

Artículo de investigación científica / <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n1.95333>

Estudio fitoquímico, actividad antioxidante y toxicidad sobre *Artemia salina* de los extractos de las hojas de *Justicia secunda* Vahl. (Acanthaceae), recolectada en Mérida-Venezuela

Tatiana López¹, Marielba Morillo^{1*}, Tomas Visbal¹, Juan Carmona²

¹Departamento de Ciencias de los Alimentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. 5101, Fax. +58-274-2403473.

²Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. 5101.

*Autor de correspondencia: marimorillo@gmail.com, Orcid: 0000-0002-6048-0590

Recibido: 4 de mayo de 2021

Revisado: 20 de junio de 2021

Aceptado: 26 de junio de 2021

RESUMEN

Objetivos: realizar el estudio fitoquímico cualitativo para determinar la actividad antioxidante y toxicidad sobre *Artemia salina* de los extractos de las hojas de *Justicia secunda* Vahl, recolectada en Mérida, Venezuela. **Metodología:** el tamizaje fitoquímico de los extractos de las hojas de *Justicia secunda* Vahl. (Acanthaceae) se realizó a través de pruebas químicas específicas y permitió determinar la presencia de esteroides en el extracto hexanoico; esteroides y compuestos fenólicos en el diclorometanoico; alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos en el extracto etanólico. La actividad antioxidante de los extractos de *J. secunda* fue evaluada usando el método de la capacidad secuestrante de radicales libres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) mediante espectrofotometría UV-visible a una longitud de onda de 517 nm, con ácido ascórbico como control positivo (176 µg/mL). **Resultados:** los extractos diclorometanoico y etanólico mostraron actividad antioxidante, con un porcentaje de inhibición superior a 50 a 4 mg/mL y a una concentración de 0,75 mg/mL un porcentaje de inhibición de 27,7 y 53,0; IC₅₀ de 1,85 mg/mL y 0,69 mg/mL, respectivamente. En cuanto a la toxicidad sobre *A. salina*, del extracto etanólico mostró

una DL_{50} entre 919,32 y 3781,9 ppm y es relativamente inocuo, según la clasificación CYTED. **Conclusión:** en general, los resultados obtenidos sugieren que los extractos de las hojas de *J. secunda* Vahl, podrían ser una alternativa en la formulación de fármacos, debido a su potencial como antioxidante y su baja toxicidad.

Palabras clave: *Justicia secunda*, Acanthaceae, actividad antioxidante, *Artemia salina*.

SUMMARY

Phytochemical study, antioxidant activity and toxicity on *Artemia salina*, from extracts of aerial parts of *Justicia secunda* Vahl. (Acanthaceae), collected in Mérida-Venezuela

Aims: To carry out the qualitative phytochemical study to determine the antioxidant activity and toxicity on *Artemia salina* of the extracts of the leaves of *Justicia secunda* Vahl, collected in Mérida, Venezuela. **Methodology:** Phytochemical screening of extracts from the aerial parts of *Justicia secunda* Vahl. (Acanthaceae) was carried out through specific chemical tests that allowed the presence of sterols in the hexanoic extract to be determined; sterols and phenolic compounds in the dichloromethane and alkaloids, sterols and phenolic compounds in the ethanolic extract. The antioxidant activity of extracts from the aerial parts of *J. secunda* was evaluated by using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) radical scavenging method, using spectrophotometry UV-Visible at a wavelength of 517 nm, with ascorbic acid as control (176 µg/mL). **Results:** The dichloromethane and ethanolic extracts showed antioxidant activity, with an inhibition percentage higher than 50 to 4 mg/mL and at a concentration of 0.75 mg / mL, percentage of 27.7 and 53.0; IC_{50} of 1.85 mg/mL and 0.69 mg/mL, respectively. Regarding toxicity on *A. salina*, the ethanolic extract showed an LD_{50} between 919.32 and 3781.9 ppm, it was relatively harmless, according to the CYTED classification. **Conclusion:** Overall, the results obtained suggest that the extracts of the aerial parts of *J. secunda* Vahl, could be an alternative for future drug formulation since it has potent antioxidant activity and low toxicity.

Keywords: *Justicia secunda*, Acanthaceae, antioxidant activity, *Artemia salina*.

RESUMO

Estudo fitoquímico, atividade antioxidante e toxicidade em *Artemia salina*, a partir de extratos de partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl. (Acanthaceae), coletada em Mérida-Venezuela

Objetivo: realizar o estudo fitoquímico qualitativo para determinar a atividade antioxidante e toxicidade sobre *Artemia salina* dos extratos das folhas de *Justicia secunda* Vahl, coletadas em Mérida, Venezuela. **Metodologia:** triagem fitoquímica de extratos das partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl. (Acanthaceae) foi realizado por meio de testes químicos específicos e permitiu determinar a presença de esteróis no extrato hexanoico; esteróis e compostos fenólicos no diclorometano e alcalóides, esteróis e compostos fenólicos no extrato etanólico. A atividade antioxidante de extratos das partes aéreas de *J. secunda* foi avaliada pelo método de sequestro do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•), por espectrofotometria UV-Visível no comprimento de onda de 517 nm, com ácido ascórbico como controle (176 µg/mL). **Resultados:** os extratos diclorometano e etanólico apresentaram atividade antioxidante, com percentual de inibição superior a 50 a 4 mg/mL e na concentração de 0,75 mg/mL, percentagem de 27,7 e 53,0; IC₅₀ de 1,85 mg/mL e 0,69 mg/mL, respectivamente. Em relação à toxicidade sobre *A. salina*, o extrato etanólico apresentou DL50 entre 919,32 e 3781,9 ppm, sendo relativamente inofensivo, segundo a classificação CYTED. **Conclusão:** de maneira geral, os resultados obtidos sugerem que os extratos das partes aéreas de *J. secunda* Vahl, podem ser uma alternativa para futura formulação de fármacos por apresentarem potente atividade antioxidante e baixa toxicidade.

Palavras-chave: *Justicia secunda*, Acanthaceae, atividade antioxidante, *Artemia salina*.

INTRODUCCIÓN

La familia Acanthaceae se caracteriza por corresponder a plantas herbáceas o erectas de raros arbustos o árboles pequeños [1]. Es una gran familia pantropical de zonas templadas y posee alrededor de 230 géneros y 4000 especies distribuidas a lo largo de los trópicos, de estos géneros el más grande es el género *Justicia* [2, 3], que comprende aproximadamente 600 especies que se distribuyen en las regiones tropicales y subtropicales del mundo [2-4].

Justicia secunda Vahl., conocida también como: singamochila, cascajera, sanguinaria, yerba de la sangre, sangre de Cristo, insulina, la hoja de la vida, curatodo, canilla de

pollo, entre otros [5], es un pequeño arbusto perenne de 0,5 a 1 m de altura, con flores rojo-violeta que se agrupan en 5 pétalos sobre la corola, proviene de regiones tropicales y templadas, por lo que se encuentra ampliamente distribuida en varios países [6].

Justicia secunda Vahl ha sido usada por las poblaciones latinoamericanas en afecciones como anemia, dolores (riñones, oídos, garganta), hipoglucemiante, energizante e hipolipemiante, sin que se haya establecido aun su eficacia [5, 7]. En América Central y el norte de Sur América se utiliza para el tratamiento de cálculos renales; en Venezuela como antipirético; en Colombia para los trastornos relacionados con la glicemia, patologías infecciosas y también tiene aplicación etnoveterinaria para lesiones por mordeduras de serpientes y disentería de perros de caza [8].

Zambrano y Bustamante [5] identificaron en los extractos de las hojas de *Justicia secundan Vahl* (recolectada en Ecuador) alcaloides, taninos, glucósidos fenólicos, triterpenos y esteroides (extracto alcohólico); alcaloides, triterpenos y esteroides (extracto etéreo). Akibou *et al.* [9] determinaron: saponinas, alcaloides, taninos, mucílagos, antraquinonas, leucoantocianina, antocianinas y triterpenos en el extracto alcohólico de las hojas de esta especie cosechada en África.

Otros estudios, reportados en las hojas de *Justicia secunda Vahl*, mostraron la presencia de alcaloides, flavonoides, quinonas, taninos y antocianinas [10]; la mayoría de los compuestos flavonoides son los derivados de la luteolina [11]; del extracto diclorometanoico de las hojas se aislaron auranamida, acetato de aurantiamida y quindolina [12].

Theiler *et al.* [13] lograron aislar del extracto metanólico de las hojas tres nuevas amidas cíclicas, que fueron identificadas como derivados pirrolidona llamadas secundarona A, B y C. Mientras que, Koffi *et al.* [11] aislaron del extracto acuoso de las hojas luteolina 7-O-[-glucopiranosil-(1→2)-ramnosil-(1→6)] -glucopiranosido y luteolina 7-O-[-apiofuranosil-(1→2)]xilopiranosido.

En la presente investigación se planteó realizar el estudio fitoquímico cualitativo para determinar la actividad antioxidante y toxicidad sobre *Artemia salina* de los extractos de las hojas de *Justicia secunda Vahl* recolectada en Mérida, Venezuela.

METODOLOGÍA

Recolección de la muestra

Las hojas de *Justicia secunda Vahl* fueron recolectadas en el Jardín de Plantas Medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ubicado en el municipio Libertador del

estado Mérida, a una altitud de 1630 m s.n.m. La planta fue identificada botánicamente por el Ing. Juan Carmona, adscrito al Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (ULA). Se depositó una muestra en el herbario Dr. Luis Enrique Ruiz Terán (MERF), de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (ULA), Mérida, identificado como *voucher*, número 04 (25/09/2017).

Obtención de los extractos de las hojas de *J. secunda Vahl*

Se utilizaron hojas y tallos de la planta, se cortaron en trozos pequeños, se secaron en una estufa a 40 °C durante 48 h, se procedió a moler y pesar en una balanza Denver Instrument XL 3100, se obtuvieron 82,5 g. Se preparó el extracto hexanoico, por maceración a temperatura ambiente, para tal fin, se colocó el material vegetal en 200 mL de hexano (Merck) y se dejó macerar por 48 h, se procedió a filtrar y concentrar el extracto hasta sequedad empleando el rotaevaporador IKA RV 10 digital a 45 °C. Este procedimiento se repitió dos veces más. De la misma forma, se obtuvieron los extractos diclorometanoico (diclorometano Merck) y etanólico de la planta (etanol Merck). Se recuperaron 600 mg (extracto hexanoico), 1030 mg (diclorometanoico) y 1150 mg (etanólico).

Estudio fitoquímico preliminar

Para la caracterización química de los metabolitos secundarios presentes en los extractos hexanoico, diclorometanoico y etanólico, de las hojas y tallos de *J. secunda Vahl.*, se efectuó una serie de pruebas químicas cualitativas siguiendo la metodología descrita [14].

Actividad antioxidante método DPPH•

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

La evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos hexanoico, diclorometanoico y etanólico de las hojas de *J. secunda Vahl.*, se realizaron siguiendo el ensayo del test de actividad secuestrante de radicales libres del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), según la metodología descrita [15-19].

Esta técnica consistió en preparar una solución madre de cada uno de los extractos, tomando 4 mg de cada uno, en tubos eppendorf y se disolvieron en 1 mL de metanol,

el ensayo se realizó por triplicado para cada uno de los extractos, para tal fin, se prepararon 3 tubos de cada uno, que contenían 700 μL de DPPH• (6×10^{-2} mM) y 300 μL del extracto, se dejó en reposo en la oscuridad por 30 min, después se procedió a medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 517 nm, con cada uno de los extractos que presentaron un porcentaje de inhibición (% I) del radical DPPH• igual o superior a 50 a 4 mg/mL, se preparó una solución madre de concentración de 1 mg/mL y a partir de la misma se prepararon varias diluciones (0,75; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 mg/mL) y se procedió a determinar la actividad antioxidante. Se realizó una curva patrón con ácido ascórbico, partiendo de una solución madre con una concentración de 1 mM (17,6 mg en 100 mL de metanol). El porcentaje de inhibición (% I) de radicales libres de DPPH• se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%I = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extracto}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100 \quad (1)$$

En función de la concentración del analito se calculó por regresión lineal para cada muestra la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}). Por razones de claridad, los resultados fueron expresados en términos de $1/\text{IC}_{50}$ o poder antiradicalario (ARP), es decir, a mayor valor de ARP, mayor será la eficiencia del extracto como antioxidante [15, 16, 19].

Estudio estadístico

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

Toxicidad en *Artemia salina*

La evaluación de toxicidad sobre nauplios (larvas) de *A. salina* del extracto etanólico de las partes aéreas de *Justicia secunda Vahl* se realizó en el Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, este método estándar se basa en la determinación de la dosis letal 50 (DL_{50}), es decir, concentración que causa la muerte al 50 % de una población de nauplios, en 24 h.

Reactivos

Los reactivos utilizados para evaluar la toxicidad del extracto etanólico frente a *A. salina*, de marca Sigma-Aldrich y Merck fueron: cloruro de sodio (NaCl), sulfato

de magnesio hexahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 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, levadura comercial y quistes del crustáceo *A. salina* (Brine Shrimp Egg. Artemia cysts O.S.I. Pro 100. Ocean Star International. INC. Snowville. UT 84336. EE.UU.). En el desarrollo del bioensayo, primero se preparó una solución marina de aproximadamente 1000 mL (agua de mar artificial), que proporcionó las condiciones necesarias para el desarrollo de los nauplios de *Artemia*. Esta solución se mantuvo en aireación constante (burbujeo) 72 h previas al bioensayo, con la finalidad de oxigenar la misma [20].

Eclósión de los quistes

Al finalizar el tiempo de aireación de la solución marina (72 h) se dividió la solución en dos recipientes (fiolas) con 500 mL aproximadamente en cada una, en una se añadió alrededor de 250 mg de quistes, manteniendo una temperatura constante de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h. La solución marina libre de nauplios, se utilizó como disolvente para preparar las diferentes diluciones del extracto etanólico y llenado de las placas [20].

Desarrollo de la prueba

Primero, se colocaron 130 μL de solución salina (aireada) en cada pozo de una placa de microtitulación, posteriormente, se agregaron a cada pozo 10 μL de solución que contenían entre 10 y 15 nauplios de *A. salina*, luego se le adicionó 10 μL de una solución de levadura comercial marca Fleischmann (5 mg/mL) a cada pozo y se incubaron las placas en un área con iluminación permanente por 24 h para excitar su actividad metabólica. Finalmente, se colocaron 50 μL del extracto etanólico, a distintas concentraciones (5, 25, 250, 750, 1250 y 2500 ppm). El extracto se diluyó en solución salina: DMSO (9:1). Se incluyó, además, un grupo control negativo (con todos los elementos del ensayo, excepto la muestra a ensayar) y un grupo control positivo (Dodecil sulfato de sodio, DDSS 10 %) con 6 réplicas para cada grupo. Se registraron el número de nauplios presentes inicialmente en cada pozo (NV), y al cabo de 24 h de contacto con los extractos se realizó el conteo del número de nauplios muertos (NM). Se calculó el porcentaje de letalidad mediante la ecuación: porcentaje de letalidad = $(\text{NM}/\text{NV}) \times 100$ [21]. Se determinó la dosis letal 50 (DL_{50}) con un intervalo de confianza del 95 %, se usó el método de análisis Probit y el programa estadístico SPSS, 21.0 para Windows. Se clasificaron la DL_{50} de los extractos evaluados según la toxicidad, tomando como referencia las recomendaciones el Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el desarrollo (Cytel) [21].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio fitoquímico de los extractos de la hojas de *J. secunda* Vahl.

El estudio fitoquímico preliminar se realizó mediante pruebas químicas y arrojó la presencia de esteroides en el extracto hexanoico; esteroides y compuestos fenólicos en el extracto diclorometanoico; alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos en el extracto etanólico (tabla 1).

Tabla 1. Resultados del estudio fitoquímico de los extractos hexanoico, diclorometanoico y etanólico, de las hojas de *J. secunda* Vahl.

Metabolitos secundarios	Reacción de coloración o precipitación	EH	ED	EE
Alcaloides	Dragendorff			+++
	Wagner			+++
	Mayer			+++
Esteroides	Liebermann-Burchard	++	+++	+
Terpenos	Liebermann-Burchard	-	-	-
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	-	+	+++
Taninos	Prueba de la gelatina			-
Flavonoides	Shinoda	-	-	-
Saponinas	Prueba de la espuma	-	-	-
Cumarinas	Prueba NH ₄ OH	-	-	-
Quinonas	Luz UV	-	-	-

+++ Muy abundante, ++ abundante, + presente en poca concentración. EH: extracto hexanoico, ED: extracto diclorometanoico, EE: extracto etanólico.

Los resultados obtenidos en la composición fitoquímica (tabla 1) son similares a los reportados por algunos investigadores [5, 9, 10, 11], sin embargo, difieren en varios compuestos reportados: taninos, quinonas, saponinas y flavonoides, que están ausentes en el presente estudio, esto podría deberse a las diferencias en los sitios de recolección del material vegetal, donde probablemente existen características ambientales como: luz, temperatura y precipitaciones, diferentes a las de Venezuela, que pueden influir en la producción de los metabolitos secundarios de la planta [22].

La luz es posiblemente el factor más significativo, ya que favorece el crecimiento de los tejidos jóvenes, etapa en la cual ocurre la acumulación de los principios activos. La temperatura también juega un papel importante en la producción de metabolitos secundarios e influye en el crecimiento acelerado y en el equilibrio entre el proceso de fotosíntesis y respiración, por consiguiente, en la producción de los principios activos, con relación a las precipitaciones, esta juega un rol fundamental al modificar los efectos ecológicos de otros factores, por ejemplo, la regulación de las temperaturas [22].

Por otra parte, la disponibilidad de agua contribuye a la producción de taninos condensados; ya que, al encontrarse en periodo de escasez de agua, las plantas cierran sus estomas y restringen el proceso de fotosíntesis, de este modo se esperaría una relación negativa entre el estrés hídrico y la producción de compuestos fenólicos [23].

Valares [24] afirmó que las características de la planta, como el contenido de agua, proteínas y metabolitos secundarios generalmente cambian, dependiendo de las condiciones de crecimiento y estado de desarrollo de un órgano. Las hojas jóvenes secretan mayor cantidad de flavonoides y diterpenos que los tallos y estos a su vez más que las hojas maduras. Por tanto, la edad de la planta es otro aspecto que pudo haber influido en que algunos metabolitos no hayan sido aislados.

Otro aspecto inherente a la planta (que incide en el contenido de metabolitos secundarios) es la parte de la planta utilizada. Se ha demostrado que las diferentes partes de la planta presentan distintas productividades de metabolitos secundarios, además de que se acumulan cantidades de metabolitos diferentes dependiendo de la parte de la misma a la cual corresponde tal acumulación [23]. También, la altura de la planta puede afectar la producción y acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides [25].

Actividad antioxidante de los extractos de las hojas de *J. secunda Vahl*

Los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante realizada con el método de la capacidad secuestrante de radicales libres sobre el reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) de los extractos diclorometanólico y etanólico, obtenidos de las hojas de la especie *Justicia secunda Vahl.*, revelaron porcentajes de inhibición de estos radicales, superiores al 50 % a la concentración de 4 mg/mL (figura 1).

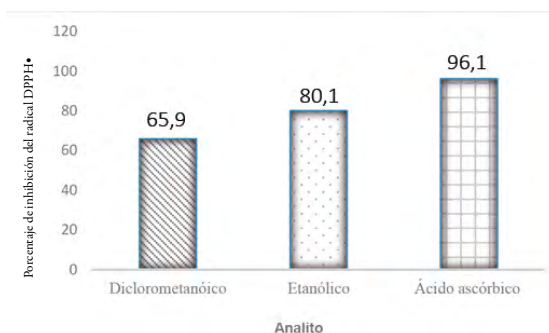


Figura 1. Porcentaje de inhibición del radical DPPH• de los extractos diclorometanólico y etanólico de las hojas de *Justicia secunda Vahl* a 4 mg/mL.

Las curvas de porcentaje I vs. concentración de los extractos (figura 2) se construyeron hasta una concentración máxima de 0,75 mg/mL, como el poder captador de radicales libres de los extractos es inversamente proporcional a la IC_{50} , es decir, a menor valor de IC_{50} mayor será la capacidad antioxidante del analito, para evitar confusiones, todos los resultados se expresaron como ARP (por sus siglas en inglés *antirradical power*) o el inverso de la IC_{50} [15,16,19].

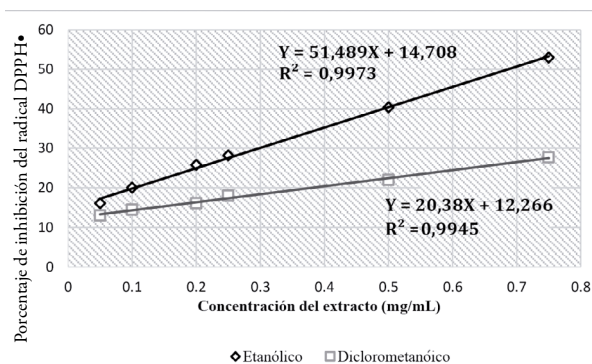


Figura 2. Curvas de % I vs concentración de los extractos diclorometanólico y etanólico de las hojas de *Justicias secunda Vahl*.

En la tabla 2 se muestra la actividad antioxidante de los extractos de las hojas de *Justicia secunda Vahl*, el extracto diclorometanólico mostró 27,7 % de inhibición del radical DPPH•, con un IC_{50} de 1,85 mg/mL y ARP 0,54 mL/mg y el extracto etanólico, 53,0 % de inhibi-

ción del radical DPPH•, un IC₅₀ de 0,69 mg/mL y ARP 1,45 mL/mg, comparado con el **ácido ascórbico** con porcentaje I de 96,1; IC₅₀ de 0,047 mg/mL y ARP 21,27 mL/mg (tabla 2).

Tabla 2. Actividad antioxidante de los extractos de las hojas de *Justicia secunda Vahl.*

Analito	Porcentaje I	IC ₅₀ (mg/mL)	ARP (1/IC ₅₀) (mL/mg)
Extracto diclorometanólico (0,75 mg/mL)	27,7 ± 0,3	1,85 ± 0,05	0,54 ± 0,05
Extracto etanólico (0,75 mg/mL)	53,0 ± 0,1	0,69 ± 0,01	1,45 ± 0,01
Ácido ascórbico (0,176 mg/mL)	96,1 ± 0,1	0,047 ± 0,05	21,27 ± 0,05

Existen diferencias estadísticamente significativas entre datos ($p < 0,05$) con un nivel de confianza de 95,0 %.

Se pudo observar y comprobar la capacidad antioxidante del extracto etanólico, el porcentaje de inhibición fue de $53,0 \pm 0,1$ % a su máxima concentración de dilución (0,75 mg/mL), además, se corroboró que la capacidad antioxidante del extracto diclorometanólico fue de $27,7 \pm 0,3$ % a 0,75 mg/mL, en comparación de 96,1 % (176 µg/mL) del ácido ascórbico utilizado como control positivo (tabla 2).

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede inferir que el extracto etanólico de las hojas de *Justicia secunda Vahl* presentó la mayor actividad antioxidante de los dos extractos, con un porcentaje de inhibición por encima del 50 %. Los resultados de este estudio coinciden con los reportados por Onoja *et al.* [26], quienes mostraron que los extractos de *Justicia secunda Vahl* tienen alto potencial antioxidante.

Dentro de estos parámetros de actividad antioxidante, se podría decir que la capacidad de secuestrar radicales libres de los extractos se debe a la presencia de componentes fenólicos en los mismos [27, 28], varios investigadores relacionan la capacidad antioxidante con el contenido de compuestos fenólicos ya que cada componente puede contribuir de forma y proporción diferente. Además, es necesario considerar que dicha correlación no solo depende de la concentración y la calidad antioxidante, sino también de su interacción con otros componentes y la metodología aplicada.

Según el estudio realizado por Echavarría *et al.* [29], las especies vegetales que presentan valores de IC₅₀ similares entre sí tienen una capacidad análoga de capturar el radical DPPH•, además esta capacidad corresponde a una mayor concentración de fenoles totales. Es decir, los extractos con mayor contenido fenólico son los de mayor actividad inhibidora del radical DPPH•.

Del mismo modo, otros estudios confirmaron que existe una relación inversamente proporcional entre la IC₅₀ y la actividad antioxidante, a menor valor del IC₅₀ mayor actividad antiradical. Mediante las pruebas químicas de caracterización se detectó la presencia de flavonoides, taninos, triterpenos, alcaloides y saponinas en plantas con IC₅₀ bajo y en algunas especies también se han reportado, polifenoles, glucósidos cianogénicos, lactonas, cumarinas, esteroides y antraquinonas [30].

Todas estas afirmaciones se pudieron confirmar en este estudio, ya que el extracto etanólico, que presentó mayor concentración de compuestos fenólicos fue el que mostró mayor actividad antioxidante y un IC₅₀ de $0,69 \pm 0,01$ mg/mL (tabla 2).

Toxicidad del extracto etanólico de las hojas de *J. secunda Vahl* sobre *Artemia salina*

En la tabla 3 se muestran los resultados del bioensayo de letalidad en *Artemia salina*, aplicado solamente al extracto etanólico de las hojas de *J. secunda Vahl* y los controles. En la figura 3 se exponen los porcentajes de letalidad del extracto etanólico de *J. secunda Vahl* sobre *A. salina*.

Tabla 3. Cuantificación de DL50 del extracto etanólico de las hojas de *Justicia secunda Vahl* y los controles sobre *Artemia salina*.

Analitos	DL (ppm)	Límite de confianza (95%) ppm		Categoría según el Cyted
		Límite inferior	Límite superior	
Extracto hojas	1767,011	919,319	3781,910	Relativamente inocuo
DMSO	-	-	-	Inocuo
DDSS	28,026	23,372	33,507	Altamente tóxico

DL50: dosis letal 50; signo (-) valores muy altos; DMSO: dimetilsulfóxido; DDSS: dodecil sulfato de sodio.

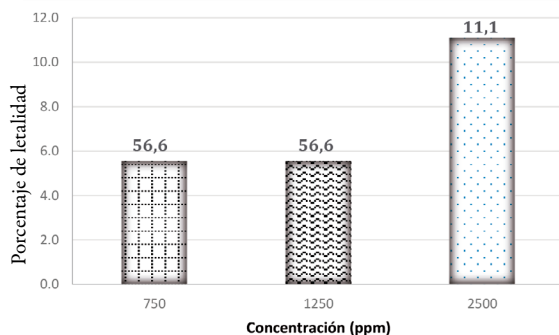


Figura 3. Porcentaje de letalidad del extracto etanólico de las hojas de *Justicia secunda* Vahl sobre *Artemia salina*, a las concentraciones probadas en unidades de ppm ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

El resultado de la toxicidad del extracto etanólico de las hojas de *J. secunda* Vahl sobre *A. salina* de la presente investigación coinciden con los resultados de Cantillo *et al.* [31], quienes reportaron que los extractos metanólico, diclorometanólico y acuoso de esta especie, además, mostraron baja toxicidad, sobre *A. salina*.

Según, Sanabria *et al.* [32], la presencia de algunos metabolitos secundarios en los extractos de las plantas se relaciona directamente con la letalidad sobre las larvas de *A. salina*, estos metabolitos son los taninos, las saponinas, las cumarinas y especialmente los alcaloides y las lactonas terpenicas. Los autores destacan que la letalidad sobre *A. salina* depende además de la concentración de dicha sustancia. Esto podría explicar la baja toxicidad mostrada por el extracto etanólico de las hojas de *J. secunda* Vahl, ya que, en este estudio estuvieron ausentes los metabolitos secundarios, taninos, saponinas y cumarinas (tabla 1).

CONCLUSIÓN

En el extracto hexanólico de las hojas de *Justicia secunda* Vahl se comprobó presencia de esteroides; en el extracto diclorometanólico esteroides y compuestos fenólicos y el extracto etanólico presentó los siguientes compuestos: alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos. El extracto diclorometanólico mostró 27,7 % de inhibición del radical DPPH• a 0,75 mg/mL, con un IC₅₀ de 1,85 mg/mL y ARP 0,54 mL/mg y el extracto etanólico, 53,0 % de inhibición del radical DPPH• a 0,75 mg/mL; un IC₅₀ de 0,69 mg/mL y ARP 1,45 mL/mg respectivamente. El extracto etanólico de las hojas de *J. secunda* Vahl resultó ser relativamente inocuo sobre *A. salina*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo reconocen y agradecen al Instituto de Investigaciones y al Departamento de Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. C. Ezcurra, Flora del valle del Lerma Acanthaceae, en: *Aportes Botánicos de Salta - Ser. Flora*, editado por Herbario MCNS, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta, Salta, República Argentina, Vol. 6, 1999, pp.1-45.
2. D.J. Mabberley, *Mabberley's plant-book: A portable dictionary of plants, their classification and uses*, Cambridge University Press, New York, 2008, p. 1021.
3. J.Q. Hu, Y.F. Deng, T.F. Daniel, Justicia, en: Z.Y. Wu, P.H. Raven, D.Y. Hong (editores), *Flora of China (Cucurbitaceae Valerianaceae with Annonaceae and Berberidaceae)*, Science Press Eds, Beijing and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, 2011, Vol. 19, pp. 449-461.
4. V.A.W. Graham, Delimitation and infra-generic classification of *Justicia* (Acanthaceae), *Kew Bull.* **43**(4), 551-624 (1988).
5. P. Zambrano-Mora, K.E. Bustamante-Pesantes, Caracterización y estudio fitoquímico de *Justicia secunda Vahl* (Sanguinaria, Singamochilla, Insulina), *Rev. Cubana Plant. Med.*, **22**(1), 1-8 (2017).
6. J.P. García-Lehera, Y.M. León-Ávila, Notas sobre la presencia de *Justicia secunda Vahl* (Acanthaceae) en Cuba, *Revista Infociencia*, **17**(2), 5-8 (2013).
7. G.M. Corrêa, A.F. Alcántara, Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia* a review, *Rev. Bras. Farmacog.*, **22**(1), 220-238 (2012).
8. J.C. Gómez-Verjan, R. Reyes-Chilpa, M.I. Aguilar, Chemistry and pharmacology of selected Asian and American medicinal species of *Justicia*, en: V.K. Gupta

- (editor), *Bioactive Phytochemicals. Perspectives for Modern Medicine*, Daya Publishing House, India, 2013, pp. 455-473.
9. L. Akibou, D. Agbangnan, C. Pascal, A. Bossou, A. Dohoué, Y. Koudoro, N. Pierre, F. Avlessi, D. Sohounhloou, Chemical characterization and biological activities of extracts of three plants used in traditional medicine in benin: *Tectona grandis*, *Uvaria chameae* and *Justicia secunda* Vahl., *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, **7**(5), 23-27 (2014).
 10. P.T. Mpiana, K.N. Ngbolua, M.T. Bokota, T.K. Kasonga, E.K. Atibu, D.S. Tshibangu, V. Mudogo, *In vitro* effects of anthocyanin extracts from *Justicia secunda* Vahl on the solubility of haemoglobin S and membrane stability of sickle erythrocytes, *Blood Transfus.*, **8**(4), 248-254 (2010).
 11. E.N. Koffi, C. Le Guernevé, P.R. Lozano, E. Meudec, F.A. Adjé, Y.A. Bekro, Y.F. Lozano, Polyphenol extraction and characterization of *Justicia secunda* Vahl leaves for traditional medicinal uses, *Ind. Crops Prod.*, **49**, 682-689 (2013).
 12. I. Calderón, A. Hodel, J.L. Wolfender, M.P. Gupta, M. Correa, K. Hostettmann, LC-DAD-MS-based metabolite profiling of three species of *Justicia* (Acanthaceae), *Nat. Prod. Res.*, **27**(15), 1335-1342 (2013).
 13. B.A. Theiler, S. Revoltella, M. Zehl, C. Dangl, L.O. Espinoza-Caisa, J. König, J. Winkler, E. Urban, S. Glasl, Secundarellone A, B, and C from the leaves of *Justicia secunda* VAHL, *Phytochemistry Letters*, **10**, CXXIX-CXXXII (2014).
 14. D. Marcano, M. Hasegawa, Fitoquímica orgánica, 2a ed., Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico Eds., Caracas, Venezuela, 2002, p. 588.
 15. B. Contreras-Moreno, L. Díaz, M.T. Celis, J. Rojas, L. Méndez, L.P. Rosenzweig, J. Ontiveros, Actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de *Pimenta racemosa* var. *racemosa* (Mill.) J.W. Moore (Myrtaceae) de Táchira-Venezuela, *Ciencia e Ingeniería*, **38**(3), 223-230 (2017).
 16. C.M. Plaza, L. Díaz de Torres, R.K. Lücking, M. Vizcayaa, G.E. Medina, Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of lichens from Venezuelan Andes, *J. Pharm. Pharmacogn. Res.*, **2**(5), 138-147 (2014).
 17. L. Díaz, S. De Monjito, A. Medina, P. Meléndez, V. Laurence, G. Marti-Mestres, Activity of ethanolic extracts leaves of *Machaerium floribundum* against acne-

- inducing bacteria, and their cytoprotective and antioxidant effects on fibroblast, *Rev. Per. Biol.*, **18**(2), 153-158 (2011).
18. P. Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH•) for estimating antioxidant activity, *J. Sci. Technol.*, **26**(2), 211-219 (2004).
 19. P. Goupy, M. Hugues, P. Boivin, M. Amiot, Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds, *J. Sci. Food Agric.*, **79**(12), 1625-1634 (1999).
 20. C. Plaza, *Identificación y estudio de actividades biológicas de nueve especies de líquenes, colectadas en el estado Mérida, Venezuela*, Tesis doctoral, Universidad de Los Andes, Venezuela, 2015, p. 208.
 21. L. Sánchez, A. Neira, Bioensayo general de Letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava* L. y *Psidium guineense*, *Cultura Científica*, **3**, 39-45, (2005).
 22. L. Acosta de La Luz, Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales, *Rev. Cubana Plant. Med.*, **8**(1), 1-10 (2003).
 23. L.E. Santacoloma-Varón, J.E. Granados, Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* y algunas propiedades fisicoquímicas del suelo, *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, **3**(1), 53-62 (2012).
 24. C. Valares, *Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente*, Servicio de Publicaciones, Universidad de Extremadura, España, 2011, p. 217.
 25. J.L. Cabrera-Carrión, C. Jaramillo-Jaramillo, F. Dután-Torres, J. Cun-Carrión, P.A. García, L. Rojas de Astudillo, Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam en función de su edad y altura, *Bioagro*, **29**(1), 53-60 (2017).
 26. S.O. Onoja, M.I. Ezeja, Y.N. Omeh, B.C. Onwukwe, Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities of methanolic extract of *Justicia secunda* Vahl leaf, *Alexandria J. Med.*, **53**(3), 207-213 (2017).
 27. E.M. Kuskoski, A.G. Asuero, A. Troncoso, J. Mancini-Filho, R. Fett, Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos, *Food Sci. Technol.*, **25**(4), 726-732 (2005).

28. S.C. Paladino, *Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (Vitis vinifera L)*, Tesis de Maestría, Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis, Argentina, 2008, 100 p.
29. B. Echavarría, A. Franco, A. Martínez, Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano, *Vitae*, **16**(1), 126-131 (2009).
30. A. Echavarría, H.D' Armas, N. Matute, L. Matute, C. Jaramillo, L. Rojas de Astudillo, R. Benitez, Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales, *Ciencia Unemi*, **9**(20), 29-35 (2016).
31. J. Cantillo, J. Güette, R. Baldiris, B. Jaramillo, J. Olivero, Evaluación de la toxicidad aguda (CL₅₀) frente a *Artemia franciscana* y la actividad hemolítica de los extractos acuosos, en diclorometano y metanólico parcial de *Justicia secunda* (Vahl), *Scientia et Technica*, **1**(33), 257-258 (2007).
32. A. Sanabria-Galindo, S.I. López, R. Gualdrón, Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **26**(1), 15-19 (1997).

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

T. López, M. Morillo, T. Visbal, J. Carmona, Estudio fitoquímico, actividad antioxidante y toxicidad sobre *Artemia salina* de los extractos de las hojas de *Justicia secunda* Vahl. (Acanthaceae), recolectada en Mérida-Venezuela, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **51**(1), 213-229 (2022).