochemistry Letters*, 12(1), 287-290.
- Zhou, Q., Peng, C., Li, X., Xiong, L., He, C., Guo, L., Cao, Z., y Liu Z. (2013). Aromatic compound from *Leonurus japonicus* Houtt. *Biochemical Systematics and Ecology*, 51(1), 101-103.